

Avaliação quantitativa e qualitativa da síntese de IgG em 8.947 amostras de líquido cefalorraquidiano

Quantitative and qualitative evaluation of IgG synthesis in 8,947 cerebrospinal fluid samples

Renan B. Domingues; Gustavo B. Peres; Fernando B. Moura-Leite; Carlos S. Soares

Senne Liquor Diagnóstico, São Paulo, São Paulo, Brasil.

RESUMO

Introdução: O aumento da síntese intratecal de imunoglobulina da classe G (IgG) pode ser encontrado em diferentes doenças neuroinflamatórias. **Objetivo:** Avaliar retrospectivamente diferentes métodos de avaliação da imunoprodução intratecal. **Métodos:** Dados de líquido cefalorraquidiano (LCR) e soro enviados para o Senne Liquor Diagnóstico entre 2001 e 2017 foram avaliados. Dados de citologia, bioquímica e imunologia foram comparados entre amostras com e sem bandas oligoclonais (BOCs). Comparações dos parâmetros do LCR entre amostras com (BOC+) e sem BOCs (BOC-) foram realizadas, e a habilidade de prever a presença de BOCs foi avaliada por meio de curvas ROC. **Resultados:** Foram incluídas 8.947 amostras, sendo 2.599 BOC+ e 6.348 BOC-. Contagens de linfócitos e monócitos foram significativamente associadas à presença de BOC ($p < 0,001$). Todos os métodos de avaliação da IgG foram significativamente associados a BOC+; os com maior associação foram o índice de IgG e o Reiber [área sob a curva *receiver operating characteristic* (AUROC) = 0,881 e 0,863, respectivamente]. Entre os casos BOC-, o índice de IgG foi elevado em 9,56%, e o Reiber mostrou aumento de produção de IgG em 4,6%. **Conclusão:** Houve forte associação entre BOC e outros parâmetros neuroinflamatórios do LCR. A existência de casos BOC- com aumento da produção de IgG por métodos quantitativos sugere que tanto métodos qualitativos quanto quantitativos devem ser utilizados na avaliação dos processos neuroinflamatórios.

Unitermos: líquido cefalorraquidiano; bandas oligoclonais; índice de IgG.

ABSTRACT

Introduction: Increased intrathecal immunoglobulin class G (IgG) synthesis can be found in several neuroinflammatory diseases. **Objective:** The aim of this study was to analyze quantitative and qualitative methods of intrathecal immunoproduction evaluation. **Methods:** We retrospectively assessed data from cerebrospinal fluid (CSF) and serum samples sent to Senne Liquor Diagnóstico from 2001 to 2017. Cytological, biochemical, and immunological data were compared between cases with and without oligoclonal bands (OCBs). Comparisons between samples with OCBs (OCB+) and without them (OCB-) were carried out, and the ability to predict the presence of OCBs was assessed with ROC analysis. **Results:** We included 8,947 samples (2,599 OCB+ samples and 6,348 OCB- samples). CSF lymphocytes and monocytes were significantly associated with the presence of OCB ($p < 0.001$). All the inflammatory parameters were significantly associated with OCB, and the methods with the highest predictive ability for OCB were IgG index and Reiber diagram [area under the receiver operating characteristic (AUROC) curve = 0.881 and 0.863, respectively]. A small percentage of cases without OCB had high IgG index (9.56%) or Reiber diagram, showing increased IgG production (4.6%). **Conclusion:** We showed a strong association between OCB and other CSF inflammatory parameters. The presence of cases with increased quantitative CSF IgG synthesis without OCB suggests that both quantitative and qualitative methods should be performed in the evaluation of neuroinflammatory processes.

Key words: cerebrospinal fluid; oligoclonal bands; immunoglobulin G.

RESUMEN

Introducción: El incremento de la síntesis intratecal de inmunoglobulina G (IgG) puede ser encontrado en diferentes enfermedades neuroinflamatorias. **Objetivo:** Analizar retrospectivamente diferentes métodos de evaluación de la producción intratecal. **Métodos:** Se examinaron datos del líquido cefalorraquídeo (LCR) y suero enviados para el Senne Liquor Diagnóstico entre 2001 y 2017. Se compararon datos de citología, bioquímica e inmunología entre muestras con y sin bandas oligoclonales (BOC). Se hicieron comparaciones de los parámetros del LCR entre muestras con (BOC+) y sin BOC (BOC-), y la habilidad para predecir la presencia de BOCs fue evaluada mediante curvas ROC. **Resultados:** Se incluyeron 8.947 muestras, con 2.599 BOC+ y 6.348 BOC-. Recuentos de linfocitos y monocitos fueron significativamente asociados a la presencia de BOC ($p < 0,001$). Todos los métodos de evaluación de IgG fueron significativamente asociados a BOC+; aquellos con mayor asociación fueron el índice de IgG y el Reiber (área bajo la curva ROC = 0,881 y 0,863), respectivamente. Entre los casos BOC-, el índice de IgG fue alto en 9,56% y el Reiber demostró incremento de producción en 4,6%. **Conclusión:** Hubo fuerte asociación entre BOC y otros parámetros neuroinflamatorios del LCR. La existencia de casos BOC- con incremento de producción de IgG mediante métodos cuantitativos sugiere que tanto métodos cualitativos como cuantitativos deben ser usados en la evaluación de procesos neuroinflamatorios.

Palabras clave: líquido cefalorraquídeo; bandas oligoclonales; índice de IgG.

INTRODUÇÃO

O aumento da síntese de imunoglobulina da classe G (IgG) no líquido cefalorraquidiano (LCR) é encontrado em vários distúrbios, incluindo doenças neurológicas inflamatórias e infecciosas. Métodos quantitativos e qualitativos são usados para avaliar a produção de IgG no sistema nervoso central (SNC)^(1, 2). Os métodos quantitativos mais usados são determinação de IgG no LCR, índice de IgG⁽³⁾ e diagrama de Reiber^(4, 5). A avaliação qualitativa da imunoprodução intratecal de IgG é realizada com a detecção de bandas oligoclonais (BOCs) por focalização isoeletrica (FIE)⁽⁶⁾.

A identificação de BOCs por FIE é considerada o método mais sensível para detectar a síntese intratecal de IgG⁽⁷⁾. Há cinco interpretações padronizadas: tipo 1 – normal; tipo 2 – BOC em LCR e não no soro; tipo 3 – BOC no LCR e no soro, mas com mais bandas no LCR que no soro; tipo 4 – com as mesmas BOCs no LCR e no soro; tipo 5 – com bandas monoclonais no LCR e no soro. O número de bandas não é levado em consideração, mas a correspondência de bandas entre soro e LCR, o que explica porque esse método é qualitativo e não quantitativo⁽⁸⁾. Os tipos 2 e 3 comumente indicam síntese intratecal de IgG, o tipo 4 revela uma inflamação sistêmica na qual anticorpos do soro atravessam a barreira hematoencefálica e o tipo 5 é encontrado em paraproteinemias sistêmicas⁽³⁾.

A correlação de BOCs com outros métodos de avaliação de síntese intratecal de IgG, assim como com outros parâmetros do LCR, não é inteiramente compreendida^(9, 10). O objetivo deste

estudo foi analisar a associação de BOCs com outros métodos de avaliação da síntese de IgG no LCR e outros parâmetros inflamatórios de LCR.

MÉTODOS

Estudo retrospectivo que avaliou amostras de LCR e soro enviadas ao Senne Liquor Diagnóstico entre janeiro de 2001 e julho de 2017 para análise da síntese intratecal de IgG. Os dados foram obtidos do banco de dados do Senne Liquor Diagnóstico.

A contagem de células do LCR e os dados bioquímicos do LCR foram registrados. A detecção de BOCs de IgG foi feita por FIE em combinação com *immunoblotting*⁽¹¹⁾. Albumina e IgG foram determinadas por nefelometria. A fração gamaglobulina foi verificada com eletroforese em gel de agarose⁽¹²⁾. O índice de IgG e o diagrama de Reiber foram calculados como demonstrado a seguir^(3, 4). Basicamente, o índice de IgG é: $[\text{IgG (LCR)} \times \text{albumina (soro)} / \text{IgG (soro)} \times \text{albumina (LCR)}] \times 100$. O Reiber é obtido assinalando os quocientes de IgG e albumina – Q IgG (IgG LCR/ IgG soro) e Q albumina (albumina LCR/albumina soro) – no diagrama de Reiber (Q IgG no eixo coordenada e Q albumina no eixo abscissa), desse modo identificando a área (quadrante). A marca localizada na área 4 (quadrante superior esquerdo) indica Q IgG alto e Q albumina baixo, demonstrando imunoprodução intratecal. Padrões de detecção de BOC com tipos 2 ou 3 foram classificados como BOC+ e os demais padrões foram classificados como BOC-.

A normalidade dos dados foi verificada por meio do teste Kolmogorov-Smirnov. Comparamos dados de LCR em amostras de BOC+ e BOC-. O teste *t* de Student foi usado para comparar dados contínuos. Dados categóricos foram comparados através do teste qui-quadrado. Variáveis com diferença significativa pela análise univariada foram mais tarde avaliadas com a análise de regressão logística binária. A análise de sensibilidade foi conduzida para comparar a habilidade de outras variáveis do LCR em prever BOC+. A área sob a curva *receiver operating characteristic* (AUROC) foi calculada como medida de habilidade preditiva. A análise estatística foi feita usando SPSS versão 17.0 para Windows. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$.

RESULTADOS

Foram incluídas 8.947 amostras (2.599 amostras BOC+ e 6.348 amostras BOC-). Dados citológicos e bioquímicos foram comparados entre as amostras BOC+ e BOC-. A contagem de leucócitos do LCR foi $8,72 \pm 36,2/\text{mm}^3$ entre as amostras BOC+ e $4,84 \pm 79,4/\text{mm}^3$ entre as BOC- ($p = 0,066$). As comparações do subconjunto de leucócitos entre BOC+ e BOC- foram: linfócitos $3,84 \pm 12,17/\text{mm}^3$ vs. $1,55 \pm 9,6/\text{mm}^3$ ($p < 0,001$); monócitos $0,3 \pm 1,9/\text{mm}^3$ vs. $0,14 \pm 1,7/\text{mm}^3$ ($p < 0,001$); neutrófilos $0,59 \pm 18,7/\text{mm}^3$ vs. $0,82 \pm 53,8/\text{mm}^3$ ($p = 0,834$). A concentração média de proteína total em BOC+ foi $35,5 \pm 23,3$ mg/dl e $37,5 \pm 29,1$ mg/dl em BOC- ($p = 0,018$). A média de lactato foi $14,8 \pm 4,1$ mg/dl entre BOC+ e $15,1 \pm 4,6$ mg/dl entre BOC- ($p = 0,063$).

A fração gamaglobulina foi significativamente mais alta entre amostras BOC+ que entre amostras BOC- ($6,1 \pm 8,7$ mg/dl vs. $4,1 \pm 6,1$ mg/dl, $p < 0,001$). A concentração de IgG do LCR foi mais alta entre amostras BOC+ do que entre BOC- ($6,6 \pm 32,7$ mg/dl vs. $3,8 \pm 21,7$ mg/dl, $p < 0,001$). O índice IgG médio foi significativamente mais alto entre amostras BOC+ ($0,74 \pm 0,78$ vs. $0,37 \pm 0,34$; $p < 0,001$). Uma pequena porcentagem de casos de BOC- (9,56%) teve índice IgG acima de 0,7, que é o ponto de corte usualmente adotado para o índice IgG. O índice IgG foi maior que 0,8 em 6,05% dos casos de BOC-. A maior parte (71,5%) dos casos de BOC+ e somente 4,6% dos casos de BOC- tiveram diagrama de Reiber na área 4, que é a área indicativa de imunoprodução intratecal aumentada ($p < 0,001$). Todos os parâmetros que foram significativamente diferentes entre BOC+ e BOC- pela análise univariada também o foram pela análise multivariada (Tabela).

As curvas ROC são mostradas na Figura. A AUROC mais alta foi o índice IgG (0,881), seguido de Reiber (0,863), IgG do LCR (0,842), gamaglobulina (0,761) e linfócitos (0,745). Os outros parâmetros tiveram AUROC abaixo de 0,6.

TABELA – Dados do LCR comparados entre amostras BOC+ e BOC-

	OCB+	OCB-	p^* (análise univariada)	p^{**} (análise multivariada)
Leucócitos (mm^3)	$8,72 \pm 36,2$	$4,84 \pm 79,4$	0,066	-
Linfócitos (mm^3)	$3,84 \pm 12,17$	$1,55 \pm 9,6$	$< 0,001$	$< 0,001$
Monócitos (mm^3)	$0,3 \pm 1,9$	$0,14 \pm 1,7$	$< 0,001$	0,001
Neutrófilos (mm^3)	$0,59 \pm 18,7$	$0,82 \pm 53,8$	0,834	-
Proteína (mg/dl)	$35,5 \pm 23,3$	$37,5 \pm 29,1$	0,018	$< 0,001$
Lactato (mg/dl)	$14,8 \pm 4,1$	$15,1 \pm 4,6$	0,063	-
Fração gamaglobulina (mg/dl)	$6,1 \pm 8,7$	$4,1 \pm 6,1$	$< 0,001$	$< 0,001$
IgG do LCR (mg/dl)	$6,6 \pm 32,7$	$3,8 \pm 21,7$	$< 0,001$	$< 0,001$
Índice IgG	$0,74 \pm 0,78$	$0,37 \pm 0,34$	$< 0,001$	$< 0,001$
Área 4 de Reiber (%)	71,5	4,6	$< 0,001$	$< 0,001$

LCR: líquido cefalorraquidiano; BOCs: bandas oligoclonais; IgG: imunoglobulina da classe G; *análise univariada com o teste *t* ou teste qui-quadrado; **análise multivariada com análise de regressão logística binária.

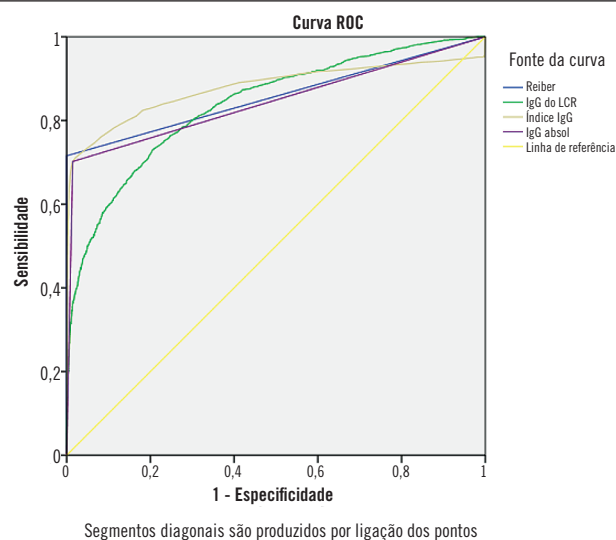


FIGURA – Curvas ROC da habilidade de índice IgG, diagrama de Reiber, IgG de LCR e fração gamaglobulina em prever BOC+

DISCUSSÃO

Neste estudo, mostramos forte associação entre a detecção de BOC e outros parâmetros neuroinflamatórios do LCR, como contagem de linfócitos e monócitos, gamaglobulina, IgG, índice IgG e diagrama de Reiber. Esse achado é consistente com o mecanismo de produção intratecal de IgG, que envolve ativação do linfócito B no contexto dos processos neuroinflamatórios. Essa ativação resulta em ativação do plasma celular dentro do SNC, assim explicando a produção aumentada de IgG⁽¹³⁾. Métodos quantitativos e qualitativos de avaliação da imunoprodução intratecal exibem diferentes níveis de sensibilidade e especificidade

para detectar a síntese de IgG. Por exemplo, em pacientes com esclerose múltipla (EM), a detecção qualitativa da síntese aumentada de IgG mostrou-se um método mais sensível. Enquanto a detecção de BOC usando FIE ocorre em 90%-95% dos pacientes com EM, as análises quantitativas de IgG são anormais em aproximadamente 75% dos casos de EM⁽¹⁴⁻¹⁶⁾. Entretanto, a frequência e o significado de detectar aumento na produção de IgG não estão bem estabelecidos em casos nos quais BOCs não são encontradas. Em doenças neuroinflamatórias que não a EM, a sensibilidade e a especificidade de métodos qualitativos e quantitativos ainda são desconhecidas.

No presente estudo, avaliamos o desempenho de métodos quantitativos em relação à detecção de BOCs. O índice IgG foi o teste com melhor habilidade em prever BOC+. Além disso, encontramos que 9,56% dos casos de BOC- tiveram índice IgG acima de 0,7, que é o corte mais frequentemente adotado. Encontramos ainda que 6,05% dos casos de BOC- tinham índice IgG acima de 0,8. Reiber foi o segundo parâmetro quantitativo com melhor associação com a presença de BOC. Encontramos que 4,6% dos casos sem BOC tinham diagrama de Reiber na área 4, que é a área sugestiva de síntese intratecal de IgG. A positividade de métodos em relação à detecção de BOC foi avaliada em alguns estudos prévios. Em um deles, os pesquisadores encontraram que BOCs sempre foram detectadas em casos com índice de IgG acima de 0,8⁽¹⁷⁾. Um estudo mais recente achou o índice IgG acima de 0,8 em alguns casos BOC-⁽⁹⁾. Há duas possibilidades para explicar resultados discrepantes entre BOC e métodos quantitativos: uma é que os métodos quantitativos na ausência de BOCs são indicadores verdadeiros de síntese intratecal de IgG, desse modo melhorando a chance de identificar um processo neuroinflamatório. A outra explicação possível é que índice IgG alterado e diagrama de Reiber em casos BOC- são falso-positivos. No presente estudo, não pudemos avaliar sensibilidade e especificidade, mas resultados

discrepantes sugerem uma interpretação cautelosa e individual dos resultados quando BOC e métodos quantitativos levam a resultados distintos. Na EM, detecção de BOC por FIE é o padrão-ouro para imunoprodução de IgG^(13, 15); entretanto, ainda não é possível descartar inteiramente que métodos quantitativos possam revelar aumento de imunoprodução intratecal em alguns casos sem BOC⁽¹⁸⁾. Em outros distúrbios neurológicos, a relação entre resultados de métodos quantitativos e qualitativos é ainda menos compreendida que na EM. É, portanto, razoável recomendar que tanto análises qualitativas quanto quantitativas sejam interpretadas individualmente em caso de resultados discrepantes.

Nosso estudo tem limitações que merecem ser mencionadas. Não fomos capazes de avaliar sensibilidade e especificidade de métodos diferentes para verificar a produção intratecal de IgG, pois este foi um estudo retrospectivo utilizando um banco de dados de LCR. Além disso, não pudemos avaliar o desempenho desses diferentes métodos em doenças diferentes, já que não tínhamos acesso aos dados clínicos dos pacientes. Também não foi possível correlacionar dados do LCR com dados radiológicos e atividade da doença. Entretanto, o grande tamanho da amostra incluída em nosso estudo, maior que as incluídas na maioria dos estudos anteriores na área, amplifica o valor dos nossos achados. Estudos futuros devem abordar, em diferentes doenças neuroinflamatórias e em diferentes estádios das doenças, o valor da avaliação quantitativa e qualitativa da síntese intratecal de IgG com diferentes métodos e parâmetros.

CONCLUSÃO

Nossos dados sugerem que tanto os testes qualitativos quanto os quantitativos deveriam ser utilizados na avaliação da produção intratecal de IgG.

REFERÊNCIAS

1. Reiber H. Cerebrospinal fluid – physiology, analysis and interpretation of protein patterns for diagnosis of neurological diseases. *Mult Scler*. 1998; 4(3): 99-107. Review. PubMed PMID: 9762655.
2. Thompson EJ, Keir G. Laboratory investigation of cerebrospinal fluid proteins. *Ann Clin Biochem*. 1990; 27(Pt 5): 425-35. PubMed PMID: 1704202.
3. Reiber H. Knowledge-base for interpretation of cerebrospinal fluid data patterns. *Essentials in neurology and psychiatry*. *Arq Neuropsiquiatr*. 2016; 74(6): 501-12. PubMed PMID: 27332077.
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(3): 319-28. PubMed PMID: 3581475.
5. Tourtellotte W. On cerebrospinal fluid immunoglobulin-G (IgG) quotients in multiple sclerosis and other diseases. A review and a new formula to estimate the amount of IgG synthesized per day by the central nervous system. *J Neurol Sci*. 1970; 10(3): 279-304. PubMed PMID: 4909729.
6. 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(7); 57: 897-902. PubMed PMID: 8057110.
7. 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): 865-70. PubMed PMID: 15956157.

8. Lim M. A glimpse at the cerebrospinal fluid immunoglobulins in neurological conditions. Does it help the clinician? *Dev Med Child Neurol.* 2013; 55(1): 10-2. PubMed PMID: 23131051.
9. 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(7): 527-30. PubMed PMID: 15958092.
10. Beseler C, Vollmer T, Graner M, Yu X. The complex relationship between oligoclonal bands, lymphocytes in the cerebrospinal fluid, and immunoglobulin G antibodies in multiple sclerosis: indication of serum contribution. *PLoS One.* 2017; 12(10): e0186842. PubMed PMID: 29059249.
11. Verbeek MM, de Reus HP, 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(9): 1578-80. PubMed PMID: 12194937.
12. Vandvik B, Skrede S. Electrophoretic examination of cerebrospinal fluid proteins in multiple sclerosis and other neurological diseases. *Eur Neurol.* 1973; 9(4): 224-41. PubMed PMID: 4121483.
13. Domingues RB, Fernandes GBP, Leite FBVM, et al. The cerebrospinal fluid in multiple sclerosis: far beyond the bands. *Einstein (São Paulo).* 2017; 15(1): 100-4. PubMed PMID: 28444098.
14. Gastaldi M, Zardini E, Leante R, et al. Cerebrospinal fluid analysis and the determination of oligoclonal bands. *Neurol Sci.* 2017; 38(Suppl 2): 217-24. PubMed PMID: 29030765.
15. Giovannoni G. Cerebrospinal fluid analysis. *Handb Clin Neurol.* 2014; 122: 681-702. PubMed PMID: 24507540.
16. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol.* 2018; 17(2): 162-73. PubMed PMID: 29275977.
17. Kaiser R, Czygan M, Kaufmann R, Lücking CH. Intrathecal IgG synthesis: when is determination of oligoclonal bands necessary? *Nervenarzt.* 1995; 66(8): 618-23. PubMed PMID: 7566274.
18. Jarius S, Eichhorn P, Wildemann B, Wick M. Usefulness of antibody index assessment in cerebrospinal fluid from patients negative for total-IgG oligoclonal bands. *Fluids Barriers CNS.* 2012; 9(1): 14. PubMed PMID: 22849518.

AUTOR CORRESPONDENTE

Renan Barros Domingues  0000-0002-6058-7937
e-mail: renan.domingues@senneliqor.com.br



This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.