

Inmunodetección con fosfatasa alcalina: un nuevo método más sensible y específico para el estudio de las bandas oligoclonales

N. GARCÍA-BARRAGÁN, J. MASJUAN, M. DÍAZ-SÁNCHEZ, J. C. ÁLVAREZ-CERMEÑO,
M. C. SÁDABA*, M. ESPÍÑO*, L. M. VILLAR*

Servicios de Neurología e Inmunología.
Hospital Ramón y Cajal.
Madrid.*

RESUMEN. Los métodos frecuentemente utilizados para el estudio de las bandas oligoclonales (BOC) de IgG en pacientes con esclerosis múltiple tienen poca sensibilidad y, por tanto, son difíciles de interpretar en laboratorios con poca experiencia. Nuestro grupo ha desarrollado un nuevo método para la detección de BOC utilizando el isoelectroenfoco y la inmunodetección con fosfatasa alcalina, que es más fácil de interpretar que las técnicas previamente descritas. Este nuevo método tiene mayor sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de la esclerosis múltiple.

Palabras clave: bandas oligoclonales, esclerosis múltiple, inmunodetección, fosfatasa alcalina.

SUMMARY. The methods often used to detect oligoclonal IgG bands in multiple sclerosis patients are not sensitive enough, and though, difficult to manage in laboratories without experience. Our group has developed a new method using isoelectrofocusing and immunodetection with alkaline phosphatase easier to analyze than the ones previously reported. This new method has a higher specificity and sensibility to diagnose Multiple Sclerosis and it is easier to analyze.

Key words: oligoclonal bands, multiple sclerosis, immunodetection, alkaline phosphatase.

La esclerosis múltiple (EM) es la enfermedad desmielinizante más frecuente del sistema nervioso central (SNC). Sin embargo, hasta la fecha no se han identificado marcadores diagnósticos específicos de esta enfermedad^{1,2}.

Durante los últimos años se han utilizado diferentes criterios para el diagnóstico de la EM basados en aspectos clínicos y en pruebas paraclínicas, que incluyen la resonancia magnética (RM), los potenciales evocados y el análisis del líquido cefalorraquídeo (LCR). Aunque se han propuesto criterios radiológicos muy rigurosos para el diagnóstico de la EM, las recomendaciones sobre el estudio del LCR no han sido tan concisas^{3,4}.

Es evidente que para estudiar el LCR de un paciente con sospecha de EM los neurólogos necesitan conocer los resultados de todos los tests realizados en él (número de células, proteínas, glucosa...), pero sin duda, la determinación de la síntesis intratecal de IgG (SITG) es el más importante. La mayoría de los pacientes con EM presentan SITG y su detección puede ayudar al diagnóstico precoz de la enfermedad^{4,6}. Su presencia implica una respuesta inmune de tipo humoral restringida al SNC.

El estudio de la SITG se realiza con pruebas cuantitativas o cualitativas. Las cuantitativas calculan la producción local de IgG en el SNC usando

fórmulas que separan el componente producido dentro del SNC (síntesis intratecal) del procedente del suero (Índice de Link...). Las cualitativas se basan en la identificación de bandas oligoclonales de IgG (BOCG).

Las BOCG están presentes en más del 90% de los pacientes con EM^{5,8} y son una herramienta básica para el estudio de esta enfermedad, sobre todo si tenemos en cuenta que los índices cuantitativos del LCR son menos sensibles para detectar SITG^{5,9} y ninguno es equivalente a un análisis cualitativo^{5,10}. Por ello, actualmente, se recomiendan los análisis cualitativos, especialmente los que utilizan el isoelectroenfoco (IEF), que es la técnica más adecuada para la separación de la IgG¹¹, seguido de inmunodetección o inmunofijación^{5,7}. Estos tests son los más sensibles para detectar la respuesta intratecal de IgG^{9,11}. Hasta hace poco se utilizaba la tinción con plata, que es una tinción proteica directa, pero se ha visto sustituida por técnicas de inmunofijación por ser muy poco específica para diferenciar la IgG de otras proteínas. Los métodos más empleados incluyen la transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa seguida de inmunodetección con un anticuerpo anti-IgG marcado con un enzima.

La peroxidasa era el enzima más usado; su limitada sensibilidad hacía necesario contar con laboratorios

expertos, pues la interpretación de los resultados con esta técnica a veces es difícil^{7, 7}. Lamentablemente, esto ocasiona resultados variables respecto a la sensibilidad y especificidad de la técnica dependiendo de quien la realice^{12, 13}. Por ello, hemos desarrollado un nuevo método para la determinación de las BOCG. Es una técnica más sensible y específica que las publicadas previamente para la detección de los diferentes patrones de BOCG en suero y en LCR^{7, 14}. Esta técnica incluye un IEF para separar la IgG, transferencia a nitrocelulosa e inmunodetección con anti-IgG marcada con fosfatasa alcalina (FA) que presenta una sensibilidad unas diez veces mayor que la peroxidasa^{7, 14, 15}. Además, los patrones resultantes son más claros y fáciles de interpretar que los obtenidos con la peroxidasa.

La precisión de esta técnica para el diagnóstico de EM se ensayó en un amplio grupo de pacientes con diferentes enfermedades neurológicas, obteniéndose no sólo una alta sensibilidad, sino una especificidad muy superior a la demostrada con otras técnicas⁴.

Material y método

Se obtienen muestras pareadas de suero y LCR de cada paciente, se alicuotan y se congelan a -40° C hasta que se realiza la determinación de BOCG. La concentración de IgG presente en LCR y suero se cuantifica en un nefelómetro BNII (Dade-Behring). Las muestras de suero se diluyen con agua desionizada hasta alcanzar la misma concentración de IgG que la que tienen las muestras del LCR. Éstas solamente se diluyen si su concentración de IgG es superior a 5 mg/dl. El IEF se realiza sobre un gel de agarosa IEF con Pharmalyte 3-10 y 8-10 en un aparato Multiphor II enfriado a 10° C¹¹. Las tiras de papel de los electrodos se humedecen con NaOH 1 M (catolito) y ácido sulfúrico 0,05 M (anolito). Se aplican 3 microlitros de LCR y de suero diluido sobre un aplicador colocado en el lado anódico del gel.

En cada gel se incluye como control positivo una muestra de un paciente con BOCG. El IEF corre a 10 W durante 30 minutos, y después a 20 W hasta que se completa después de 1500 voltios/hora. El voltaje se limita a 1250 v. El tiempo medio es de 90 min.

Inmunoblotting

Después del IEF, las proteínas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa (Millipore). Para ello la membrana se coloca sobre la superficie del gel, seguida de 25 hojas de papel de filtro. La transferencia se hace bajo un peso de 2 kg durante 15 minutos. La membrana de nitrocelulosa es entonces retirada y se bloquea con leche desnatada al 2% en suero salino durante 30 minutos. A continuación, se incuba duran-

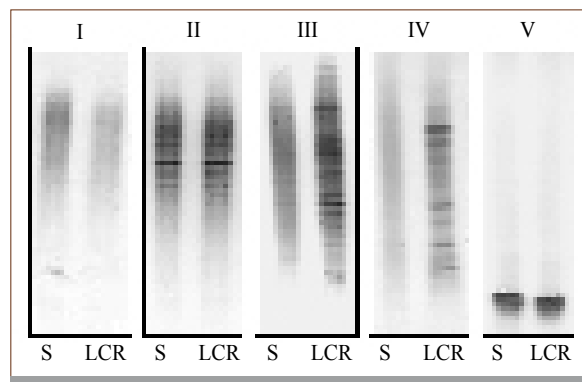


Figura 1 Patrones en suero y líquido cefalorraquídeo. S: suero. LCR: líquido cefalorraquídeo. Patrón I: patrón policlonal en suero y LCR. Patrón II: patrón idéntico de BOC en suero y LCR (patrón “en espejo”). Patrón III: BOC en LCR adicionales a las del suero (patrón “mayor o más que”). Patrón IV: BOC exclusivamente en LCR. Patrón V: monoclonal en suero y LCR.

te 1 hora a temperatura ambiente en un agitador con anti-IgG marcada con FA diluida en suero salino con leche desnatada al 0,2%. La membrana se lava después 25 veces con agua y una con suero salino durante 10 minutos. Finalmente se revela utilizando nitro azul de tetrazolio y bromo, cloro, indoleil-fosfato.

Resultados

El método de la FA mostró una sensibilidad 10 veces mayor que la inmunodetección de peroxidasa para la detección de BOC y fue capaz de detectar hasta 1 ng de IgG presente en 3 microlitros de muestra⁷. Además, la técnica de la fosfatasa alcalina da patrones más claramente visibles incluso para bajas concentraciones de IgG, en ocasiones, indetectables con la técnica de la peroxidasa.

Con esta técnica de la FA también se pudieron identificar los 5 patrones descritos por Andersen *et al.*⁵ permitiendo, además, mejorar su detección respecto a la peroxidasa. Los patrones se muestran en la Figura 1. En el patrón I se identifica un patrón policlonal en suero y LCR, el patrón II muestra un patrón oligoclonal idéntico en suero y LCR (patrón en espejo), el III representa un patrón de BOC en el suero y en el LCR con bandas adicionales en este último (patrón “mayor que”), el IV es un patrón de bandas oligoclonales exclusivamente en el LCR, y el V es un patrón monoclonal en suero y LCR. Decimos que existe síntesis intratecal de IgG cuando tenemos el patrón III o IV⁴.

Analizamos muestras de sangre y LCR pareadas de 385 pacientes de nuestro hospital con el objetivo de ver la posible asociación de cada patrón

descrito con diferentes enfermedades neurológicas. Las muestras correspondían a 132 pacientes con EM clínicamente definida según criterios de Poser¹, 37 pacientes con enfermedades inflamatorias del SNC diferentes a la EM (vasculitis, síndromes paraneoplásicos, encefalitis de Hashimoto...), 26 pacientes con enfermedades inflamatorias del sistema nervioso periférico (S. de Guillain-Barré, polineuropatía inflamatoria desmielinizante crónica), 100 pacientes con enfermedades neurológicas no inflamatorias, 51 eran pacientes con enfermedades infecciosas del SNC y 39 pacientes con cefalea inespecífica sin otra enfermedad neurológica asociada. Se utilizaron como ratios de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN) y precisión los reflejados en la Tabla I. Los resultados fueron analizados utilizando el paquete estadístico Prism 3,0; GraphPad, San Diego, Ca. El test de Fisher fue utilizado para comparar porcentajes.

Aquellos pacientes con patrón III o IV se consideraron positivos para SITG y los que tenían los patrones I y II, negativos. El patrón IV se detectó únicamente en pacientes con EM. El patrón II es más frecuente en pacientes con enfermedades inflamatorias del SNC distintas a la EM. En los pacientes con infecciones del SNC predominaba el tipo III. La sensibilidad para el diagnóstico de la EM fue de 96,2% y la especificidad de 92,5%; si excluimos los pacientes con enfermedades infecciosas (51) del total (385), ya que desde el punto de vista clínico, una enfermedad infecciosa habitualmente no plantea problemas de diagnóstico diferencial con la EM, la sensibilidad para el diagnóstico de EM con esta técnica es de 96,2% pero la especificidad aumenta al 99,5% (Tabla II).

□ Discusión

El diagnóstico actual de la EM se apoya en diferentes estudios paraclínicos, entre los que se incluye la RM, los potenciales evocados y la determinación de BOCG en el LCR. Los nuevos criterios de EM incluyen la RM como parte integral de los mismos². Sin embargo, el estudio del LCR de forma sistemática está menos difundido, probablemente debido a la gran variabilidad de las técnicas empleadas y a la falta de resultados uniformes, condicionado, en muchas ocasiones, por la experiencia del laboratorio que los realiza. Por ello, es importante disponer de un método sensible que permita identificar con más facilidad los patrones de IgG en el suero y en el LCR, fundamentalmente el patrón oligoclonal del policlonal.

Un panel de expertos ha establecido recientemente unas recomendaciones para el análisis del LCR en pacientes con EM³. La técnica aconsejada para de-

Tabla I Ratios empleados en el estudio	
Sensibilidad =	$[VP/(VP + FN)] \times 100$
Especificidad =	$[VN/(VN + FP)] \times 100$
Valor predictivo positivo =	$[VP/(VP + FP)] \times 100$
Valor predictivo negativo =	$[VN/(VN + FN)] \times 100$
Precisión =	$[VP + VN/(VN + VN + FP + FN)] \times 100$

VP: verdadero positivo. FN: falso negativo. VN: verdadero negativo. FP: falso positivo.

Tabla II Precisión de la inmunodetección con FA para el diagnóstico de la EM*	
Sensibilidad (%)	96,2
Especificidad (%)	99,5
Exactitud (%)	98,2
Valor predictivo positivo (%)	99,2
Valor predictivo negativo (%)	97,6

*Se ha excluido para este análisis del grupo total de pacientes analizados (n = 385) a aquellos con infecciones del SNC (n = 51).

tectar IgG en el LCR es el IEF, que ha demostrado ser una buena técnica para separar IgG¹⁶, seguido de transferencia e inmunodetección. La peroxidasa detecta BOCG en el LCR de pacientes con altas concentraciones de IgG, pero sus resultados son difíciles de interpretar en pacientes con bajas concentraciones de IgG o en aquellos en los que la respuesta oligoclonal coexiste con un fondo policlonal⁷. Esto puede ocasionar falsos positivos y negativos. Además, teniendo en cuenta que la punción lumbar es una prueba incómoda para el paciente, es importante obtener la mayor información posible del LCR.

Nuestro grupo se planteó la necesidad de tener un método sensible para detectar BOCG en LCR. Por ello, decidió poner a punto una técnica de IEF con inmunodetección con FA. Su definición es superior a la de las técnicas utilizadas previamente, y resulta más fácil diferenciar los patrones de BOCG en suero y LCR. Los estudios realizados en nuestro laboratorio demuestran que este nuevo método es más sensible que el de la peroxidasa para detectar BOCG en pacientes con EM, da patrones más claros de interpretar¹⁴ y detecta hasta 1 ng de IgG presente en 3 micrgr de muestra, mientras que la peroxidasa necesita concentraciones mayores de IgG en el LCR, lo que puede aumentar el número de falsos negativos, al no detectar IgG en bajas concentraciones.

La técnica de la FA tiene una sensibilidad de 96,2% que es comparable a la descrita previamente

por laboratorios expertos en esta materia^{17, 18}, pero la mayor ventaja de este método, en una enfermedad crónica como la EM, probablemente no es sólo su sensibilidad sino su elevada especificidad. Incluso incluyendo los pacientes con infecciones del SNC, que habitualmente no representan un problema en el diagnóstico diferencial de la EM, su especificidad es del 92,5%, por tanto, superior a la obtenida con otras técnicas^{4, 8, 10, 18, 19}. Sin tener en cuenta dichas infecciones, la especificidad es de 99,5%⁴. Haber obtenido valores tan elevados de sensibilidad y especificidad, se debe, en parte, a la mayor facilidad para identificar diferentes patrones en suero y LCR, por lo que si tenemos en cuenta que algunos grupos de enfermedades neurológicas se asocian más frecuentemente con cada uno de los diferentes patrones, la determinación de las BOCG supone una ayuda adicional al diagnóstico diferencial de la enfermedad. Los pacientes con EM habitualmente tienen un patrón III (BOC en LCR adicionales a las del suero) o IV (BOC exclusi-

vas en el LCR), en nuestros casos, el patrón IV solamente se identificó en pacientes con EM. El patrón I o II aparece habitualmente en otras enfermedades neurológicas, y el III suele aparecer en las infecciones del SNC.

Por estos motivos, aunque es indudable el valor de los criterios de Barkhof de RM para el diagnóstico de la EM, no podemos olvidar que el estudio del LCR en paralelo con el suero y analizando la misma cantidad de IgG en ambos, aporta una información muy valiosa en esta enfermedad, no sólo por contribuir a excluir otras enfermedades neurológicas sino por reflejar la actividad inmunológica del SNC y facilitar la detección de las BOCG tan características de esta enfermedad ya desde sus fases iniciales. El método del IEF y posterior inmunodetección con FA para la detección de las BOCG tiene una sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de la EM superior a las utilizadas previamente⁷ y contribuye al diagnóstico diferencial de la enfermedad por su alta especificidad.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, *et al.* New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 1983; 13: 227-231.
- 2.- McDonald WI, Compston A, Edan G, *et al.* Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001; 50: 121-127.
- 3.- Freedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F, *et al.* Recommended Standard of Cerebrospinal Fluid Analysis in the Diagnosis of Multiple Sclerosis. *Arch Neurol* 2005; 62: 865-870.
- 4.- Villar LM, Masjuan J, Sádaba MC, *et al.* Early differential diagnosis of Multiple Sclerosis using a new oligoclonal band test. *Arch Neurol* 2005; 62: 574-577.
- 5.- Andersson M, Álvarez-Cermeño JC, Cogato I, *et al.* Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994; 57: 897-902.
- 6.- Reiber H, Thompson EJ, 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: 331-337.
- 7.- Sádaba MC, González-Porqué P, Masjuan J, *et al.* An ultrasensitive method for the detection of oligoclonal IgG bands. *J Immunol Methods* 2004; 284: 141-145.
- 8.- McLean BN, Luxton RW, Thompson EJ. A study of Immunoglobulin G in the cerebrospinal fluid of 1007 patients with suspected neurological disease using isoelectric focusing and the log IgG-index. *Brain* 1990; 113: 1269-1289.
- 9.- Verbeek M, de Reus H, Weykamp CW. Comparison of Methods for the detection of oligoclonal IgG Bands in cerebrospinal fluid and serum: Results of the Dutch Quality Control Survey. *Clin Chem* 2002; 48: 1578-1580.
- 10.- Lunding J, Midgard R, Vedeler CA. Oligoclonal bands in cerebrospinal fluid: a comparative study of isoelectric focusing, agarose gel electrophoresis and IgG index. *Acta Neurol Scand* 2000; 102: 322-325.
- 11.- Keir G, Luxton RW, Thompson EJ. Isoelectric focusing of cerebrospinal fluid immunoglobulin G: an annotated update. *Ann Clin Biochem* 1990; 27: 436-443.
- 12.- Giovannonni G, Bever CT. Patients with clinically isolated syndromes suggestive of MS. Does MRI allow earlier diagnosis? *Neurology* 2003; 60: 6-7.
- 13.- Beer S, Rosier KM, Hess CW. Diagnostic value of paraclinical tests in multiple sclerosis: relative sensitivities and specificities for reclassification according to the Poser committee criteria. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1995; 59: 152-159.
- 14.- Masjuan J, Álvarez-Cermeño JC, García-Barragán N, *et al.* Clinically isolated syndromes. A new oligoclonal band test accurately predicts conversion to MS. *Neurology* 2006; 66: 576-578.
- 15.- Villar LM, González-Porqué P, Masjuan J, *et al.* De-

- scription of a sensitive and reproducible method for the detection of oligoclonal IgM bands. *J Immunol Methods* 2001; 258: 151-155.
- 16.- Sindic CJM, Van Antwerpen MP, Gofette S. The intrathecal humoral immune response: laboratory analysis and clinical relevance. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39: 333-340.
- 17.- Paolino E, Fainardi E, Ruppi P, *et al.* A prospective study of the predictive value of CSF oligoclonal bands and MRI in acute isolated neurological syndromes for subsequent progression to multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1996; 60: 572-575.
- 18.- Kostulas VK, Link H, Lefvert A-K. Oligoclonal IgG bands in cerebrospinal fluid: principles for demonstration and interpretation based on findings in 1114 neurological patients. *Arch Neurol* 1987; 44: 1041-1044.
- 19.- Richard S, Miossec V, Moreau JF, Taupin DL. Detection of oligoclonal immunoglobulins in cerebrospinal fluid by an immunofixation-peroxidase method. *Clin Chem* 2002; 48: 167-173.