



FACULTAD DE MEDICINA

MASTER INVESTIGACIÓN EN MEDICINA CLÍNICA

TRABAJO FIN DE MASTER

“Utilidad clínica de las BOC y revisión del protocolo para el diagnóstico de la esclerosis múltiple en el Hospital General de Castellón.”

POR

TERESA MARTÍNEZ GASPAR

Tutor académico: Dra. Esther Caparrós Cayuela

2014-2015

INDICE

1. RESUMEN/PALABRAS CLAVE
2. ABSTRACT/KEY WORDS
3. INTRODUCCIÓN
4. OBJETIVOS
5. MATERIAL Y MÉTODOS
 - Diseño
 - Ámbito
 - Sujetos del estudio
 - Tamaño muestral
 - Variables del estudio
 - Recogida y análisis de datos
 - Dificultades y limitaciones del estudio
6. CALENDARIO DE TRABAJO
7. ASPECTOS ÉTICOS
8. APLICABILIDAD Y UTILIDAD DE RESULTADOS
9. EQUIPO INVESTIGADOR Y DISTRIBUCIÓN DE TAREAS
10. PRESUPUESTO
11. BIBLIOGRAFÍA

1. RESUMEN

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad desmielinizante crónica del sistema nervioso central, en la cual el laboratorio tiene un papel importante para su diagnóstico mediante la determinación de bandas oligoclonales (BOC) en líquido cefalorraquídeo.

El objetivo del estudio es determinar la prevalencia de BOC en pacientes remitidos desde el servicio de Neurología, y el cálculo de la sensibilidad y especificidad de nuestra técnica como validación interna. Este será el punto de partida para la revisión del actual procedimiento de diagnóstico e implementación de un protocolo de diagnóstico de esclerosis múltiple en nuestro hospital.

De forma retrospectiva se revisarán las historias clínicas de todos los pacientes vistos por el Servicio de Neurología del Hospital General de Castellón entre 2009 y 2013, a los que se les determinó la presencia de BOC en el laboratorio. Se revisará en la historia de cada paciente, además de los resultados del análisis de BOC, el resto de pruebas realizadas para llegar al diagnóstico de EM, y se compararán con los criterios de McDonald teniendo en cuenta las siguientes variables: 1. Ataque clínico (recidiva, exacerbación) 2. Lesiones por resonancia magnética nuclear 3. Examen neurológico 4. Potenciales evocados visuales 5. Diseminación temporal 6. Diseminación espacial.

PALABRAS CLAVE

Bandas Oligoclonales (BOC), Esclerosis Múltiple (EM), Diagnóstico, Protocolo, Criterios McDonald.

2. **ABSTRACT**

Multiple Sclerosis (MS) is a demyelinating chronic disease that affects the nervous central system, in which the laboratory has an important role in the diagnosis by determining oligoclonal bands (OCB) on cerebro-spinal fluid.

The objective of this study is to determine the prevalence of OCB in patients submitted from the Neurology department and to calculate the sensitivity and specificity of the technique used in our laboratory as an internal validation. This will be the starting point to make a revision of the actual procedure of diagnosis for the implementation of a diagnostic protocol of MS in our Hospital.

Retrospectively, we will revise the medical histories of all the patients to which OCB were determined in the laboratory, that were sent by the neurology department of our hospital between 2009 and 2013. We will review apart from the results of the OCB, the rest of testings done to reach the diagnosis of MS and they will be compared with McDonald Criteria having in consideration: 1. Clinical episode (relapse) 2. Magnetic resonance imaging 3. Neurological test 4. Evoked potentials 5. Dissemination in space 6. Dissemination in time.

KEY WORDS

Oligoclonal Bands (OCB), Multiple Sclerosis (MS), Diagnosis, Protocol, McDonald Criteria.

3. INTRODUCCIÓN

La esclerosis múltiple es una enfermedad desmielinizante crónica que afecta al Sistema Nervioso Central (SNC), cuya característica principal es la destrucción selectiva de la mielina, mediada por procesos inmunológicos, que se manifiesta morfológicamente por lesiones inflamatorias focales (placas) y por desmielinización¹. Cursa con brotes, episodios con síntomas neurológicos de más de 24 horas de duración, separados por periodos de remisión de al menos un mes entre ambos². Es una enfermedad con mayor prevalencia en mujeres, predominantemente entre 20 y 40 años. Es la enfermedad neurológica incapacitante mas frecuente en adultos jóvenes¹.

El diagnóstico se basa principalmente en la clínica, y esta es bastante heterogénea, por lo que un diagnóstico temprano y preciso es complicado¹. En consecuencia es necesario el uso de pruebas complementarias tales como la resonancia magnética, los potenciales evocados y el análisis del LCR y suero para demostrar la presencia de BOC². La resonancia magnética es la prueba complementaria más utilizada para establecer los criterios de McDonald, que se basan principalmente en demostrar eventos separados en el tiempo (DIT) y en el espacio (DIS) mediante resonancia magnética nuclear³.

Sin embargo, la presencia de BOC en LCR de estos pacientes sigue siendo la alteración inmunológica más frecuente y uno de los datos de mayor utilidad diagnóstica. A lo largo de los años se han utilizado diversas metodologías con diferente sensibilidad y especificidad para la detección de BOC en LCR⁴. En concreto, en nuestro laboratorio aplicamos el isoelectroenfoque en gel de agarosa con inmunotinción, que es la técnica mas recomendada en la actualidad⁵. La determinación de BOC de IgG fueron el primer biomarcador descrito en EM y están presentes en mas del 95% de pacientes¹. Sin embargo, es una técnica a veces poco específica debido a la dificultad del diagnóstico diferencial con otras patologías (inflamatorias, autoinmunes e infecciosas)⁴. Por este

motivo es muy importante hacer una validación interna de la técnica utilizada en cada laboratorio.

Es importante resaltar que la prevalencia de BOC puede variar entre diferentes poblaciones. Dicha prevalencia es mucho más alta en países de elevada latitud y va disminuyendo a medida que se acerca al ecuador. En poblaciones del norte de Europa las BOC alcanzan una prevalencia del 95-97%⁴. En la actualidad, no conocemos la prevalencia de BOC en pacientes afectados de EM en la población de Castellón de la Plana.

Debido a las dificultades descritas anteriormente para realizar un diagnóstico exacto y temprano, la implementación de criterios diagnósticos es de gran ayuda en la práctica neurológica cotidiana. Los criterios de McDonald son los más utilizados para el diagnóstico de EM⁶ y estos incluyen la determinación de BOC en el LCR. Con la implementación de un protocolo para el diagnóstico de esclerosis se pretende unificar criterios para la solicitud de BOC en LCR solo en pacientes con sospecha de EM.

4. **OBJETIVOS**

Los objetivos del presente trabajo son:

1. Determinar la prevalencia de BOC en pacientes con esclerosis múltiple para nuestra población de Castellón.
2. Conocer la sensibilidad y especificidad de la técnica de isoelectroenfoque en gel de agarosa con inmunotinción usada en nuestro hospital.
3. Revisar el actual procedimiento de diagnóstico llevado a cabo por el servicio de neurología del Hospital de Castellón.
4. Implementación de un protocolo de diagnóstico de esclerosis múltiple en el Hospital de Castellón.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

● DISEÑO

Estudio transversal retrospectivo donde se revisarán las historias clínicas de todos los pacientes vistos por el Servicio de Neurología del Hospital General de Castellón a los que se les determinó la presencia de BOC entre 2009 y 2013 (n =410). Estos pacientes se dividirán en tres grupos:

1. Pacientes con Esclerosis Múltiple clínicamente definida (casos) = EMCD
2. Pacientes diagnosticados con enfermedades inflamatorias, autoinmunes o infecciosas = CONTROLES1.
3. Resto de pacientes diagnosticados con enfermedades no autoinmunes, no inflamatorias ni infecciosas = CONTROLES 2.

Calcularemos la prevalencia de pacientes con EMCD que tengan BOC positivas de la siguiente manera:

$$\text{Prevalencia (\%)} = \frac{\text{Pacientes EMCD + BOC positivos}}{\text{Todos los pacientes con BOC}}$$

La sensibilidad y especificidad de la técnica la vamos a calcular con respecto a los pacientes considerados como control 1 y respecto a los pacientes considerados control 2, y así definimos:

- Verdadero positivo (VP): BOC positivas y diagnóstico de EM.
- Verdadero negativo (VN): BOC negativas y diagnóstico de enfermedad inflamatoria, autoinmune o infecciosa (Control 1)/Resto de pacientes (Control 2).
- Falso positivo (FP): pacientes con BOC positivas y diagnóstico de enfermedad inflamatoria, autoinmune o infecciosa/Resto de pacientes (Control 2).

- Falso negativo (FN): BOC negativo y diagnóstico de EM

La sensibilidad se calculará según la fórmula $S = VP/(VP + FN)$ y la especificidad según la fórmula $E = VN/(VN + FP)$.

Como segunda parte del trabajo, se recogerán los resultados obtenidos de BOC de cada paciente, a la par que se revisaran también las historias, y para ello se recogerán los datos de las variables: **1.** Ataque clínico (recidiva, exacerbación) **2.** Lesiones (resonancia magnética nuclear) **3.** Examen neurológico **4.** Potenciales evocados visuales **5.** Diseminación temporal **6.** Diseminación espacial, para establecer los criterios diagnósticos que se siguieron para llegar al diagnóstico definitivo y poder así compararlos con los criterios de McDonalds⁷ que se recogen en la tabla 1.

Los criterios de McDonald permiten el diagnóstico basado en la presentación clínica, sólo si hay evidencia clínica de que al menos dos lesiones puedan ser identificadas. La definición de un ataque o brote es generalmente aceptado como el desarrollo de síntomas neurológicos, probablemente causados por una lesión desmielinizante inflamatoria, que duran al menos 24 horas y que son comprobables objetivamente⁷.

Dado que en etapas precoces de la enfermedad muchos pacientes no cumplen con estos criterios clínicos, los criterios de McDonald permiten la ayuda de test auxiliares, como la resonancia magnética, el estudio de líquido cefalorraquídeo y los potenciales evocados visuales. Si los criterios indicados se cumplen y no hay una mejor explicación para el cuadro clínico, el diagnóstico es esclerosis múltiple. Si hay sospecha, pero los criterios no se cumplen del todo, el diagnóstico es “posible” esclerosis múltiple. Si aparece otro diagnóstico que pueda explicar mejor el cuadro clínico, el diagnóstico no es esclerosis múltiple.

<u>PRESENTACIÓN CLÍNICA</u>	<u>DATOS ADICIONALES PARA EL DIAGNÓSTICO DE EM</u>
<p>1. Dos o más ataques (brotes) Dos o más lesiones</p>	
<p>2. Dos o más ataques (brotes) Evidencia clínica objetiva de una lesión</p>	Diseminación en el espacio demostrado por: - dos o más lesiones por RM consistentes con EM - LCR (+) ó - esperar otro ataque en un sitio diferente
<p>3. Un ataque (brote) con evidencia clínica objetiva de dos o más lesiones</p>	Diseminación en el tiempo demostrado por: - RM - segundo ataque clínico
<p>4. Un ataque (brote) Evidencia clínica objetiva de una lesión (presencia monosintomática o síndrome clínico aislado) Diseminación en el espacio demostrado por: - dos o más lesiones por RM consistentes con EM - LCR (+) = presencia de bandas oligoclonales, o elevación del índice de inmunoglobulina y Diseminación</p>	Diseminación en el espacio demostrado por: - dos o más lesiones por RM consistentes con EM - LCR (+) y Diseminación en el tiempo por: - RM - segundo ataque clínico

Tabla 1. Criterios diagnósticos de McDonald para esclerosis múltiple, año 2005⁸

- **ÁMBITO**

Servicio de Neurología y Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital General de Castellón donde se deriva el estudio de pacientes procedentes de planta, de consultas externas y atención primaria pertenecientes al área de Castellón.

- **SUJETOS DEL ESTUDIO**

Pacientes de ambos sexos y de todas las edades procedentes del Servicio de Neurología a los que se les determinó las BOC en suero y LCR entre enero del 2009 y diciembre del 2013.

- **TAMAÑO MUESTRAL**

El Servicio de Análisis del Hospital General de Castellón informó **410** BOC desde enero 2009 hasta diciembre 2013. Por estimaciones en estudios previos se ha visto que la prevalencia de BOC en pacientes con EM varía desde un 60% hasta un 97% (en España un 87%) según la población y la técnica estudiada. Por lo que si esperamos obtener un 90% de BOC en pacientes con EM con una precisión del 3% y con un nivel de confianza del 95% necesitaríamos incluir en nuestro estudio 385 pacientes. Teniendo en cuenta las pérdidas incluiremos el total de 410 pacientes registrados en nuestra base de datos del hospital.

- **VARIABLES DEL ESTUDIO**

Objetivo 1: Prevalencia de BOC

1. Pacientes VP (verdadero positivo): BOC positivas y diagnóstico de EM.
2. Total de pacientes incluidos en el estudio a los que se determinó la presencia de BOC.

Objetivo 2: Sensibilidad y especificidad

3. Pacientes VN (verdadero negativo): BOC negativas y diagnóstico de enfermedad inflamatoria, autoinmune o infecciosa (Control 1)/Resto de pacientes (Control 2).
4. Pacientes FP (falso positivo): pacientes con BOC positivas y diagnóstico de enfermedad inflamatoria, autoinmune o infecciosa (Control 1)/Resto de pacientes (Control 2).
5. Pacientes FN (falso negativo): BOC negativo y diagnóstico de EM
6. Sensibilidad: $S = VP/(VP + FN)$: probabilidad de que la prueba resulte positiva cuando la enfermedad está presente.
7. Especificidad: $E = VN/(VN + FP)$: probabilidad de que la prueba resulte negativa cuando la enfermedad no está presente.

Objetivo 3: Revisión protocolo para adecuación e implementación de un nuevo protocolo mas acorde a los criterios de McDonald.

8. Ataque clínico (recaída o exacerbación): alteraciones neurológicas típicas de una inflamación aguda desmielinizante del SNC informada por el paciente u observada por el médico, de al menos 24 horas de duración, ausencia de fiebre o infección.
Corroborado por los resultados del examen neurológico, potenciales evocados visuales o RMN consistente al área que refiere el paciente.
9. Lesiones desmielinizantes por RMN.
10. Examen neurológico: evaluación de las capacidades motoras y sensoriales, el equilibrio y la coordinación, el estado mental y los reflejos.
11. Potenciales evocados visuales: técnica que registra las respuestas cerebrales provocadas por estímulos visuales.
12. Diseminación temporal: demostración por RMN con contraste de eventos separados en el tiempo.
13. Diseminación espacial: demostración por RMN con contraste de eventos separados en el espacio.

● RECOGIDA Y ANÁLISIS DE DATOS

Para la recogida de datos de los 410 pacientes, en primer lugar sacaremos una lista de todos los pacientes a los que se determinó las BOC entre enero de 2009 y diciembre 2013 mediante el programa informático GestLab utilizado en nuestro laboratorio. Los pacientes estudiados proceden del Hospital General de Castellón y su área de referencia, y todas las punciones lumbares fueron realizadas en dicho hospital.

El protocolo del laboratorio ante la petición de BOC incluye:

- Cálculo del *Índice de Link* o de IgG, que relaciona las concentraciones de las distintas proteínas del LCR y suero y se expresa mediante la siguiente fórmula:
$$\text{Índice de Link} = \frac{\text{IgG (LCR)} \times \text{Alb (s)}}{\text{IgG (s)} \times \text{Alb (LCR)}}$$
La albúmina y la IgG séricas se cuantifican por turbidimetría, en un analizador Olympus AU-2700 de Beckman Coulter y las del LCR por nefelometría cinética en un analizador BN ProSpec de Dade Behring.
- Las BOC de IgG se determinan simultáneamente en LCR y suero por isoelectroenfoque, que consiste en la separación de las inmunoglobulinas por sus diferentes cargas o puntos isoeléctricos. Se utiliza un gel de agarosa, al que se le provoca un gradiente de pH. Las bandas de IgG se visualizan enfrentándolas a anticuerpos específicos IgG (anti-IgG) marcados con enzima.

El resultado de las BOC se informan como:

Patrón 1: No se observan BOC ni en suero ni en LCR. Patrón negativo.

Patrón 2: BOC positivas en LCR y no en suero. Patrón positivo.

Patrón 3: BOC en LCR y suero más dos o más bandas en LCR. Patrón positivo.

Patrón 4: BOC en LCR y suero. Patrón espejo.

Patrón 5: Patrón de paraproteína. Una única banda. Mieloma múltiple.

Para este estudio englobamos el patrón 2 y 3 en **Grupo 1 = BOC positivas** y los patrones 1, 4 y 5 como **Grupo 2 = BOC negativo**. También se anotarán los datos del índice de Link.

A partir de estos resultados se calculará la prevalencia para cada subgrupo (EMCD, CONTROL 1, CONTROL 2) de pacientes.

	EMCD	CONTROL 1	CONTROL 2
GRUPO 1 (BOC +)			
GRUPO 2 (BOC -)			
PREVALENCIA			

Tabla 2. Prevalencia obtenida en cada subgrupo diagnóstico.

A continuación, para calcular la sensibilidad y especificidad de la técnica, se considerará como grupo de CASOS al grupo de EMCD y como grupo CONTROL a los grupos CONTROL 1 y 2.

	CASOS	CONTROLES
GRUPO 1 (BOC +)		
GRUPO 2 (BOC -)		

Tabla 3. Cálculo de sensibilidad y especificidad

La sensibilidad se calculará según la fórmula $S = VP/(VP + FN)$ y la especificidad según la formula $E = VN/(VN + FP)$.

Para la segunda parte del estudio, que consiste en revisar los criterios y procedimiento seguido por el Servicio de Neurología para llegar al diagnóstico de EM, se obtendrán las historias clínicas de todos los pacientes de la lista obtenida del Servicio de Documentación del Hospital, y se revisarán las distintas pruebas realizadas a los

pacientes en una tabla en la que se anotará si se le ha realizado la prueba y si ha dado positivo o negativo. Si no se ha realizado dicha prueba se deja en blanco.

	NUMERO DE PACIENTE	POSITIVO	NEGATIVO
SINTOMAS NEUROLOGICOS			
RMN (NUMERO DE LESIONES)			
POTENCIALES EVOCADOS VISUALES			
ATAQUE CLÍNICO (FECHA Y DURACIÓN)			
DISEMINACIÓN TEMPORAL			
DISEMINACIÓN ESPACIAL			

Tabla 4. Pruebas diagnósticas realizadas por paciente.

En función de los resultados obtenidos de la técnica de determinación de BOC y de los pasos seguidos para el diagnóstico (utilizando como herramienta la tabla con los criterios de McDonald), se procederá al análisis de resultados para determinar los pasos

a seguir y el orden de las pruebas a realizar para redactar un protocolo de diagnóstico de EM a seguir por el Servicio de Neurología y Servicio de Análisis Clínicos del Hospital General de Castellón.

● DIFICULTADES Y LIMITACIONES

Entre las limitaciones que nos podemos encontrar a la hora de realizar el estudio es la presencia de historias clínicas/peticiones incompletas. Por ejemplo, es muy importante que el suero y el LCR del paciente se extrajeran el mismo día para realizar el análisis simultáneo.

Otra limitación son los casos de peticiones de determinación de BOC que proceden de otros servicios diferentes al Servicio de Neurología del Hospital de Castellón.

6. CALENDARIO DE TRABAJO

El periodo previsto para la realización del estudio será de 12 meses, dividido en varias fases:

1. Inicio del proyecto de investigación: Abril 2015- Junio 2015, elaboración del protocolo de investigación.
2. Complimentación del informe CEIC: Junio 2015- Septiembre 2015, se completará el informe, seguido de su evaluación y aprobación por el CEIC del Hospital General de Castellón.
3. Recogida de datos: Septiembre 2015-Diciembre 2015: revisión de historias clínicas de los pacientes incluidos en la lista de todos los pacientes a los que se determinó las BOC entre enero de 2009 y diciembre 2013, recogida de datos e introducción de los mismos en la base de datos.
4. Interpretación de resultados: Enero 2016-Abril 2016, interpretación de los resultados y la preparación para la elaboración del **Protocolo de diagnóstico de**

esclerosis múltiple en colaboración con el Servicio de Neurología del Hospital General de Castellón. Publicación del informe final.

7. ASPECTOS ÉTICOS

El estudio será sometido a la consideración del Comité Ético de investigación Clínica del Hospital General de Castellón. En este estudio se realizará siguiendo los principios de la Declaración de Helsinki (Seúl, 2008), las normas de buena práctica clínica mediante las cuales se asegura que el diseño, realización y comunicación de los datos son fiables, y que se protegen los derechos e integridad de los sujetos participantes manteniéndose la confidencialidad de sus datos.

Protección de datos del sujeto participante: los datos del estudio se almacenarán en una base de datos informatizada, manteniendo la confidencialidad según establece la legislación nacional vigente Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal y ley 41/2002, de 14 de noviembre. En esta base de datos los sujetos se identificarán sólo por las iniciales o número de historia del paciente. Sólo pueden tener acceso a parte del historial médico hospitalario o datos registrados relevantes los representantes autorizados del Hospital General de Castellón.

8. EQUIPO INVESTIGADOR Y DISTRIBUCIÓN DE TAREAS

Investigador principal: Teresa Martínez Gaspar (Farmacéutica residente de Análisis Clínicos en el Servicio de Análisis Clínicos del Hospital General de Castellón). Se encargará de la recogida de datos, de su posterior análisis de resultados y de la elaboración de comunicaciones y posterior publicación. También colaborará en la elaboración de un Protocolo de diagnóstico de esclerosis múltiple junto con el facultativo responsable de la unidad de EM del Servicio de Neurología del Hospital General de Castellón.

9. PRESUPUESTO

La realización del presente trabajo genera un coste 0 ya que lo llevaré a cabo de manera voluntaria. Tampoco habrá gasto adicional de material de laboratorio o informático.

10. BIBLIOGRAFÍA

¹ Fernandez O, Arroyo-Gonzalez R, Rodriguez-Antiguedad J, Garcia-Marino J Cambolla M, Villar L, et al. Biomarcadores en esclerosis múltiple. Rev Neurol. 2013;56(7):375-390.

² Sanz Diaz C.T, Pérez Hernandez L.M, Hernández Pérez M.A, González-Plata M. Implementación y revisión del protocolo para el diagnóstico de la esclerosis múltiple en nuestro hospital. An Clin 2006;31(4):101-06.

³ Polman C, Reingold S, Banwell B, Clanet M, Cohen J, Filippi M, et al. Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald Criteria. Ann Neurol. 2011;69:292-02

⁴ Falip M, Tintoré M, Jardí R, Duran I, Link H, Montalban X. Utilidad de las Bandas Oligoclonales. Rev Neurol 2001;32(12):1120-1124.

⁵ Polman C, Reingold S, Benwell B, Clanet M, Cohen J, Filippi M et al. Diagnostic for Multiple Sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald Criteria. Ann Neurol 2011;69:292-302.

⁶ Kostulas V, Link H, Lefvert AK. Oligoclonal IgG bands in cerebrospinal fluid. Principles for demonstration and interpretation based on findings in 1114 neurological patients. Arch Neurol 1987; 44: 10414.

⁷Palace, J et al. Guidelines for differential diagnosis of suspected Multiple Sclerosis. *Nat Clin Pract Neurol*. 2009; 5(3):134-5.

⁸Polman, CH, Reingold, SC, Edan, G et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the “McDonald Criteria”. *Ann Neurol*. 2005; **58**: 840–846.

