



**Utilidad de las Cadenas Ligeras Libres en
Líquido Cefalorraquídeo como
biomarcador de conversión a Esclerosis
Múltiple Clínicamente Definida**

**Tesis Doctoral de:
Paloma Menéndez Valladares**

Directoras:
María Isabel García Sánchez
Carmen Bermudo Guitarte

Universidad de Sevilla
Facultad de Medicina
Departamento de Bioquímica Médica y
Biología Molecular e Inmunología

Sevilla 2017

TESIS DOCTORAL

Utilidad de las cadenas ligeras libres en líquido cefalorraquídeo como biomarcador de conversión a Esclerosis Múltiple Clínicamente Definida

Trabajo realizado por la Licenciada Paloma Menéndez Valladares para optar al grado de Doctor en Bioquímica por la Universidad de Sevilla

Directoras de tesis

Dra. María Isabel García Sánchez

Dra. Carmen Bermudo Guitarte

Tutor de tesis

Dr. Víctor Sánchez Margalet

Universidad de Sevilla

Facultad de Medicina

Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular e Inmunología

Programa de Doctorado de Biología Molecular, Biomedicina e Investigación Clínica

Sevilla, 2017



Servicio Andaluz de Salud
CONSEJERÍA DE SALUD



Doña María Isabel García Sánchez, Doctora en Ciencias Químicas y Coordinadora del Nodo Biobanco Hospitalario Virgen Macarena de Sevilla,

Certifica que:

Doña **Paloma Menéndez Valladares**, Licenciada en Química y en Bioquímica, y Especialista en Bioquímica Clínica, ha realizado el trabajo titulado: **“Utilidad de las cadenas ligeras libres en líquido cefalorraquídeo como biomarcador de conversión a Esclerosis Múltiple Clínicamente Definida”**, en la Unidad de Gestión Clínica de Bioquímica Clínica del Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla, y en el Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular e Inmunología de la Facultad de Medicina, en la Universidad de Sevilla bajo mi dirección. Considero que dicho trabajo reúne los méritos suficientes para ser sometido a juicio del tribunal correspondiente en la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla para optar al grado de Doctora.

Y para que conste, firmo el presente certificado, en Sevilla a 28 de Junio de 2017.

Fdo.: María Isabel García Sánchez



Servicio Andaluz de Salud
CONSEJERÍA DE SALUD



Doña Carmen Bermudo Guitarte, Doctora en Medicina y Jefa de Sección en la Unidad de Gestión Clínica de Bioquímica Clínica del Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla,

Certifica que:

Doña **Paloma Menéndez Valladares**, Licenciada en Química y en Bioquímica, y Especialista en Bioquímica Clínica, ha realizado el trabajo titulado: **“Utilidad de las cadenas ligeras libres en líquido cefalorraquídeo como biomarcador de conversión a Esclerosis Múltiple Clínicamente Definida”**, en la Unidad de Gestión Clínica de Bioquímica Clínica del Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla, y en el Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular e Inmunología de la Facultad de Medicina, en la Universidad de Sevilla bajo mi dirección. Considero que dicho trabajo reúne los méritos suficientes para ser sometido a juicio del tribunal correspondiente en la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla para optar al grado de Doctora.

Y para que conste, firmo el presente certificado, en Sevilla a 28 de Junio de 2017.

Fdo.: Carmen Bermudo Guitarte



Servicio Andaluz de Salud
CONSEJERÍA DE SALUD



Don Víctor Sánchez Margalet, Doctor en Medicina, Catedrático del Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular e Inmunología de la Universidad de Sevilla, y Facultativo Especialista en Área de Bioquímica Clínica del Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla,

Certifica que:

Doña **Paloma Menéndez Valladares**, Licenciada en Química y en Bioquímica, y Especialista en Bioquímica Clínica, ha realizado el trabajo titulado: **“Utilidad de las cadenas ligeras libres en líquido cefalorraquídeo como biomarcador de conversión a Esclerosis Múltiple Clínicamente Definida”**, en la Unidad de Gestión Clínica de Bioquímica Clínica del Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla, y en el Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular e Inmunología de la Facultad de Medicina, en la Universidad de Sevilla bajo mi tutela. Considero que dicho trabajo reúne los méritos suficientes para ser sometido a juicio del tribunal correspondiente en la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla para optar al grado de Doctora.

Y para que conste, firmo el presente certificado, en Sevilla a 28 de Junio de 2017.

Fdo.: Víctor Sánchez Margalet

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar un trabajo tan arduo y lleno de dificultades como es la realización de una tesis doctoral es inevitable agradecer a todas aquellas personas e instituciones que de una manera u otra han contribuido al buen desarrollo de la misma para llegar a un feliz término.

En primer lugar, debo agradecer de manera especial y sincera a las Doctoras María Isabel García Sánchez y Carmen Bermudo Guitarte todo el apoyo y confianza depositados en mí para el desarrollo de este proyecto, por todas las enseñanzas y consejos tanto a nivel profesional como personal, por enseñarme a trabajar con rigurosidad, clave del buen trabajo que hemos realizado juntas. Les agradezco su disponibilidad y paciencia, así como los medios que me han facilitado para llevar a cabo las actividades propuestas, todo ello ha supuesto un aporte invaluable en mi formación como investigadora.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Doctor Víctor Sánchez Margalet por su importante aporte en mis inicios en la investigación con el estudio realizado para el trabajo fin de máster, por su capacidad de transmitir conocimiento y por las labores de tutor de este trabajo de investigación.

Agradecer a la Doctora Patricia Fernández Riejos toda la confianza y apoyo proporcionados al comienzo de mi actividad investigadora como residente de Bioquímica Clínica, por su ayuda en el trabajo fin de máster y en la publicación de mi primer artículo científico.

A la doctora Concha González por su interés y apoyo a los residentes, y transmitirme el sentido de responsabilidad y disciplina durante mi formación como residente.

A todos los facultativos de la Unidad de Bioquímica Clínica, por enseñarme y transmitirme sus conocimientos, Katy, Flori, Antonio Pérez, Antonio Barco, Pilar, Tere, y Cristina.

A mis compañeros durante mi formación como residente de Bioquímica Clínica, por su acogida a mi llegada al hospital y consejos, a Vicky, Enrique, Rufino y Mercedes. A mis

compañeros residentes por su compañía y ayuda durante estos años, a Isa, Gracia, Jose, María y Jose María.

Agradecer a las técnicas del Biobanco el trato y ayuda recibidas, su disponibilidad para proporcionarme las muestras necesarias, a Myriam, Sara, Pastora y Verónica.

A los técnicos del laboratorio durante mi formación como residente en Bioquímica Clínica, por la ayuda prestada y por haber hecho más llevadero el trabajo y las guardias.

Al Servicio de Neurología del Hospital Virgen Macarena por la selección y recolección de muestras, en especial al Doctor Guillermo Izquierdo por su implicación y entusiasmo en los proyectos relacionados con la Esclerosis Múltiple. Agradecer a todos los pacientes, sin los cuales no habría sido posible este estudio.

A aquellas personas que se me han olvidado, y que merecen mi agradecimiento.

A mis padres, mi hermano y resto de familia por apoyarme en todo momento.

A Mon, por ser mi apoyo incondicional y por haberme acompañado desde Asturias a esta ciudad maravillosa, Sevilla, en la que ha nacido lo más importante de nuestras vidas, Izan.

ÍNDICES

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	6
Aspectos históricos.....	7
Definición de la esclerosis múltiple.....	8
Fisiopatología.....	11
Clínica.....	15
Diagnóstico.....	21
Diagnóstico diferencial.....	28
Tratamiento.....	29
Tratamiento sintomático de la EM.....	30
Tratamiento de la EM.....	31
Componente inmunológico.....	37
Papel del laboratorio en el diagnóstico de la esclerosis múltiple.....	45
Método cualitativo para determinación de síntesis intratecal de IgG....	48
Método cuantitativo para determinación de síntesis intratecal de IgG..	51
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	62
DISEÑO Y METODOLOGÍA.....	65
Selección de muestras.....	66
Estudio piloto.....	66

Ampliación del estudio.....	68
Obtención, procesamiento y almacenamiento de las muestras.....	69
Parámetros de laboratorio.....	70
Cuantificación de cadenas ligeras libres en LCR y en suero	
Nefelometría.....	70
Turbidimetría.....	80
Determinaciones previas al estudio	
Determinación de bandas oligoclonales.....	86
Determinación del Índice de IgG (Índice de Tibbling).....	87
Parámetros clínicos.....	87
Resonancia magnética.....	87
Escala Expandida del Estado de Discapacidad (EDSS).....	88
Estadística.....	88
RESULTADOS.....	91
Estudio piloto.....	92
Primera búsqueda de un punto de corte de conversión de SNA a EM.....	99
Segunda búsqueda de un punto de corte de conversión de SNA a EM...	104
Tercera búsqueda de un punto de corte de conversión de SNA a EM....	108
Correlación del índice kappa con el estadio EDSS.....	115
Correlación del índice kappa con otros parámetros estudiados.....	118
Correlación del índice kappa con el tratamiento del paciente.....	121
Estudio de validación del índice kappa.....	123
Utilidad clínica del índice kappa.....	127

DISCUSIÓN.....	130
Características de los pacientes.....	132
Evaluación de las CLL kappa y lambda en LCR, y sus respectivos índices.....	134
Correlación del índice kappa con el estadio EDSS.....	147
Correlación del índice kappa con otros parámetros estudiados.....	148
Correlación del índice kappa con el tratamiento del paciente.....	148
Validación del índice kappa.....	149
Utilidad clínica del índice kappa.....	150
Consideraciones finales y perspectivas futuras.....	151
 CONCLUSIONES.....	 153
 BIBLIOGRAFÍA.....	 156
 ANEXOS.....	 173
ANEXO 1. Formulario de información y consentimiento informado escrito para donación de muestras biológicas al biobanco para investigación biomédica.....	174
ANEXO 2. Documento de aprobación del “Comité de Ética de la Investigación de Centro Hospital Universitario Virgen Macarena”	185
ANEXO 3. Documento de aprobación del “Comité de Ética de la Investigación de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena y Virgen del Rocío”	188
ANEXO 4.	
Artículos publicados.....	193
Comunicaciones a congresos.....	195
Otros méritos.....	197

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de prevalencias por país (2013)

Figura 2. Incidencia de EM en hombres y en mujeres en un periodo de 20 años en el distrito norte de Sevilla

Figura 3. Incidencia de EM en hombres y en mujeres en incrementos de 5 años durante un periodo de 20 años en el distrito norte de Sevilla

Figura 4. Diferencia entre un axón en una neurona normal y el de un paciente con EM

Figura 5. Esquema de la conducción nerviosa en una fibra nerviosa

Figura 6. Patrones de evolución de la EM

Figura 7. Principales síntomas presentes en la EM

Figura 8. Escala de discapacidad de Kurtzke (EDSS)

Figura 9. Algoritmo de tratamiento en pacientes con EMRR

Figura 10. Eficacia y seguridad de los fármacos empleados en EM

Figura 11. Mecanismo de actuación de los LT en la patogénesis de la EM

Figura 12. Estructura de una Ig

Figura 13. Estructura de una Ig y de las CLL κ y λ

Figura 14. Construcción de cadenas ligeras

Figura 15. Producción de CLL

Figura 16. Mecanismo físico del isoelectroenfoque

Figura 17. Patrones de bandas BOCG

Figura 18. Fórmula descrita por Tourtellotte

Figura 19. Reibergrama

Figura 20. Reibergrama, resultados obtenidos en 2 pacientes, un sujeto sano y uno con EM

Figura 21. Reibergrama para IgG

Figura 22. Esquema de un detector turbidimétrico y de un nefelómetro

Figura 23. Mecanismo de las técnicas nefelométricas

Figura 24. Representación gráfica de la curva de calibración obtenida para la determinación de los valores de CLL κ en el BNII™

Figura 25. Representación gráfica de la curva de calibración obtenida para la determinación de los valores de CLL λ en el BNII™

Figura 26. Gráfico de Levey-Jennings para los controles QC1 (nivel bajo) de CLL κ en el BNII™

Figura 27. Gráfico de Levey-Jennings para los controles QC2 (nivel alto) de CLL κ en el BNII™

Figura 28. Gráfico de Levey-Jennings para los controles QC1 (nivel bajo) de CLL λ en el BNII™

Figura 29. Gráfico de Levey-Jennings para los controles QC2 (nivel alto) de CLL λ en el BNII™

Figura 30. Representación gráfica de la curva de calibración obtenida para la determinación de los valores de CLL κ en el SpaPlus®

Figura 31. Gráfico de Levey-Jennings para los controles QC1 (nivel bajo) de CLL κ en el SpaPlus®

Figura 32. Gráfico de Levey-Jennings para los controles QC2 (nivel alto) de CLL κ en el SpaPlus®

Figura 33. Diagrama de cajas para las CLL kappa en LCR

Figura 34. Diagrama de cajas para las CLL lambda en LCR

Figura 35. Diagrama de cajas para el índice kappa

Figura 36. Diagrama de cajas para el índice lambda

Figura 37. Representación de las medianas del índice kappa y del índice lambda

Figura 38. Histograma para las CLL kappa en LCR

Figura 39. Histograma para las CLL kappa en LCR del grupo control con HN

Figura 40. Representación de la curva de supervivencia mediante el análisis Kaplan-Meier de los pacientes con Síndrome Neurológicamente Aislado

Figura 41. Comparación de curvas ROC para el índice IgG, CLL κ en LCR, y CLL λ en LCR

Figura 42. Comparación de curvas ROC para el índice kappa, y para el índice lambda

Figura 43. Representación de la curva de supervivencia mediante el análisis Kaplan-Meier de los pacientes con Síndrome Neurológicamente Aislado (índice kappa)

Figura 44. Representación de la curva de supervivencia mediante el análisis Kaplan-Meier de los pacientes con Síndrome Neurológicamente Aislado

Figura 45. Representación gráfica de los pacientes según el punto de corte del índice kappa de 10,62 frente a la escala de discapacidad EDSS

Figura 46. Diagrama de sectores de los pacientes según el punto de corte del índice kappa de 10,62 frente a la escala de discapacidad EDSS

Figura 47. Diagrama de cajas para el índice kappa según el momento de la punción lumbar

Figura 48. Diagrama de cajas para el índice kappa según el momento de la punción lumbar y la conversión a EM

Figura 49. Diagrama de cajas para el índice kappa según el tratamiento del paciente

Figura 50. Curva ROC para el índice kappa en el equipo SpaPlus®

Figura 51. Curva SROC

Figura 52. Representación forest plot de la sensibilidad

Figura 53. Representación forest plot de la especificidad

Figura 54. Representación forest plot de la odds ratio diagnóstica

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Criterios de Poser (1983)

Tabla 2. Criterios de McDonald 2001

Tabla 3. Evolución de los criterios de McDonald desde 2001 a 2010

Tabla 4. Fármacos empleados en el manejo de la diversa sintomatología de la EM

Tabla 5. Características de cada grupo de estudio: grupo control y grupo casos

Tabla 6. Características de cada grupo de estudio

Tabla 7. Datos obtenidos para la calibración de CLL κ en el BNII™

Tabla 8. Datos obtenidos para la calibración de CLL λ en el BNII™

Tabla 9. Datos obtenidos para los controles procesados en el equipo en el BNII™

Tabla 10. Rangos de medición para las CLL según la dilución de la muestra en el BNII™

Tabla 11. Estudio de precisión para CLL en suero para el equipo de medición BNII™ proporcionado por el fabricante

Tabla 12. Estudio de precisión para CLL en LCR para el equipo de medición BNII™ proporcionado por el fabricante

Tabla 13. Datos obtenidos para los controles procesados en el en el SpaPlus®

Tabla 14. Estudio de precisión para CLL en suero para el equipo de medición SpaPlus® proporcionado por el fabricante

Tabla 15. Estudio de precisión para CLL en LCR para el equipo de medición SpaPlus® proporcionado por el fabricante

Tabla 16. Características basales de los pacientes del estudio piloto

Tabla 17. Datos de laboratorio y clínicos para pacientes con síndrome neurológicamente aislado empleando un punto de corte para las CLL κ en LCR de 0,38 mg/L

Tabla 18. Datos extraídos del análisis de las curva ROC para las variables CLL κ y λ en LCR, y el índice IgG

Tabla 19. Datos de laboratorio y clínicos para pacientes con síndrome neurológicamente aislado empleando un punto de corte para las CLL κ en LCR de 0,73 mg/L

Tabla 20. Datos extraídos del análisis de las curva ROC para los índices kappa y lambda

Tabla 21. Datos de laboratorio y clínicos para pacientes con síndrome neurológicamente aislado empleando un punto de corte para el índice kappa de 10,62

Tabla 22. Datos de laboratorio y clínicos para pacientes con síndrome neurológicamente aislado empleando un punto de corte para el índice lambda de 1,77

Tabla 23. Análisis de las tablas de contingencia para BOCG y BTC; y análisis multivariante combinando BTC con BOCG, y BTC con el índice kappa

Tabla 24. Pacientes del estudio piloto agrupados de acuerdo al nivel de discapacidad según la escala EDSS

Tabla 25. Datos extraídos del análisis de las curva ROC para la variable índice kappa en el equipo SpaPlus®

Tabla 26. Datos de laboratorio y clínicos para pacientes con sospecha de síndrome neurológicamente aislado empleando un punto de corte para el índice kappa de 12,33

Tabla 27. Datos de laboratorio y clínicos para todos los pacientes estudiados empleando el punto de corte para el índice kappa de 12,33

Tabla 28. Edad y sexo de los pacientes con EM en aquellos artículos en los que se hace referencia al índice kappa

Tabla 29. Punto de corte para las CLL κ en LCR, sensibilidad y especificidad que predice conversión a Esclerosis Múltiple en los diferentes estudios publicados hasta la fecha

Tabla 30. Descripción de las características clínicas de los pacientes en aquellos artículos en los que se hace referencia al índice kappa en pacientes con sospecha de Esclerosis Múltiple

Tabla 31. Punto de corte para el índice kappa, sensibilidad y especificidad que predice conversión a Esclerosis Múltiple en los diferentes estudios publicados hasta la fecha

Tabla 32. Punto de corte para el índice lambda, sensibilidad y especificidad que predice conversión a Esclerosis Múltiple en los diferentes estudios publicados hasta la fecha

Tabla 33. Datos de la odds ratio diagnóstica

ABREVIATURAS

ABC: área bajo la curva

AEM: Agencia Europea del Medicamento

AQP4: Aquaporina-4

BBSSPA: Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía

BHE: Barrera Hematoencefálica

BOC: Bandas Oligoclonales

BOCG: Bandas Oligoclonales IgG

BTC: criterios de Barkhof-Tintoré

CLL: Cadenas Ligeras Libres

CLSI: Clinical & Laboratory Standards Institute

CPAs: Células Presentadoras de Antígeno

CV: Coeficiente de Variación

DLE: Difusión Lesiones en la materia blanca del cerebro en el Espacio

DLT: Difusión Lesiones en la materia blanca del cerebro en el Tiempo

DS: Desviación Estándar

EAE: Encefalomiелitis Autoinmune Experimental

EACA: ácido E-amino-n-caproico

ELA: Esclerosis Lateral Amiotrófica

EDSS: Expanded Disability Status Scale (Escala Expandida del Estado de Discapacidad)

EM: Esclerosis Múltiple

EMCD: Esclerosis Múltiple Clínicamente Definida

EMCP: Esclerosis Múltiple Clínicamente Probable

EMPP: EM Primaria Progresiva

EMPR: EM Progresiva Recurrente

EMSP: EM Secundaria Progresiva

EMRR: EM Remitente Recurrente

ENI: Enfermedades Neurológicas Inflammatorias

ENNI: Enfermedades Neurológicas No Inflammatorias

GAM: Glicoproteína Asociada a Mielina

GMO: Glicoproteína de Mielina de Oligodendrocitos

HN: Hidrocefalia Normotensiva

HSP: Heat Shock Proteins

IFE: Isoelectroenfoco

JCV: Virus de John Cunningham

LES: Lupus Eritematoso Sistémico

LMP: Leucoencefalopatía Multifocal Progresiva

LT: Linfocitos T

NCF: Nucleótido Cíclico Fosfodiesterasa

Nf: Neurofilamentos

NfH: Neurofilamentos de cadenas pesadas

NfL: Neurofilamentos de cadenas ligeras

NMO: Neuromielitis Óptica

PBM: Proteína Básica de Mielina

PE: Potenciales Evocados

PEO: Proteína Específica de Oligodendrocitos

PLP: Proteína Proteolipídica

Qalb: Cociente de Albúmina

QC: Control de Calidad

LCR: Líquido Cefalorraquídeo

RIA: Radioinmunoensayo

ROC: Receiver Operating Characteristic o Característica Operativa del Receptor (curva ROC)

RM: Resonancia Magnética

SNA: Síndrome Neurológicamente Aislado

SNC: Sistema Nervioso Central

VPN: Valor Predictivo Negativo

VPP: Valor Predictivo Positivo

RESUMEN

RESUMEN

La Esclerosis Múltiple (EM) es la enfermedad crónica inflamatoria desmielinizante más común del sistema nervioso central (SNC). Es una de las principales causas de discapacidad neurológica en población adulta joven, entre 20-30 años de edad, que afecta al doble de mujeres respecto a los hombres. En todo el mundo hay alrededor de 2,5 millones de personas afectadas de EM (Compston A, 2002). Algunas personas estarán mínimamente afectadas a lo largo de su vida, mientras que otras degenerarán rápidamente hacia una incapacidad total. En la mayoría de los pacientes la EM se inicia con un primer brote o evento clínico (Polman CH, 2011). Los procesos fisiopatológicos incluidos en la EM pasan por la inflamación, desmielinización, daño axonal y mecanismos de reparación. Estos procesos no se presentan de manera uniforme en la población que padece EM, lo que contribuye a la heterogeneidad en la expresión fenotípica de la enfermedad así como a su diagnóstico y su respuesta a las distintas terapias (Fernández-Fernández O, 2002; Bielekova B, 2004). El diagnóstico de la EM es fundamentalmente clínico y se basa en la demostración de los síntomas y signos atribuibles a las lesiones en la materia blanca que se encuentran diseminadas en el tiempo y en el espacio.

El laboratorio ayuda al diagnóstico de la EM mediante el estudio del líquido cefalorraquídeo (LCR). En algunos casos, el estudio del LCR junto con la RM, permite identificar pacientes que presentan una alta probabilidad de conversión a EM después de un primer brote o Síndrome Neurológicamente Aislado (SNA), sobretodo en aquellos casos con clínica de inicio dudosa. El estudio del LCR para analizar la síntesis intratecal de IgG, mediante la obtención del índice IgG y de las Bandas Oligoclonales IgG (BOCG) se emplea como apoyo al diagnóstico de la EM (Stangel M, 2013).

Las BOCG en LCR se han encontrado en el 87,7% de los pacientes con EM, siendo demostrado en la bibliografía que los pacientes con EM que presentan BOCG negativas son minoritarios (Alvarez-Cermeno JC, 2013). En nuestro hospital este porcentaje es mayor, presentando BOCG en LCR un 96,5% de los pacientes con EM

(Menéndez-Valladares P, 2015). En individuos sanos, las cadenas ligeras son producidas en exceso respecto a las cadenas pesadas. Los niveles de cadenas ligeras sin unir, Cadenas Ligeras Libres (CLL), tanto en suero como en LCR son bajos. En condiciones patológicas la producción de CLL está aumentada, lo que ocurre en ciertas enfermedades inflamatorias como la EM (Kaplan B, 2011). Varios estudios han demostrado que los niveles elevados de CLL κ en LCR mediante cuantificación por nefelometría, apoyan el diagnóstico de EM (Villar LM, 2012; Duranti F, 2013; Hassan-Smith G, 2014; Presslauer S, 2015; Menéndez-Valladares P, 2015). También se ha visto que niveles elevados de CLL κ en LCR predicen la conversión a EM de pacientes con SNA a EM (Villar LM, 2012; Hassan-Smith G, 2014; Menéndez-Valladares P, 2015). Villar et al. demostraron que niveles elevados de CLL κ en LCR elevados (CLL κ > 0,53 mg/L) predicen con buena exactitud la conversión de SNA a EM Clínicamente Definida (EMCD). Puntos de corte más elevados resultaron de los estudios realizados en nuestro hospital, 0,73 mg/L (dato no mostrado, Menéndez-Valladares P, 2015), y del estudio de Hassan-Smith et al., 0,87 mg/L.

La determinación del índice kappa mediante la siguiente ecuación: $(\text{CLL } \kappa \text{ en LCR} / \text{CLL } \kappa \text{ en suero}) / (\text{albúmina en LCR} / \text{albúmina en suero})$, considera la rotura de la barrera hematoencefálica, incrementando la precisión del diagnóstico de EM y disminuyendo los falsos positivos (Duranti F, 2013). En estudios recientes se ha visto que niveles elevados de índice kappa (índice kappa > 10,62) predicen la conversión de SNA a EM con una especificidad del 95,7% y una sensibilidad del 93,1%. También se ha determinado que aquellos pacientes con SNA con índice kappa > 10,62 tienen una probabilidad de conversión a EM mayor que los pacientes con un índice kappa inferior (HR=7,34; $p < 0,0001$) [HR: Hazard Ratio] (Menéndez-Valladares P, 2015).

La EM es una enfermedad que no sólo disminuye la calidad de vida, sino que disminuye la productividad laboral y en fases avanzadas de la enfermedad puede llevar a una jubilación anticipada. A medida que la enfermedad progresa, mayor y más significativo es el coste sanitario para los pacientes, sus familias, los sistemas nacionales de salud y la sociedad en general. La importancia de un diagnóstico temprano de la EM que permita proporcionar tratamientos en fases tempranas,

ralentiza la progresión de la enfermedad y, por lo tanto, disminuye los costes y cargas asociadas a los niveles de mayor discapacidad de la EM.

El objetivo de esta tesis ha sido evaluar la utilidad clínica del biomarcador kappa en la conversión de pacientes con SNA a EM empleando para ello el índice kappa. En este trabajo se ha evaluado el valor diagnóstico predictivo que presentan los niveles altos de CLL κ y λ en LCR, y sus respectivos índices, y se ha relacionado con los parámetros clínicos y paraclínicos empleados actualmente en el diagnóstico de la EM.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. ASPECTOS HISTÓRICOS

Los principios de la esclerosis múltiple (EM) en el campo de la medicina se remontan a mediados del siglo XIX. Robert Carswell y Jean Cruveilhier, ambos patólogos e ilustradores describieron sus observaciones acerca de las lesiones patológicas de la EM, que quedaron reflejadas en sus ilustraciones.

Robert Carswell ilustró en su atlas *Pathological anatomy: illustrations of the elementary forms of disease* (1838) dos casos de lesiones de médula espinal con atrofia, características de la EM.

Jean Cruveilhier no sólo se limitó a ilustrar sus hallazgos, sino que también incluyó datos clínicos de los pacientes, resaltando la importancia de relacionar los hallazgos de la autopsia con la clínica. Es en el libro *Atlas d'Anatomie Pathologique* de Jean Cruveilhier (1835-1842) donde se menciona por primera vez la esclerosis en placas diseminadas (*sclérose en plaques disseminées*) y donde se utiliza por primera vez el término *grise masses disseminées* (materia gris dispersa).

Jean-Martin Charcot (1825-1893), reconocido como el padre de la neurología por sus trabajos en La Salpêtrière (Paris) fue el primero en reconocer la EM como una enfermedad, estableciendo correlaciones clínico-anatomopatológicas. Charcot describe en *Leçons sur les maladies du système nerveux* (1888) algunos de los elementos que son considerados en la actualidad distintivos de la sintomatología de EM: vértigo, trastornos visuales, paresias y alteraciones de la sensibilidad. En definitiva, Charcot es consciente en esa época tanto de los síntomas que presentan los pacientes como del transcurso de la enfermedad con recaídas y remisiones (Charcot JM, 1888; Villoslada P, 2010).

A pesar de que a mediados del siglo XIX ya se conocía la sintomatología de la EM, apenas se tenían conocimientos de su patogenia. A ello contribuirían los futuros

avances en el campo de la tecnología y el mayor conocimiento del sistema inmune. En esta época coexistían dos hipótesis que trataban de explicar la patogenia de la EM: por un lado una etiología neurodegenerativa (sostenida por Charcot, Muller y Strumpell), mientras que por otro se sostenía que los cambios iniciales se debían a compromisos de los vasos sanguíneos e inflamación (Rindfleish, Williamson y Dejerine). Rindfleish concluyó en sus estudios que las placas de EM eran secundarias a inflamación crónica (Villoslada P, 2010). Strumpell por el contrario creía en la teoría de un supercrecimiento glial asociado a fenómenos precipitantes (tóxicos o infecciosos).

En 1884, Pierre Marie, contribuyó al estudio de la EM documentando el curso clínico de la enfermedad. Incluyó por primera vez la EM benigna e hizo una distinción entre las formas progresiva primaria y progresiva secundaria.

Thomas Rivers estableció en 1935 la EM como una enfermedad autoinmune, mediante la producción de encefalitis alérgica experimental por inoculación de tejido neural en monos. Kabat y cols identificaron en 1942 proteínas anormales en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de personas con EM, mediante el estudio de patrones conocidos como bandas oligoclonales (BOC). Estos descubrimientos permitieron evidenciar el gran papel que juega el sistema inmune en la EM (Moreira MA, 2002).

2. DEFINICIÓN DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE

La EM es una enfermedad crónica autoinmune del sistema nervioso central (SNC), que se caracteriza por inflamación, desmielinización y daño axonal. Afecta a adultos jóvenes de entre 20-40 años, siendo más común en mujeres en una proporción 3:1. La etiología de la EM es desconocida, se encuentran implicados factores ambientales (infecciones, latitud, etc.), genéticos, e inmunológicos. Es la principal causa de discapacidad neurológica no traumática en adultos jóvenes, con un gran impacto negativo en su calidad de vida (Izquierdo G, 2015).

Europa es considerada una región de alta prevalencia de EM a nivel global (mapa de prevalencias mundial mostrado en figura 1), dado que presenta a más de la mitad de la población diagnosticada con EM, con una prevalencia general $\geq 30/100.000$. No todas las regiones Europeas se ven afectadas de igual forma, existiendo grandes diferencias entre ellas. Se ha determinado que la incidencia varía de $< 1/100.000$ a $>10/100.000$ (Kingwell E, 2013). Se ha sugerido a nivel global, que existe una asociación entre la distribución de la EM y la latitud (menor prevalencia de EM en el sur respecto al norte), a excepción de Italia y el norte de Escandinavia (Simpson S, 2011).

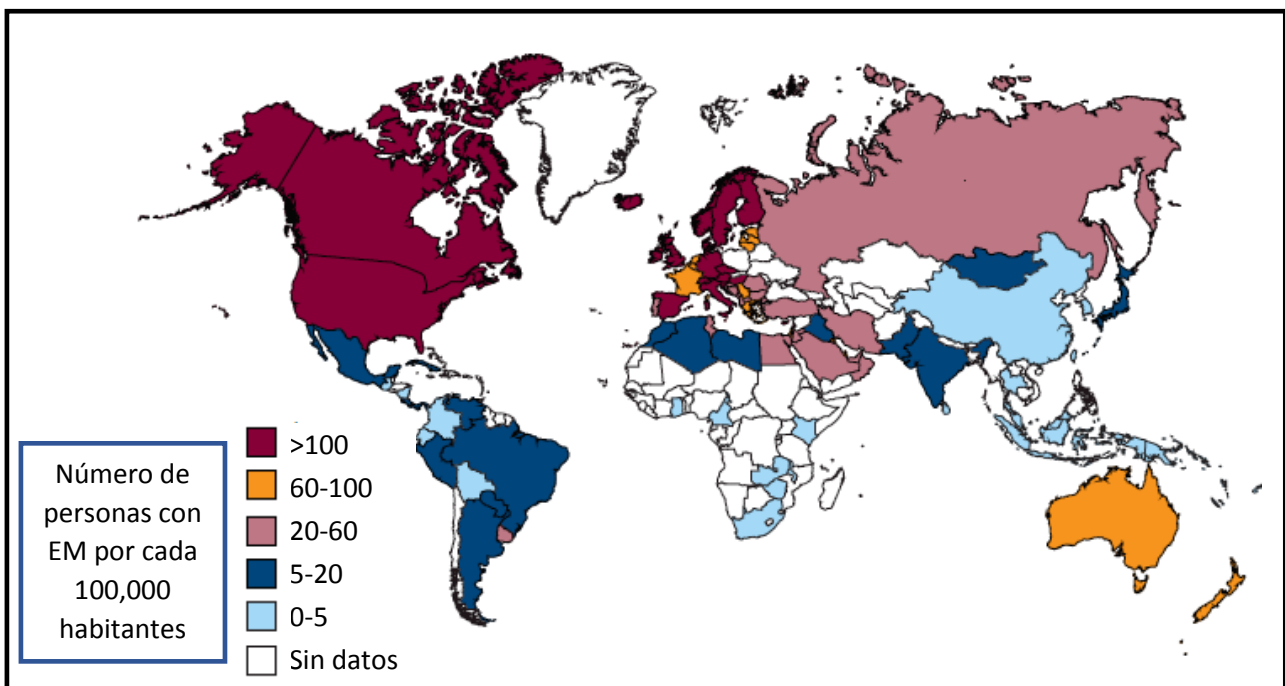


Figura 1. Mapa de prevalencias por país (2013). Se estima que 2,3 millones de personas en el mundo presentan EM (2013). España es uno de los países con mayor prevalencia de EM a nivel global. Extraído de “Atlas of MS 2013. Multiple Sclerosis International Federation”.

En España, más en concreto en el distrito norte de Sevilla (entre las latitudes 37,24 y 38,19), en un estudio longitudinal desarrollado en un periodo de 20 años (desde enero de 1991 a diciembre de 2011), se determinó una prevalencia de EM de 90,2/100.000 habitantes; y una incidencia de 4,6/100.000 habitantes; también se concluyó que durante los 20 años incluidos en el estudio, la incidencia se había incrementado en mujeres pero no en hombres (Figuras 2 y 3). También se observó que la mayoría de pacientes fueron diagnosticados con edades situadas en la década de los 30 años, con una relación mujer/hombre de 2,5:1 (Izquierdo G, 2015).

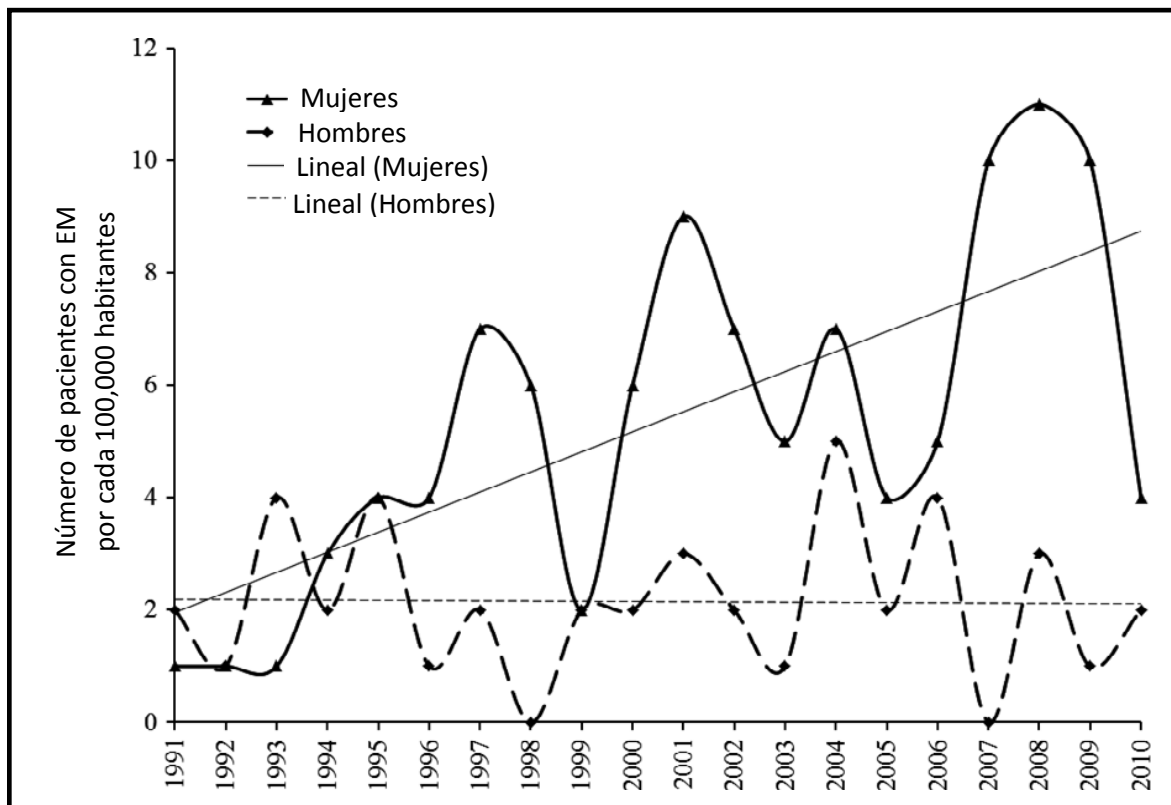


Figura 2. Incidencia de EM en hombres y en mujeres en un periodo de 20 años (desde enero de 1991 a diciembre de 2011) en el distrito norte de Sevilla (España) (Izquierdo G, 2015).

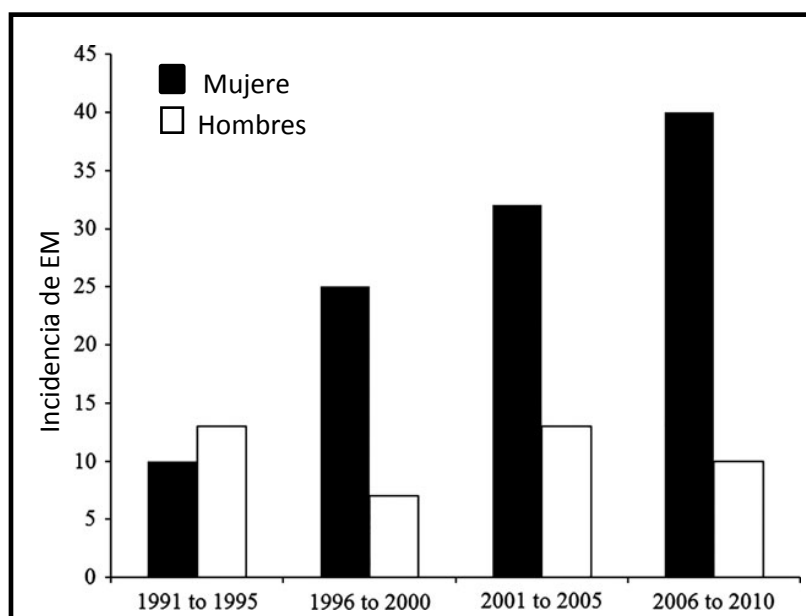


Figura 3. Incidencia de EM en hombres y en mujeres en incrementos de 5 años durante un periodo de 20 años (desde enero de 1991 a diciembre de 2011) en el distrito norte de Sevilla (España) (Izquierdo G, 2015).

3. FISIOPATOLOGÍA

Los investigadores siguen tratando de comprender la patogénesis de la EM para poder prevenir así su progresión. Se cree que la EM es una patología mediada por el sistema inmune que se presenta fundamentalmente en individuos susceptibles genéticamente. Los familiares de primer grado de un paciente con EM, tienen un riesgo de desarrollar EM menor al 5%. Pero si esto se extrapola a la población general, estos familiares directos de los individuos con EM, presentan un riesgo relativo entre 20-40 veces superior a la población general.

Se cree que son varios mecanismos patogénicos los implicados en la EM, dada la heterogeneidad de manifestaciones clínicas, genéticas y de imágenes en las pruebas de resonancia magnética (RM) que contribuyen a la EM. La principal característica patológica de la enfermedad es la placa de EM, la cual se observa en el análisis macroscópico del cerebro, como un área hipocelular bien delimitada, localizada en la sustancia blanca, rosada, que contrasta con la sustancia blanca preservada.

La placa de EM se caracteriza por la pérdida de mielina, relativa preservación de los axones y la formación de cicatrices astrocíticas. Las placas suelen ser pequeñas, redondeadas u ovoideas, aunque con frecuencia presentan extensiones con forma de dedo a lo largo de los pequeños o medianos vasos sanguíneos (dedos de Dawson). Estas placas de EM pueden ser de tres tipos: placas agudas, placas crónicas activas y placas crónicas inactivas.

Las placas agudas se caracterizan por la presencia de un infiltrado inflamatorio perivascular con un área de desmielinización y pérdida axonal a su alrededor; por lo general son de pequeño tamaño, centradas en el vaso con el infiltrado inflamatorio. Aunque se localizan frecuentemente en el espacio perivascular, las células inflamatorias también penetran en el parénquima, aunque con menor densidad. La composición del infiltrado inflamatorio varía de acuerdo al estadio de actividad desmielinizante. Lo habitual es la presencia de linfocitos y macrófagos. Estos últimos predominan en las lesiones activas, determinadas por la identificación de productos de degradación de mielina en los macrófagos. Se observa que la frecuencia de placas

activas en los pacientes con EM es muy baja. Esto se debe probablemente a que el infiltrado inflamatorio es un fenómeno de corta duración (alrededor de un mes), que además se presenta en las fases iniciales de la EM, en las que es difícil observarlas (la mayoría de estudios se han realizado en autopsias de pacientes con formas progresivas).

Las placas crónicas activas suelen ser de mayor tamaño que las placas agudas. Se caracterizan por presentar en el borde de las mismas un límite bien delimitado de desmielinización activa, con presencia de mielina alterada y macrófagos. Esto indica un crecimiento centrífugo de las placas en su periferia. En estas placas no se observan infiltrados inflamatorios perivasculares, y el proceso de desmielinización es completo a excepción de los bordes.

Las placas crónicas inactivas suelen ser extensas y confluir con placas vecinas. Se caracterizan por una desmielinización completa, una densidad de axones escasa y un reducido número de oligodendrocitos. A diferencia de las placas crónicas activas, los bordes están bien delimitados, pero no se observa desmielinización activa en ellos. A estas placas también se les conoce como placas glióticas, debido a la abundante presencia de astrocitos en las mismas.

Las lesiones producidas en las placas de EM tienen una predilección por los nervios ópticos, la materia blanca periventricular, el tronco encefálico, el cerebelo y la médula espinal (Noseworthy JH, 2000; Villoslada P, 2010).

A escala microscópica, se observan en la placa de EM tres alteraciones típicas:

- infiltrados inflamatorios perivasculares
- desmielinización
- pérdida axonal

La presencia de infiltrados inflamatorios y la ausencia de patógenos es lo que define la EM como una enfermedad de carácter autoinmune. Los bordes de las placas crónicas pueden aumentar su extensión al seguir creciendo. En ellos se observan macrófagos con restos de mielina, ocasionalmente linfocitos T (LT), y raramente

linfocitos B (LB). En los infiltrados predominan los linfocitos CD3+ y macrófagos hematógenos. También se han encontrado abundantes linfocitos CD4+, aunque los linfocitos predominantes son los linfocitos CD8+ (Villoslada P, 2010).

La desmielinización consiste en la presencia de axones sin las características vainas densas de mielina (Figura 4 y 5). Sin la vaina de mielina, la membrana axonal queda expuesta generando cambios en el potencial de acción de membrana y en la distribución de canales iónicos. El impulso nervioso se transmite de forma saltatoria entre nódulos de Ranvier, lo que permite una elevada velocidad de conducción. En las situaciones en las que esta vaina de mielina es escasa o nula, como es el caso de la EM, el impulso nervioso se transmite a una velocidad más lenta (Martínez-Altarriba MC, 2015).

Se puede observar la desmielinización a nivel histológico mediante la tinción de Luxor-fast blue, o mediante inmunohistoquímica con anticuerpos específicos para las proteínas de la mielina [proteína básica de mielina (PBM), glicoproteína de mielina de oligodendrocitos (GMO), nucleótido cíclico fosfodiesterasa (NCF)]. También se estudia la desmielinización mediante microscopía electrónica.

En la lesión aguda la mielina se presenta desestructurada y vesiculizada. Existe una correlación entre la desmielinización activa y la presencia de macrófagos. Sin embargo, no existe relación entre la presencia de infiltrados linfocitarios y desmielinización. Se ha observado desmielinización activa en áreas sin presencia de linfocitos B o T. Esto indica que existen otros mecanismos patogénicos diferentes a la respuesta inmune adaptativa. Los pacientes con EM presentan diferencias notables en cuanto a la patogénesis de la destrucción de mielina (Henderson AP, 2009).

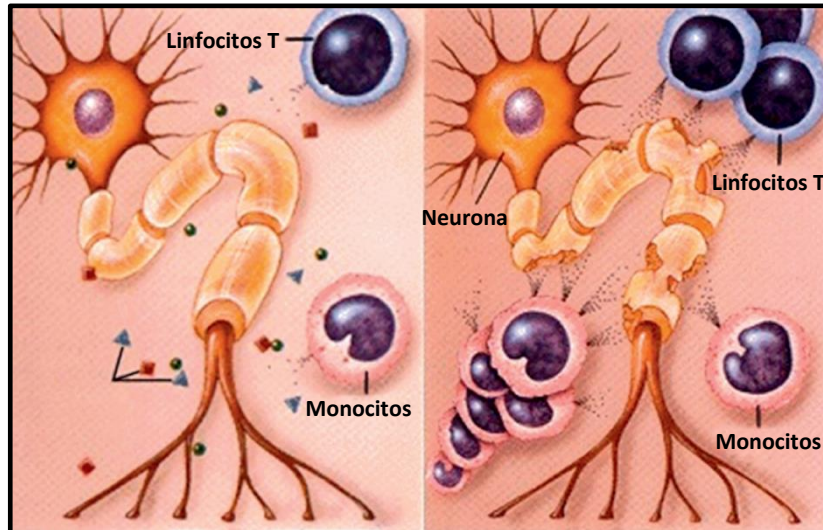


Figura 4. Diferencia entre un axón en una neurona normal (izquierda) y el de un paciente con EM (derecha) (Martínez-Altarriba MC, 2015).

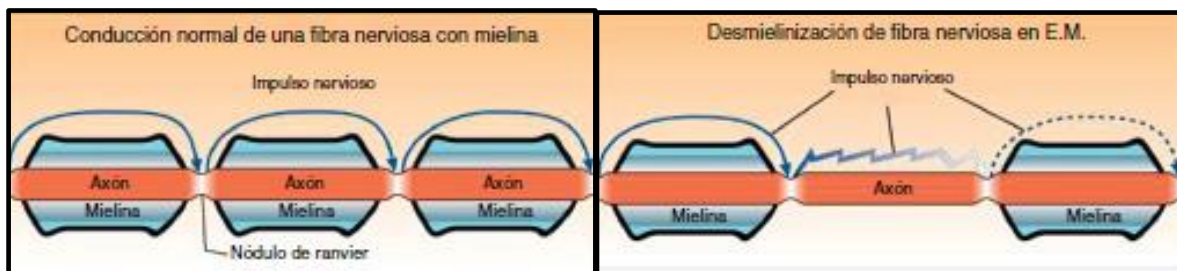


Figura 5. Esquema de la conducción nerviosa en una fibra nerviosa. Se representa la diferencia entre la conducción a través de una fibra mielínica (izquierda) y otra con pérdida de mielina (paciente con EM) (derecha) (Martínez-Altarriba MC, 2015).

Los síntomas precoces de la EM producidos por la desmielinización, pueden revertirse en las primeras etapas de la enfermedad. Esta recuperación se basa en la resolución del edema inflamatorio lo que tiene como consecuencia una remielinización parcial. Estas placas están constituidas por unas finas vainas de mielina más delgadas y cortas entre nodos, produciendo una tinción más pálida, que se conocen como “placas fantasma”. Sin embargo, en la EM crónica, esta remielinización es mínima. Se cree que las etapas de remisión en los pacientes con EM están relacionadas con los procesos de resolución del edema inflamatorio y de remielinización parcial. Existe una gran variabilidad entre pacientes en cuanto a la presencia de placas fantasma. Esto nos indica las grandes diferencias que existen entre sujetos en cuanto a la capacidad de regeneración de las vainas de mielina. En

general, cuando la enfermedad ha progresado en el tiempo, junto con un empeoramiento, la remielinización suele ser escasa.

La localización anatómica de la lesión también puede influenciar la extensión de la remielinización. En la EM crónica, las lesiones subcorticales muestran mayor remielinización que las lesiones periventriculares. Mientras que las lesiones cerebelosas son totalmente desmielinizadas (Goldschmidt T, 2009).

La pérdida axonal se determina mediante tinciones como el Bielchowsky o mediante inmunohistoquímica con anticuerpos antineurofilamentosos. Es un proceso precoz muy variable entre placas de EM, presentando grandes diferencias entre individuos con EM. En las placas agudas se observan axones con alteraciones morfológicas y axones transectados, que indican un fallo en el transporte axonal. En las placas crónicas se observa una disminución de la actividad axonal. La mayor pérdida axonal observada en pacientes con EM temprana, sugiere que en etapas iniciales de la enfermedad los axones son más vulnerables de sufrir daño ante la presencia de lesiones desmielinizantes. Esto permite explicar el elevado daño axonal observado en estos pacientes a pesar de los bajos niveles de desmielinización, frente a pacientes con EM en estados más avanzados (Tallantyre EC, 2009).

4. CLÍNICA

La EM se inicia con un primer brote o síndrome neurológicamente aislado (SNA), cuya sintomatología es variable dependiendo del curso clínico, gravedad, duración y evolución de la enfermedad. Normalmente la EM se manifiesta con neuritis unilateral óptica, síndrome de tronco encefálico, síntomas del hemisferio motor, síntomas de sensibilidad, o mielitis parcial (Polman CH, 2011; Gomez-Moreno M, 2012).

El término brote en la EM hace referencia a un déficit neurológico focal como consecuencia de una lesión desmielinizante que dura al menos 24 horas. Se considera que el paciente presenta un nuevo brote, cuando ha pasado más de un mes desde el

brote anterior. Los brotes se pueden clasificar atendiendo a diferentes criterios (Villoslada P, 2010):

- Según afecten a uno o varios sistemas: monofocales o monosintomáticos, y multifocales o polisintomáticos.
- Según la funcionalidad del sistema afectado: eferentes (motores, ataxia), y aferentes (sensitivos, visuales).

Un cierto número de pacientes con SNA desarrollan EM con el tiempo, mientras que otro grupo nunca convierte a EM. Los diversos estudios difieren en cuanto al número de pacientes con SNA que finalmente convertirán a EM. En un estudio observacional prospectivo realizado en Italia, se estudió el riesgo de conversión a EM según diferentes criterios diagnósticos: de acuerdo a los Criterios de McDonald y de Esclerosis Múltiple Clínicamente Definida (EMCD), la probabilidad de conversión a EM fue del 57% y del 36% respectivamente, tras 2 años de seguimiento. Mientras que después de 4 años de seguimiento la probabilidad de conversión a EM según los Criterios de McDonald y de EMCD fue del 75% y del 52% respectivamente (D'Alessandro R, 2013).

En la EM se presentan diferentes patrones de evolución que van a marcar el curso de la enfermedad (Figura 6):

- Síndrome Neurológicamente Aislado (SNA): es el primer brote registrado, clasificado como posible forma de inicio.
- EM Remitente Recurrente (EMRR): se presentan brotes seguidos de remisiones parciales o totales; es el patrón más prevalente. Los brotes pueden durar varios días e incluso semanas. Se da en un 80-85% de los casos. Un 15% van a ser formas benignas, con escasos brotes, que transcurridos 10-15 años van a conservar la capacidad de llevar una vida normal.
- EM Primaria Progresiva (EMPP): consiste en una afectación clínica progresiva sin remisiones claras, de manera constante. Este patrón es más frecuente en hombres. Se presenta en el 15-20% de los casos. De éstos, un

35% va a experimentar brotes, lo que se denomina como EM Progresiva Recurrente (EMPR).

- EM Secundaria Progresiva (EMSP): presenta la clínica del patrón de EMRR, seguido de una progresión a un curso posterior de patrón EMPP. Con el tiempo se va instaurando una afectación miélica permanente y un deterioro continuo.
- EM Progresiva Recurrente (EMPR): este patrón se inicia como una EMPP, presentando brotes que se superponen al deterioro progresivo de la enfermedad.

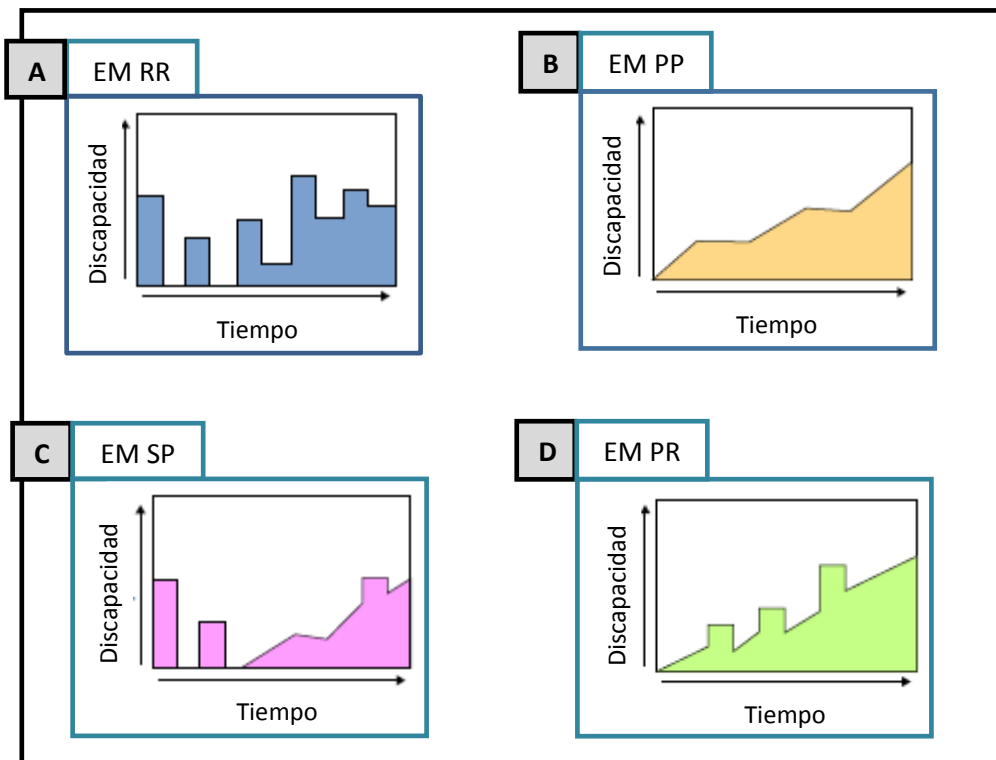


Figura 6. Patrones de evolución de la EM. Se representan los brotes (discapacidad) que se producen en el transcurso de la enfermedad. A) Esclerosis Múltiple Remitente Recurrente (EMRR); B) Esclerosis Múltiple Primaria Progresiva (EMPP); C) Esclerosis Múltiple Secundaria Progresiva (EMSP); y D) Esclerosis Múltiple Progresiva Recurrente (EMPR) (Martínez-Altarriba MC, 2015).

MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Los principales síntomas que dominan el cuadro clínico de la EM se representan en el esquema de la figura 7:



Figura 7. Principales síntomas presentes en la EM.

La disfunción visual puede cursar con neuritis óptica, que se presenta con dolor en un ojo que se incrementa al moverlo. Conlleva una disminución de la agudeza visual. También puede producirse una afectación de la motilidad ocular, en la que el nistagmo pendular adquirido suele producir oscilopía dificultando la visión.

Los trastornos motores o debilidad pueden tener distintas distribuciones: monoparesia, hemiparesia o paraparesia. Esto se suele acompañar de espasticidad y espasmos flexores o extensores, hiperreflexia, clonus y signo de Babinski. En menor frecuencia pueden aparecer cuadros de distonía, mioclonus, parkinsonismos y disquinesias. Por afectación radicular intraaxial pueden existir amiotrofia y arreflexia.

Los síntomas sensitivos son muy variados: hipoestesia, hiperestesia, disestesia térmica y dolor neuropático con hiperpatía y alodinia.

En los síntomas relacionados con la disfunción del tronco cerebral, se puede producir vértigo y nistagmus por la afectación de vías vestibulares; hipoacusia y tinnitus por afectación de vías auditivas; parálisis facial; afectación trigeminal (hipoestesia); y afectación del gusto. Relativamente frecuentes son la mioquimia facial y el espasmo hemifacial. La afectación de núcleos vegetativos con disautonomía y disfunción cardiorrespiratoria puede ser causa de muerte en brotes de tronco. Otro síntoma muy frecuente es la disartria, que puede generar diversos problemas articulatorios del lenguaje, como son la palabra escandida (sílabas separadas), la disartria con hipofonía, y la disartria acompañada de risa y llanto.

En cuanto a los síntomas asociados a la disfunción del cerebelo, los pacientes con EM pueden presentar frecuentemente ataxia, disartria, nistagmo y dismetría apendicular. También puede aparecer vértigo.

Los pacientes con EM pueden presentar en menor frecuencia, otros síntomas como la afectación medular, en concreto, en las formas EMPP, los pacientes pueden desarrollar paraparesia espástica, que puede acompañarse de ataxia. Pueden aparecer síntomas de carácter breve y transitorio: crisis tónicas, el signo de Lhermitte, la neuralgia del trigémino y del glossofaríngeo y otros dolores en extremidades, la ataxia, disartria y diplodía, la aquinesia, distonía y las disquinesias paroxísticas. También pueden presentar cuadros de prurito intenso y transitorio en la cabeza, hombros o extremidades. La fatiga se desarrolla con una sensación de cansancio físico y mental, no acorde al trabajo físico e intelectual realizado. Es un síntoma muy frecuente en los pacientes con EM, que empeora con el calor y es más intensa en las primeras horas de la tarde. Pueden aparecer trastornos del sueño con la presencia de cuadros de somnolencia diurna y ataques de sueño diurno. En los trastornos de esfínteres son frecuentes las disfunciones en el control de la micción, la incontinencia y la retención urinaria, sobre todo en mujeres. El estreñimiento y la incontinencia fecal afectan a un gran número de pacientes con EM. En lo referente a la disfunción sexual, en el varón es frecuente la impotencia y dificultades para la eyaculación y el orgasmo; y en las mujeres son comunes la pérdida de libido y la capacidad para alcanzar el orgasmo. En los trastornos de la función sexual influyen la espasticidad y la fatiga, además de los factores psicológicos. El deterioro cognitivo

afecta a más de un tercio del total de pacientes, siendo notable en etapas iniciales de la EM. Se observa déficit de atención, deterioro de la memoria, alteraciones del razonamiento abstracto y procesado lento de la información. Otro síntoma frecuente es la depresión (Villoslada P, 2010).

Para cuantificar la discapacidad de los pacientes con EM se han desarrollado diversos instrumentos en las últimas décadas, que además han servido de herramienta para evaluar la efectividad de las intervenciones terapéuticas. El instrumento más popular y más ampliamente empleado por los clínicos es la Expanded Disability Status Scale (EDSS) de Kurtzke (Kurtzke JF, 1983). Emplea una escala ordinal que va del 0 (normal) al 5-6 (máxima discapacidad), dividida por sistemas funcionales en 8 grupos:

1. Función piramidal
2. Función cerebelosa
3. Función del tronco cerebral
4. Función sensitiva
5. Función visual
6. Función intestinal y vesical
7. Función cerebral (cognitiva)
8. Otras funciones

Tras la evaluación el resultado se engloba en una escala que va de 0 (normal) a 10 (muerte por EM). Actualmente se emplea la escala ampliada en la que cada escalón se divide en dos (0, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5,..., 10) (Figura 8). Valores de EDSS 4-6 afectan a la capacidad de andar (Meyer-Moock S, 2014; Villoslada P, 2010).

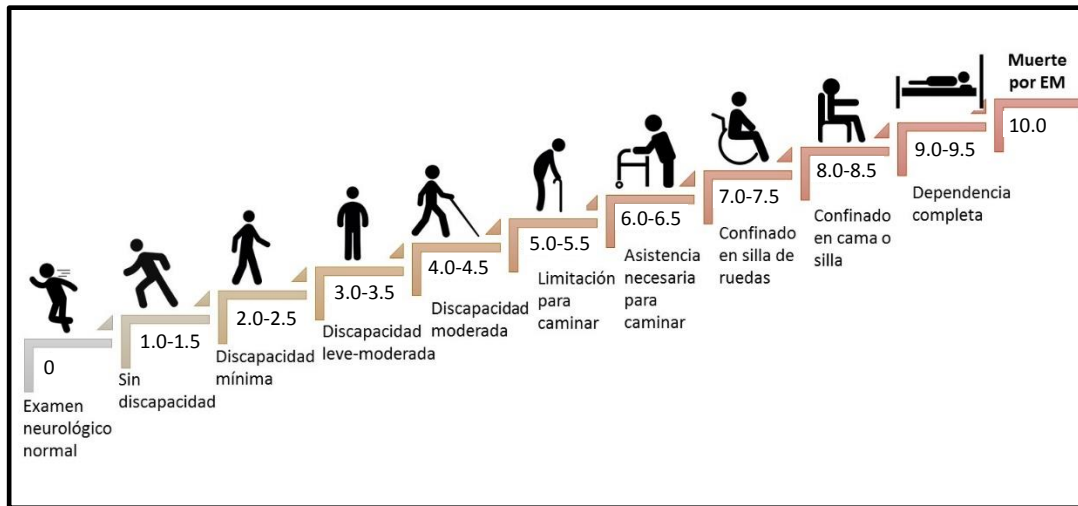


Figura 8. Escala de discapacidad de Kurtzke: Expanded Disability Status Scale (EDSS). La escala va de 0 (normal) a 10 (muerte por EM) con divisiones de 0.5 a partir de 1.

5. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la EM es fundamentalmente clínico, y se basa en demostrar la presencia de síntomas y signos relacionados con la difusión de las lesiones en la materia blanca del cerebro en el espacio (DLE) y en el tiempo (DLT). Se realiza un diagnóstico diferencial que permite excluir otras enfermedades con una clínica similar a la EM, como podría ser la presencia de otras enfermedades desmielinizantes. Además de los aspectos clínicos, los profesionales se apoyan en los métodos de RM, en el estudio del LCR, y de los potenciales evocados (PE).

Mediante las técnicas de RM es posible detectar y demostrar las lesiones en la materia blanca del cerebro. El análisis del LCR es clave en la confirmación del diagnóstico definitivo, puesto que apoya los hallazgos encontrados en la clínica del paciente. Se ha encontrado en el análisis de LCR de pacientes con EM niveles elevados de inmunoglobulinas, así como la presencia de BOC en más del 90 % de los pacientes. El estudio electrofisiológico de los PE se emplea para medir la capacidad de respuesta del SNC a los estímulos visuales, somatosensoriales y auditivos. Las latencias retardadas, así como los tiempos prolongados de conducción motora central son característicos de los procesos de desmielinización, pudiendo indicar lesiones clínicamente silenciosas.

Dada la heterogeneidad de síntomas, comienzo y desarrollo de la enfermedad, el diagnóstico no es sencillo. Actualmente, no existe una única característica clínica o test diagnóstico capaz de diagnosticar la EM (Milo R, 2014). Se han propuesto diferentes conjuntos de criterios para el diagnóstico de la EM, en los que se incluyen características clínicas y paraclínicas. Los primeros intentos de establecer unos criterios se remontan a 1965, “Criterios de Schumacher”, con la introducción de los fundamentos de DLE y DLT. Estos criterios especifican que la presencia exclusiva de síntomas no es suficiente para el diagnóstico, y se diagnosticará como EM cuando los signos y síntomas presentados, no puedan ser explicados por otra enfermedad. Estaba restringido a pacientes entre 10-50 años (Shumacher FA, 1965).

Los siguientes criterios propuestos fueron los “Criterios de Poser” en 1983 (Tabla 1). En ellos se incluyó el estudio de los PE y del LCR, como apoyo a los criterios de RM. Los pacientes estaban divididos en 2 grupos, posibles y probables. Cada criterio consistía en dos subgrupos principales de pruebas clínicas y de laboratorio con evidencias fundamentadas (Poser CM, 1983).

<i>Categoría</i>	Número de brotes	Evidencia clínica		Evidencia Paraclínica	BOCG LCR o índice IgG
<i>A) EM Clínicamente definida (EMCD)</i>					
<i>EMCD A1</i>	2	2			
<i>EMCD A2</i>	2	1	y	1	
<i>B) EM Definida apoyada por el laboratorio (EMALD)</i>					
<i>EMALD B1</i>	2	1	o	1	+
<i>EMALD B2</i>	1	2			+
<i>EMALD B3</i>	1	1	y	1	+
<i>C) EM Clínicamente probable (EMCP)</i>					
<i>EMCP C1</i>	2	1			
<i>EMCP C2</i>	1	2			
<i>EMCP C3</i>	1	1	y	1	
<i>D) EM probable apoyada por el laboratorio (EMALP)</i>					
<i>EMALP D1</i>	2				+

Tabla 1. Criterios de Poser (1983) en los que se incluye el estudio del LCR; se define un “BROTE” como la presencia de un síntoma de disfunción neurológica de más de 24 horas de duración; Evidencia clínica: signos de disfunción neurológica demostrables; Evidencia paraclínica: tomografía computarizada o RM, potenciales evocados; BOCG LCR (bandas oligoclonales IgG en LCR), o IgG (síntesis intratecal de IgG) (Poser CM, 1983).

Los criterios de Poser fueron evaluados en posteriores estudios, empleando casos confirmados de EM. Se demostró que eran sensibles en etapas tempranas de la enfermedad con una precisión para la EMCD del 94% (485/518). Mientras que para la Esclerosis Múltiple Clínicamente Probable (EMCP) la precisión fue del 66%. Ello puede deberse a un examen incompleto de los nervios ópticos, generando un diagnóstico incorrecto de falsos negativos (Izquierdo G, 1985; Engell T, 1988). Los criterios de Poser fueron ampliamente aceptados durante la década de los 90.

El Grupo de Trabajo Internacional de la EM liderado por el Dr. Ian McDonald modificó los criterios y recomendaciones de Poser, que se recogen en los criterios de McDonald de 2001 (Tabla 2) (McDonald WI, 2001). Con estos criterios se consiguió un diagnóstico temprano de EM en muchos casos de pacientes con SNA, presentando una especificidad del 83%, una sensibilidad del 83%, un valor predictivo positivo (VPP) del 75%, y un valor predictivo negativo (VPN) del 89% para la conversión de SNA a EM (Dalton CM, 2002). En resumen, los criterios de McDonald de 2001 definen la presencia de DLE por el cumplimiento de al menos tres de los cuatro criterios de Barkhof-Tintoré (BTC) o por la presencia de al menos dos lesiones en RM junto con síntesis intratecal de IgG (Barkhof F, 1997; Tintoré M, 2000).

<i>Presentación Clínica</i>	Datos adicionales necesarios para el diagnóstico de EM
<i>Dos o más brotes; evidencia clínica objetiva de 2 o más lesiones</i>	Ninguno
<i>Dos o más brotes; evidencia clínica objetiva de 1 lesión</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Diseminación en el espacio (DLE) en RM o - 2 o más lesiones en RM consistentes con EM, y LCR positivo o - Futuros brotes clínicos en diferente localización
<i>Un brote; evidencia clínica objetiva de 2 o más lesiones</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Diseminación en el tiempo (DLT) en RM o - Segundo brote clínico
<i>Un brote; evidencia clínica objetiva de 1 lesión (síndrome neurológico aislado)</i>	<ul style="list-style-type: none"> - DLE en RM o - 2 o más lesiones en RM consistentes con EM, y LCR positivo; junto con DLT en RM o - Segundo brote clínico
<i>Progresión neurológica insidiosa sugestiva de EM</i>	<p>Presencia de LCR positivo (BOCG positivas, realizadas preferentemente mediante isoelectroenfoque) junto con:</p> <ul style="list-style-type: none"> - DLE en RM demostrada por: <ul style="list-style-type: none"> o 9 o más lesiones cerebrales en T2 o 2 o más lesiones en médula espinal o 4-8 lesiones cerebrales y 1 lesión de médula espinal o - PE positivos con 4-8 lesiones en RM, o con menos de 4 lesiones y 1 lesión de la médula espinal; junto con DLT en RM o - Progresión continuada por 1 año

Tabla 2. Criterios de McDonald 2001 (McDonald WI, 2001).

La primera revisión de los criterios de McDonald se realizó en 2005. Esta revisión permitió mejorar la sensibilidad y precisión diagnóstica respecto a los criterios de McDonald originales, en la conversión de SNA a EM (Swanton JK, 2006). Para determinar las lesiones DLE se mantenían los requerimientos iniciales del cumplimiento de tres de los cuatro criterios de BTC, mientras que para las lesiones DLT se simplificaron los criterios de RM. Asimismo, las lesiones de la médula espinal adquirieron mayor importancia. El estudio del LCR fue reducido a los pacientes con EMPP (Polman CH, 2005).

En 2010, se realizó una nueva revisión de los criterios de McDonald, realizada por el Grupo de Trabajo Internacional de la EM, en la que se mantenía la sensibilidad y especificidad respecto a los criterios previos. En esta revisión, los criterios para DLE fueron simplificados, y los criterios para DLT se modificaron. Además, se excluyó el estudio del LCR para el diagnóstico de EMRR (Tabla 3). Sin embargo, se afirma que la presencia de LCR positivo (Índice IgG elevado o presencia de BOCG) puede servir de apoyo para evaluar diagnósticos alternativos, y para predecir EMCD. Concluyen en la necesidad de realizar más estudios combinados de RM y BOCG para evaluar el valor diagnóstico del LCR (Polman CH, 2011; Milo R, 2014).

<i>Criterios de McDonald</i>	2001	2005	2010
<i>Criterios de RM para DLE</i>	≥3 de las siguientes: <ul style="list-style-type: none"> • ≥9 lesiones en T2 • ≥3 lesiones periventriculares • ≥1 lesión yuxtacortical • ≥1 lesión infratentorial 	≥3 de las siguientes: <ul style="list-style-type: none"> • ≥9 lesiones en T2 • ≥3 lesiones periventriculares • ≥1 lesión yuxtacortical • ≥1 lesión infratentorial 	≥1 lesión en T2 en ≥2 de las siguientes áreas: <ul style="list-style-type: none"> • Periventricular • Yuxtacortical • Infratentorial • Médula espinal
<i>Criterios de RM para DLT</i>	≥3 meses después de debut de SNA ≥1 lesión nueva en T2 ≥3 meses después de brote de SNA	≥3 meses después de debut de SNA ≥1 lesión nueva en T2 ≥30 días después de brote de SNA	- Lesiones asintomáticas gadolinio (Gd) positivas y no Gd positivas o - ≥1 lesión nueva en T2 - Gd positiva en el seguimiento por RM con independencia del tiempo
<i>LCR</i>	Sí	Sí (para EMRR)	No

Tabla 3. Evolución de los criterios de McDonald desde 2001 a 2010 (Milo R, 2014).

A pesar de que el LCR no se incluye en los últimos criterios diagnósticos de McDonald de 2010, se han observado BOCG positivas en pacientes con SNA, considerándose un factor predictor de conversión a EMCD independientemente de otros factores (Tintoré M, 2008; Kuhle J, 2015). En un estudio reciente se han encontrado BOCG positivas en un 86% de pacientes con SNA. En estos pacientes, la probabilidad de conversión a EMCD y en un periodo de tiempo inferior fue superior que en los pacientes con SNA cuyas BOCG fueron negativas. Un 74% de los pacientes con SNA que presentaron BOCG positivas finalmente convirtió a EM. Dentro del grupo de pacientes que cumplían los criterios de McDonald de 2010, un 93% presentó BOCG positivas, convirtiendo finalmente a EM un 88%. Estos hallazgos encontrados, ponen de manifiesto la importancia del LCR en el diagnóstico diferencial de la EM. En concreto, es de gran interés el estudio de las BOCG en aquellos pacientes que presentan un SNA en ausencia de lesiones, permitiendo establecer un tratamiento temprano (Huss AM, 2016).

Sería recomendable estudiar el LCR en todos los pacientes con sospecha de EM o SNA, para poder realizar un primer diagnóstico diferencial, así como efectuar una reevaluación del diagnóstico de EM en pacientes con BOCG negativas (Schwenkenbecher P, 2016).

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

En ocasiones la clínica puede sugerir la necesidad de considerar otro diagnóstico en pacientes con sospecha de EM. Se ha sugerido en diversos estudios, que los diagnósticos alternativos más comunes ante un diagnóstico incorrecto de EM son debidos a enfermedades psiquiátricas, migraña y otros desórdenes crónicos de dolor. La presencia de síntomas poco específicos junto con hallazgos en RM poco específicos pueden llevar a un diagnóstico incorrecto de EM (Toledano M, 2015).

Si dividimos los criterios de diagnóstico diferencial de acuerdo a criterios radiológicos y clínicos, nos encontramos con las siguientes enfermedades alternativas a la EM (Przybek J, 2015):

Criterios radiológicos:

- Tumores (glioma, linfoma aislado de SNC)
- Neuromielitis óptica (NMO) o enfermedad de Devic
- Encefalomyelitis aguda diseminada
- Esclerosis concéntrica de Balo

Criterios clínicos:

- Neuroborreliosis
- Mielopatía
- Vasculitis
- Sarcoidosis
- Sífilis
- Neurocisticercosis
- Enfermedad de Behcet

Una presentación clínica hiperaguda (máximo déficit de minutos a horas) de los síntomas neurológicos focales sugiere otro diagnóstico distinto a una enfermedad desmielinizante; comúnmente está causado por un evento isquémico.

Las recaídas son comunes en pacientes con EM, sin embargo, la presencia de brotes en la misma localización del SNC es menos frecuente. Esto puede sugerir una lesión estructural, como un angioma cavernoso con hemorragia recurrente, un ataque isquémico transitorio o incluso síntomas transitorios referentes a un tumor.

La NMO se asocia con una discapacidad visual más severa que la discapacidad asociada a EM. Tanto las características clínicas como los hallazgos en RM ayudan a diferenciar la NMO de la EM. La detección de autoanticuerpos frente a aquaporina-4 (AQP4) confirma el diagnóstico de NMO en la mayoría de pacientes con esta patología. Sin embargo, un 20-30% de los pacientes no presentan autoanticuerpos frente a AQP4.

La presencia de BOCG positivas o Índice IgG elevado se detecta sólo en un 20% de los pacientes con NMO.

Se han descrito procesos de neuritis óptica y mielitis transitoria en pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) y síndrome de Sjögren. El diagnóstico diferencial se basa en la presencia de encefalopatía, dolor de cabeza, convulsiones y neuropatía periférica, síntomas no característicos de EM.

La afectación aislada del nervio craneal es inusual de la EM y debe considerarse otra alternativa diagnóstica. Es común en ciertas infecciones como la enfermedad de Lyme, o en procesos infiltrativos como la sarcoidosis, linfomatosis o carcinomatosis. Además, en estas enfermedades se presenta una clínica característica de fiebres, sudores nocturnos o pérdida de peso (Toledano M, 2015).

6. TRATAMIENTO

En la EM los objetivos del tratamiento están enfocados a mejorar los síntomas, a prevenir la discapacidad, reduciendo la frecuencia y duración de los brotes, y restablecer la funcionalidad. Lo ideal sería un tratamiento en el que los efectos secundarios fueran mínimos. La mayoría de tratamientos actuales se basan en el origen autoinmune de la EM. Podemos dividir el tratamiento en dos grupos:

- Tratamiento de los síntomas
- Tratamiento de la EM: frente a las recaídas (brotes) y terapia modificadora de la enfermedad.

TRATAMIENTO SINTOMÁTICO DE LA EM

Los pacientes con EM presentan una diversa sintomatología que puede afectar en gran medida a su calidad de vida. Es de gran importancia, identificar correctamente estos síntomas, conocer sus causas y emplear los tratamientos adecuados para su prevención. Por tanto, es necesario un estudio multidisciplinar de estos pacientes.

Para el manejo de los diversos síntomas derivados de la EM se emplean diferentes fármacos resumidos en la tabla 4. La espasticidad y los espasmos musculares son tratados con fármacos como baclofeno, tizanidina, diazepam y otras benzodiacepinas (Schapiro RT, 2005).

Nombre genérico	Uso en la EM	Nombre genérico	Uso en la EM
Alprostadil	Disfunción eréctil	Modafinilo	Fatiga
Amantadina	Fatiga	Oxibutinina	Disfunción vesical
Amitriptilina	Dolor (distesias)	Pemoline	Fatiga
Baclofeno	Espasticidad	Fenitoína	Dolor (parestesias)
Carbamazepina	Dolor (neuralgia de trigémio)	Sertralina	Depresión, ansiedad
Clonazepam	Tremor, dolor, espasticidad	Sildenafil	Disfunción eréctil
Desmopresina	Disminuir producción de orina	Tizanidina	Espasticidad
Diazepam	Espasticidad	Tolterodina	Disfunción vesical
Fluoxetina	Depresión, fatiga	Topiramato	Dolor, tremor
Gabapentina	Dolor, distresias, espasticidad	Venlafaxina	Depresión
Imipramina	Disfunción vesical, dolor		

Tabla 4. Fármacos empleados en el manejo de la diversa sintomatología de la EM (Schapiro RT, 2005).

TRATAMIENTO DE LA EM

Para establecer un tratamiento de inicio en la EM se considera el curso clínico de la enfermedad. Los episodios agudos se tratan con corticoides. El tratamiento clásico consiste en la administración intravenosa de metilprednisolona, aunque también se emplean formulaciones orales.

Aunque no existe un fármaco capaz de curar la EM, en los últimos 20 años se han desarrollado 8 terapias diferentes que incluyen:

- Interferón beta
- Acetato de Glatiramer
- Teriflunomida
- Dimetilfumarato
- Natalizumab
- Fingolimod
- Alemtuzumab
- Mitoxantrona

La mayoría de fármacos aprobados presentan efectos antiinflamatorios, y se ha observado una mayor efectividad de los mismos en fases tempranas de la EM.

Un posible algoritmo para el tratamiento de pacientes con EMRR se representa en la figura 9, en el que los pacientes son tratados con terapia de primera línea tras el diagnóstico de EMRR. Los pacientes con una EMRR severa al inicio deben comenzar directamente con un tratamiento de segunda línea. Un progreso en el avance de la enfermedad se define como una nueva recaída clínica provocando una discapacidad o la presencia de nuevos hallazgos en RM durante el último año con tratamiento. En pacientes con tratamiento de primera línea, pasarían a recibir terapia de segunda línea; y los pacientes ya en tratamiento con terapias de segunda línea serían candidatos a recibir terapias experimentales previo consentimiento de los pacientes.

Para un pequeño número de pacientes que no responden a la terapia de segunda línea, se emplean otros fármacos, off-label (uso de medicamentos para indicaciones no aprobadas en su ficha técnica), como rituximab, ofatumumab o terapia experimental con trasplante autólogo de células madre hematopoyéticas.

Ninguno de los fármacos aprobados hasta el momento ha mostrado efectividad en pacientes con EMSP o EMPP (Torkildsen O, 2016).

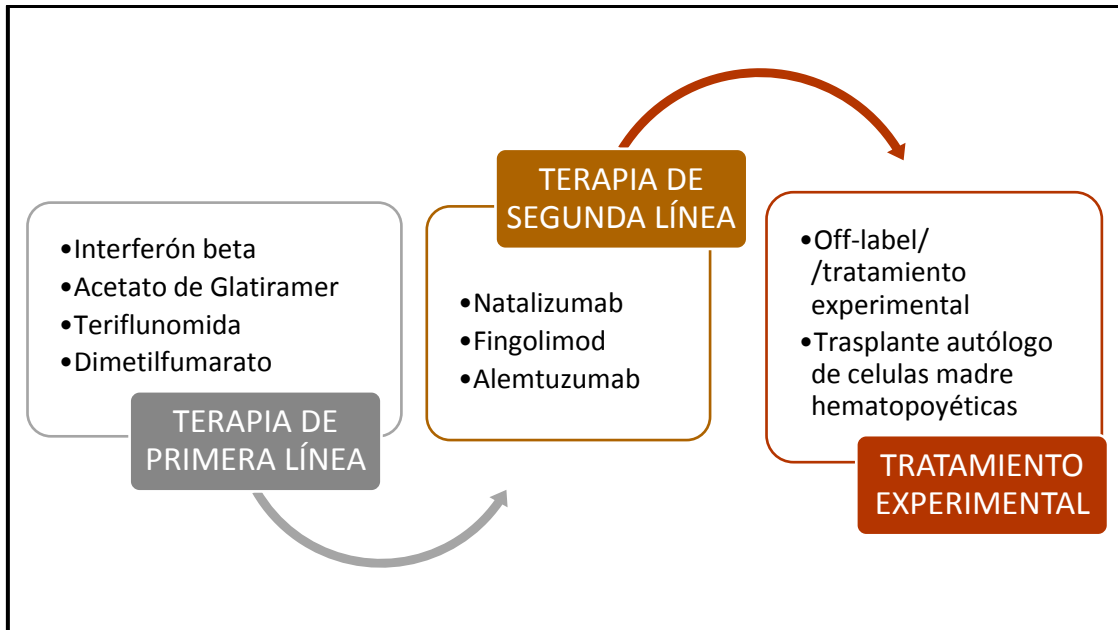


Figura 9. Algoritmo de tratamiento en pacientes con EMRR. Off-label: uso de medicamentos para indicaciones no aprobadas en su ficha técnica (Torkildsen O, 2016).

Los rangos de eficacia y seguridad de estos fármacos inmunomoduladores (interferón beta, acetato de Glatiramer, teriflunomida, natalizumab y fingolimod) son diferentes (Figura 10), aunque todos presentan beneficios en la clínica de la EM. Las terapias de primera línea inyectables, aunque más seguras, son modestamente eficaces. Los nuevos fármacos orales presentan una serie de riesgos conocidos y una incertidumbre debida principalmente, a la limitada experiencia en el uso clínico. Las terapias de infusión han resultado ser las más eficaces contra la enfermedad inflamatoria, pero conllevan un mayor riesgo. Los fármacos inyectables presentan una eficacia entre 20-35% frente al placebo, los fármacos orales entre un 50-55%, y las terapias de infusión >60%.

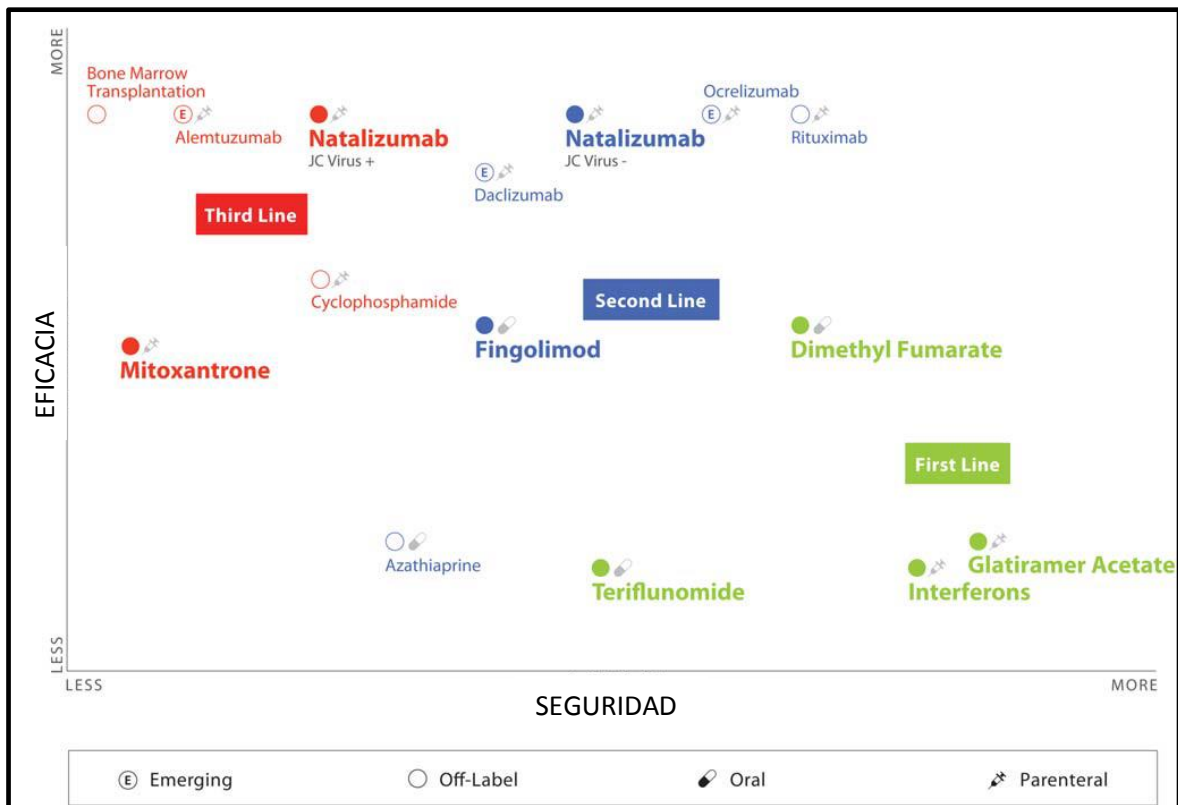


Figura 10. Eficacia y seguridad de los fármacos empleados en EM (Hauser SL, 2013).

El interferón beta es un polipéptido producido por los fibroblastos, que presenta efectos antiinflamatorios. Se emplea para el tratamiento de la EM en formas recombinantes. Se han mostrado los beneficios en pacientes con EM, reduciendo la tasa de recaída anual de la enfermedad en un 30-34%.

El acetato de Glatiramer es una mezcla de péptidos sintéticos con secuencias semejantes a la proteína básica de mielina. Es un fármaco que suele ser bien tolerado por los pacientes con EM, pero un porcentaje de ellos (65%) presentan reacciones en el lugar de la inyección (dolor, eritema, hinchazón, prurito).

La teriflunomida es un agente inmunomodulador que reduce el número de linfocitos circulantes. Como efectos adversos, se encuentra la elevación de las transaminasas hepáticas. En caso de que éstas se eleven tres veces por encima de los valores normales del paciente, debe suspenderse la terapia con teriflunomida.

El dimetilfumarato es un inmunomodulador con características antiinflamatorias. Al igual que la teriflunomida, presenta dentro de sus efectos adversos la elevación de las transaminasas hepáticas, y debe suspenderse el tratamiento con dimetilfumarato (Torkildsen O, 2016).

El fingolimod (Gilenya, Novartis Pharma AG, Basel, Switzerland) es un modulador oral del receptor de esfingosina-1-fosfato, que inhibe la capacidad de los linfocitos autoreactivos de salir de los ganglios linfáticos hacia el SNC. Es la primera terapia oral aprobada para la EMRR. Se recomienda realizar un seguimiento mediante electrocardiograma tras su administración, puesto que puede causar braquicardia y bloqueo atrioventricular (Kuhle J, 2015; Torkildsen O, 2016).

El natalizumab (Tysabri®; Biogen Idec, Inc., Elan Pharmaceuticals, Inc.) es un anticuerpo monoclonal anti- α 4-integrina, que impide la migración leucocitaria a través de la barrera hematoencefálica (BHE). Este fármaco ha demostrado reducir la frecuencia de los brotes, la progresión de la enfermedad y las lesiones presentes en las imágenes por RM (Horga A, 2011). El natalizumab ha supuesto un avance considerable frente a la EMRR. Desde el 2006 está aprobado por la Agencia Europea del Medicamento (AEM) para el tratamiento de pacientes con EMRR: pacientes adultos de 18 años de edad o mayores con elevada actividad de la enfermedad (comienzo de EM grave de rápida evolución desde el inicio) o tras el fracaso terapéutico con un inmunomodulador convencional (Fernández O, 2015). A pesar de ser un fármaco bien tolerado habitualmente, se han confirmado casos de leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP) en pacientes con EM tratados con este fármaco. LMP es una severa enfermedad desmielinizante causada por el virus de John Cunningham (JCV) en el SNC (Domínguez-Mozo MI, 2016). El natalizumab es uno de los fármacos de elección de los neurólogos en pacientes JCV negativos, debido a la alta reducción en la tasa de recaídas anuales. Sin embargo, para pacientes JCV positivos, la mayoría de neurólogos prefieren fingolimod o alemtuzumab (Torkildsen O, 2016).

El alemtuzumab es un anticuerpo monoclonal recombinante dirigido frente a CD52. Su mecanismo consiste en una eliminación y repoblación de linfocitos que

disminuye las recaídas y el riesgo de progresión. Esta terapia se asocia con un riesgo incrementado en infecciones del tracto respiratorio superior y con infecciones del tracto urinario. Presenta efectos a largo plazo sobre el sistema inmune, lo que puede ser un tratamiento interesante en aquellos pacientes con una progresión de la EM altamente activa. En un reciente estudio, un 70,1% de los pacientes tratados con alemtuzumab permanecieron libres de nuevas lesiones y de actividad en la RM (Arnold D, 2015).

La mitoxantrona es un derivado sintético de la antracenediona que interactúa con el DNA. Es un potente agente inmunosupresor dirigido contra células inmunes proliferativas, inhibiendo su proliferación e induciendo la apoptosis de LT, LB y macrófagos. A pesar de la eficacia mostrada en algunos estudios, en torno al 60-70%, su uso está disminuyendo debido al alto riesgo de complicaciones que presenta (Torkildsen O, 2016).

El estudio de nuevos tratamientos se centra en la protección de la discapacidad frente a nuevas recaídas, y no a la debida a la progresión de la enfermedad. Aunque menos del 2% de los pacientes con EMRR evolucionarán a formas progresivas de EM, es necesario un tratamiento personalizado en función de las características de los pacientes y de la progresión de la EM. En diversos estudios en los que se han comparado pacientes con tratamiento frente a la EM y pacientes sin tratamiento, se ha sugerido que un tratamiento temprano de la EMRR podría proteger frente a graves discapacidades, o incluso la muerte, debido a una lenta progresión de la enfermedad en los pacientes con tratamiento (Hauser SL, 2013; Torkildsen O, 2016).

El tratamiento ideal sería una terapia individualizada. Hoy en día se trata de proporcionar el tratamiento más seguro capaz de eliminar tanto la clínica de los pacientes con EM, como los hallazgos radiológicos que muestran la actividad de la enfermedad. Aquellos pacientes que presenten una progresión de la enfermedad con recaídas que afecten a su discapacidad y/o nuevas lesiones en RM durante el último

año, deben ser reevaluados y considerarse un nuevo tratamiento con terapias más potentes (Torkildsen O, 2016).

La recuperación de la función neurológica de los pacientes con EM será posible si se desarrollan terapias enfocadas a la remielinización y regeneración. En esta línea se investigan futuras terapias basadas en células madre. Las células madre mesenquimales se muestran como un tratamiento prometedor para la EM dadas sus propiedades inmunoregulatoras y tróficas, además de considerarse una terapia segura (Harris VK, 2015).

7. COMPONENTE INMUNOLÓGICO

La EM se ha considerado históricamente, como una enfermedad desmielinizante de origen autoinmune debida a una respuesta inmune anormal frente a los antígenos del SNC; donde los LT son cruciales en el proceso inmunopatológico que induce el daño en la vaina de mielina. Hoy en día se reconoce como una enfermedad mucho más compleja de lo que se predecía en estudios iniciales (Hellings N, 2002; McFarland HF, 2007).

La inflamación aguda es la primera respuesta ante un estímulo dañino (lesión tisular, infecciones bacterianas), implicando la liberación de macrófagos y mastocitos, seguido por la liberación de mediadores inflamatorios (quimiocinas, citocinas, aminas, péptidos vasoactivos). Cuando esta respuesta inmune innata no es exitosa (no se consigue eliminar el agente infeccioso o no se consigue reparar el tejido dañado), se desencadena la respuesta inmune adaptativa.

La EM comienza con la formación de una lesión inflamatoria aguda caracterizada por la ruptura de la BHE. Esta lesión presenta frecuentemente una clínica “silente”. La BHE es crucial en el mantenimiento de la homeostasis cerebral, dado que restringe el intercambio de factores humorales y células entre la sangre y el cerebro. La disfunción de la BHE es clave en el inicio de algunas enfermedades neurológicas inflamatorias entre las que se encuentra la EM y la NMO. Una vez que la

BHE se ha visto afectada, comienzan a formarse focos desmielinizantes y se produce la infiltración de LT alrededor de los pequeños vasos. La ruptura en la BHE provoca que con el tiempo, puedan observarse lesiones mediante RM. El grado de las lesiones está determinado por aspectos tanto inmunológicos, como genéticos. Las lesiones en la EM empeoran como consecuencia de una masiva infiltración de LT, un aumento en la expresión de las moléculas de adhesión en la superficie de las células endoteliales, y ante la liberación de citocinas y anticuerpos inflamatorios (McFarland HF, 2007; Shimizu F, 2013).

En el SNC, la inflamación se caracteriza por la infiltración de células inmunitarias circulantes (principalmente neutrófilos y monocitos), y por la activación de células del SNC: células endoteliales, microglía y astrocitos (Farina C, 2007). Los astrocitos ejercen una influencia crítica en el fenotipo de la BHE debido a su estrecha yuxtaposición a la microvasculatura cerebral; permiten que la BHE mantenga su integridad y su inactividad inmune a través de mecanismos dependientes del contacto, y liberando factores esenciales solubles. Por el contrario, en condiciones neuropatológicas, los astrocitos pueden liberar citocinas inflamatorias. Las neuronas y la microglía modulan el fenotipo de la BHE mediante la liberación de factores que afectan al mantenimiento de la misma, mediante la expresión de moléculas inmunes como quimiocinas y moléculas de adhesión celular. Todo ello, conduce a un incremento de la permeabilidad de la BHE que tiene como consecuencia la migración leucocitaria al SNC a través de la BHE, que desencadena el desarrollo de las lesiones en la EM (Larochelle C, 2011).

El estudio de la EM en modelos animales, como la encefalomiелitis autoinmune experimental (1), ha sido de gran importancia para constatar la naturaleza inmunológica de la enfermedad. En la actualidad, está ampliamente aceptado que la respuesta inmune adaptativa es iniciada por las células CD4 de los linfocitos T helper tipo 1 (LTh1) [liberando interferón- γ], y LTh17 [liberando interleucina-17 (IL-17)], de manera similar a lo demostrado en la EAE (Figura 11). La participación de las células CD4 en el proceso mediado por LT, es consistente con la asociación de riesgo genético con moléculas de clase HLA-II. Se ha observado que los genes de HLA-II son los que confieren un mayor riesgo genético de EM. Además, se

ha sugerido en diversas publicaciones, que las células CD8 de los LT también participan en el desarrollo de lesiones en la EM. Una mayor frecuencia de células CD8 reconocen las proteínas de mielina en pacientes con EM respecto a pacientes sanos. Se podría concluir que las lesiones en la EM son iniciadas por las células CD4, pero la amplificación y daño es mediado por CD8 (McFarland HF, 2007; Legroux L, 2015).

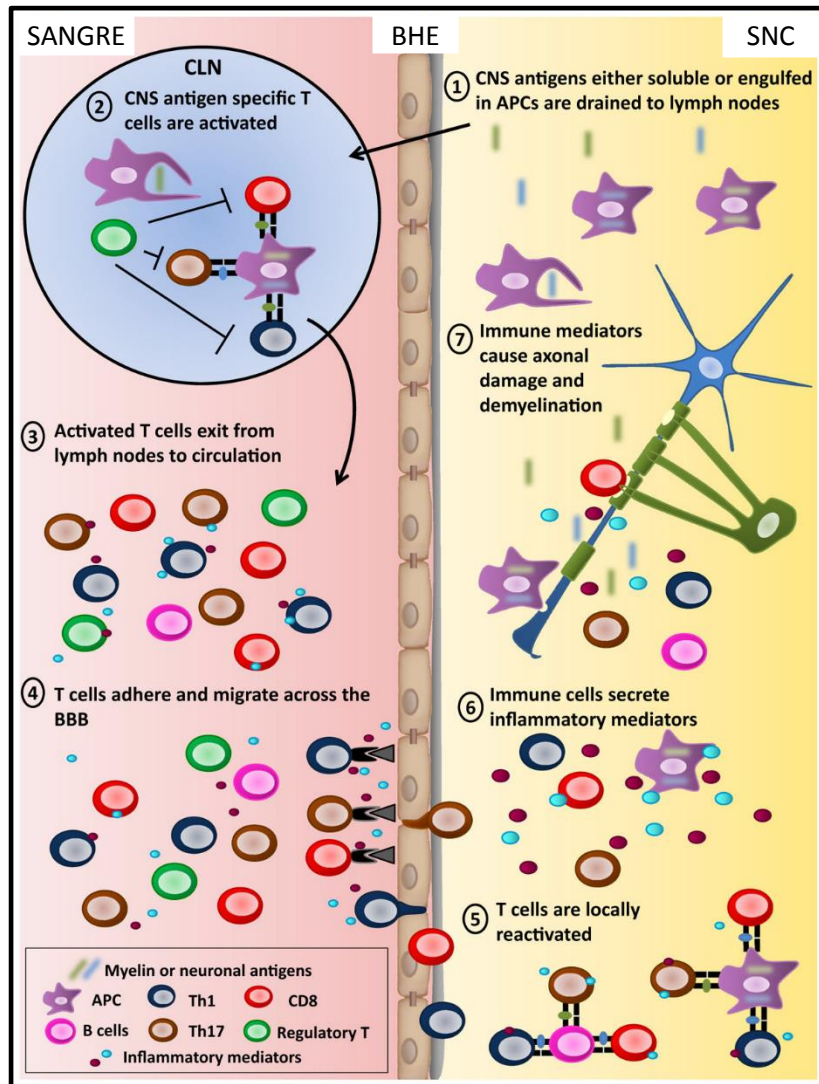


Figura 11. Mecanismo de actuación de los LT en la patogénesis de la EM. 1. Los antígenos solubles del SNC y las células presentadoras de antígeno (CPAs), como las células dendríticas, que han engullido mielina o antígenos neuronales pasan del SNC a los ganglios linfáticos cervicales; 2. Las CPAs activan las células CD4 y CD8 de los LT; 3. Los LT activados pasan de los ganglios linfáticos cervicales a la sangre periférica, donde realizan la vigilancia inmunológica; 4. Los LT activados son capaces de atravesar la BHE debido a la elevada expresión de los mediadores (receptores de quimiocinas, moléculas

de adhesión, integrinas y citocinas); 5. Una vez que los LT han atravesado la BHE, pueden ser localmente reactivados en el SNC; 6. Los LTh1, LTh17, células CD8 y macrófagos secretan mediadores solubles de inflamación; 7. Estos mediadores solubles pueden dañar las estructuras de los oligodendrocitos unidos a las vainas de mielina y de los axones de las neuronas, provocando el consecuente proceso de desmielinización y causando daño axonal.

A pesar del importante papel que juegan los LT en la patogénesis de la EM, estudios histopatológicos han sugerido la participación del sistema inmune humoral, en el que intervienen los LB y las células plasmáticas productoras de anticuerpos. Diversos estudios sugieren la implicación de un agente infeccioso o de autoantígenos en la patogénesis de la EM. Los anticuerpos frente a diferentes agentes infecciosos y los autoantígenos que no forman parte del repertorio de IgG, parecen ser irrelevantes, a pesar de haberse demostrado una relación directa en algunos estudios.

Se han asociado diversos microorganismos con la EM, pero se ha observado que ninguno está estrechamente vinculado con la enfermedad. A pesar de la síntesis intratecal de anticuerpos frente a algunos virus en algunos pacientes, tampoco se han podido correlacionar con la duración ni la severidad de la enfermedad.

ANTICUERPOS CONTRA PROTEÍNAS MIELÍNICAS

Uno de los posibles autoantígenos que podría influir en la EM es la PBM. Las diferencias metodológicas junto con la detección de actividad en grupos control, indican la falta de especificidad para a la EM.

La GMO, componente menor de la mielina, presenta actividad secundaria a la destrucción tisular, y no es causante de la desmielinización, por lo que tampoco sería un autoantígeno de interés en la patogenia de la EM.

Se han estudiado otros antígenos de mielina en pacientes con EM, que tampoco han mostrado resultados satisfactorios: NCF1, presente en la superficie de los oligodendrocitos; proteína proteolipídica (PLP), componente más abundante de

mielina; glicoproteína asociada a mielina (GAM); proteína específica de oligodendrocitos (PEO).

ANTICUERPOS CONTRA OTROS COMPONENTES DEL SNC

La β -arrestina o antígeno-S es una proteína soluble que se une a calcio, que forma parte de las proteínas dominantes de la retina de mamíferos. Se han descrito anticuerpos contra arrestina retiana y arrestina cerebral en pacientes con EM. La autorreactividad frente a arrestina podría explicar el proceso de remielinización defectuoso de la EM (Ohguro H, 1993).

Las heat shock proteins (HSP) o chaperonas, son proteínas que intervienen en el correcto plegamiento de las proteínas sintetizadas o desnaturalizadas por el estrés celular. Existen numerosas familias de HSP. Se conoce que los títulos de anticuerpos contra la familia de HSP60 y HSP70, están elevados en el LCR de pacientes con EM y otras enfermedades neurológicas (Birnbaum G, 1995).

Los neurofilamentos (Nf) son un componente principal del citoesqueleto axonal y su número está correlacionado con su tamaño y forma. Los Nf están compuestos por 4 subunidades: un triplete de Nf de cadenas ligeras (NfL) (68 kDa), Nf de cadenas medias (150 kDa), Nf de cadenas pesadas (NfH) (190-210 kDa), y α -internexina en el SNC o periferina en el Sistema Nervioso Periférico. Los Nf son expresados por los axones y las células dendríticas. Se han visto niveles elevados de NfL y NfH en todos los estadios de EM, siendo estos niveles mayores durante las recaídas y ante el incremento de lesiones en las imágenes por RM. En estudios previos se ha observado que las mediciones de NfL podrían ser superiores a las de NfH para detectar los efectos del tratamiento en el LCR de los pacientes con EMRR (Kuhle J, 2013).

La AQP4 es un marcador altamente específico para la NMO, dirigido contra el canal acuoso aquaporina-4. Este marcador ha permitido demostrar un mecanismo humoral patogénico diferenciado de la EM (Lennon VA, 2004).

Aunque se desconoce el papel de los LB en la patogénesis de la EM, es posible que tanto los LB como las células plasmáticas produzcan anticuerpos frente a algún

agente infeccioso, aún no identificado, causante de la EM. En el proceso inflamatorio del SNC, existe una población de LB residentes en el LCR, que constituye aproximadamente el 5% de las células del LCR. En este proceso inflamatorio, se produce la maduración por afinidad dirigida por antígenos y la diferenciación terminal de los LB. Estos procesos contribuyen a la secreción clonal de IgG, localizada dentro de los infiltrados perivasculares y en los folículos linfoides de las meninges del SNC. Todavía no se ha determinado si las células productoras de Ig en la EM proceden de la diferenciación de los LB o de los LB de memoria. La presencia de IgG en el SNC de pacientes con EM está bien establecida aunque no se ha podido confirmar la unión de IgG a la superficie de las vainas de mielina (Burgoon MP, 2004; Cepok S, 2005).

Las inmunoglobulinas (Ig) o anticuerpos, son las estructuras de reconocimiento de los LB. Se localizan en la superficie de estas células, y una vez liberadas por los LB maduros o por las células plasmáticas, se encuentran como moléculas efectoras libres. Las Ig son proteínas heterodiméricas compuestas por dos cadenas ligeras (L), y dos cadenas pesadas (H), unidas entre sí por puentes disulfuro (Figura 12). Las cadenas pesadas pueden ser de tipo γ , μ , α , δ y ϵ , definiéndose 5 clases (isotipos) de Ig o anticuerpos: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. Las cadenas ligeras pueden ser de dos tipos: cadena κ o cadena λ , y cada Ig puede tener cualquiera de las dos, pero no las 2. Las Ig están divididas funcionalmente en un dominio variable, con capacidad de reconocimiento de los antígenos, y un dominio constante, con especificidad de las funciones efectoras. Entre el dominio constante y el variable de las cadenas pesadas, se encuentra una región denominada “bisagra” que confiere flexibilidad a las Ig. La variabilidad de Ig está determinada por un mecanismo que se produce tras la exposición al antígeno. Con ayuda de los LT, los genes de los dominios variables sufren una hipermutación somática (Schroeder HW, 2010).

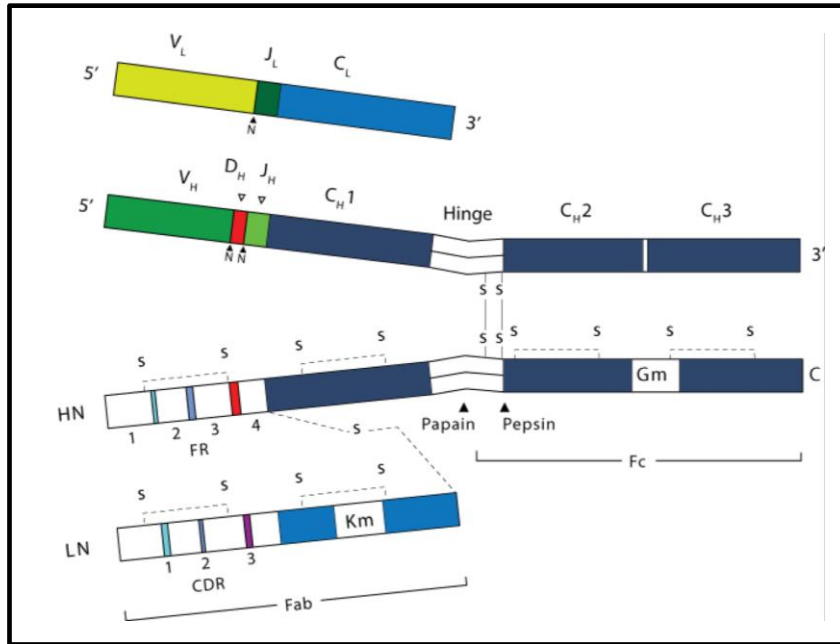


Figura 12. Estructura de una Ig. H=cadena pesada; L=cadena ligera; Fab=dominio variable; Fc=dominio constante; N=extremo amino terminal; C=extremo carboxi terminal; s-s=puente disulfuro; Gm y Km=alotipos (marcadores genéticos) (Schroeder HW, 2010).

Hay aproximadamente el doble de moléculas κ que λ . Cada cadena ligera libre (CLL) contiene unos 220 aminoácidos en una cadena polipeptídica que se pliega para formar los dominios constante y variable. Los dominios constantes presentan pocas variaciones, mientras que los dominios variables presentan una enorme diversidad estructural (Figura 13) (Bradwell AR, 2008).

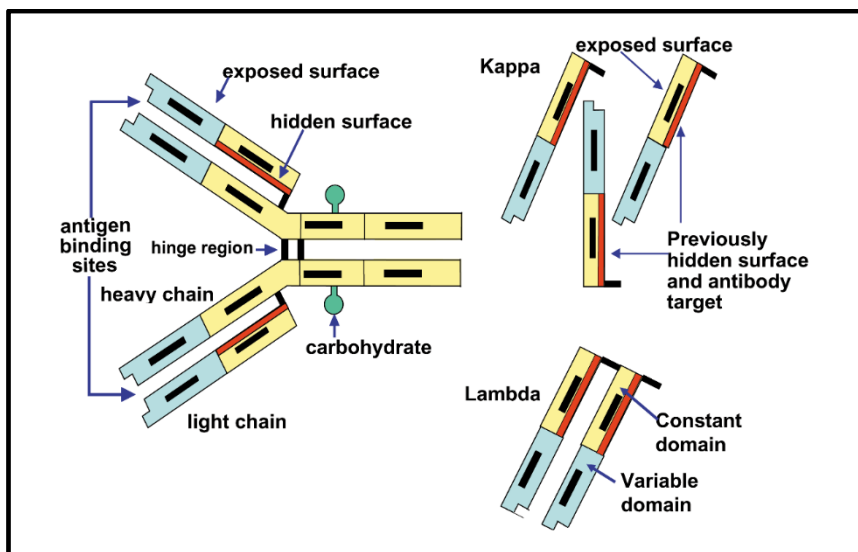


Figura 13: Estructura de una Ig (izquierda) y de las CLL κ y λ (derecha).

Las CLL κ se construyen a partir de 40 segmentos de genes $V\kappa$, 5 segmentos de genes $J\kappa$ y un gen $C\kappa$. Mientras que las CLL λ se construyen a partir de 30 segmentos de genes $V\lambda$, 4 pares de segmentos de genes $J\lambda$, y un gen $C\lambda$ (Figura 14). Las CLL se incorporan a las Ig durante el desarrollo de los LB y se expresan inicialmente en la superficie de las pre-células B.

En individuos normales se producen 500 mg/día de CLL en la médula ósea y en las células de los ganglios linfáticos. Estas moléculas pasan al torrente sanguíneo y rápidamente se dividen entre el compartimento intravascular y el extravascular. Las células plasmáticas producen 1 de cada 5 cadenas pesadas junto con la CLL κ o λ . Hay un 40% de exceso de CLL aproximadamente respecto a las cadenas pesadas, lo que permite una adecuada conformación de las moléculas de Ig intactas. Las CLL κ normalmente son monoméricas, mientras que las CLL λ suelen ser diméricas, unidas por un puente disulfuro (Figura 15). En individuos normales, las CLL se aclaran y metabolizan rápidamente a través de los riñones según su tamaño molecular. Las CLL monoméricas (cadenas κ) se aclaran en 2-4 horas con una tasa de filtrado glomerular del 40%; las CLL diméricas (cadenas λ) se aclaran en 3-6 horas con una tasa de filtrado glomerular del 20%.

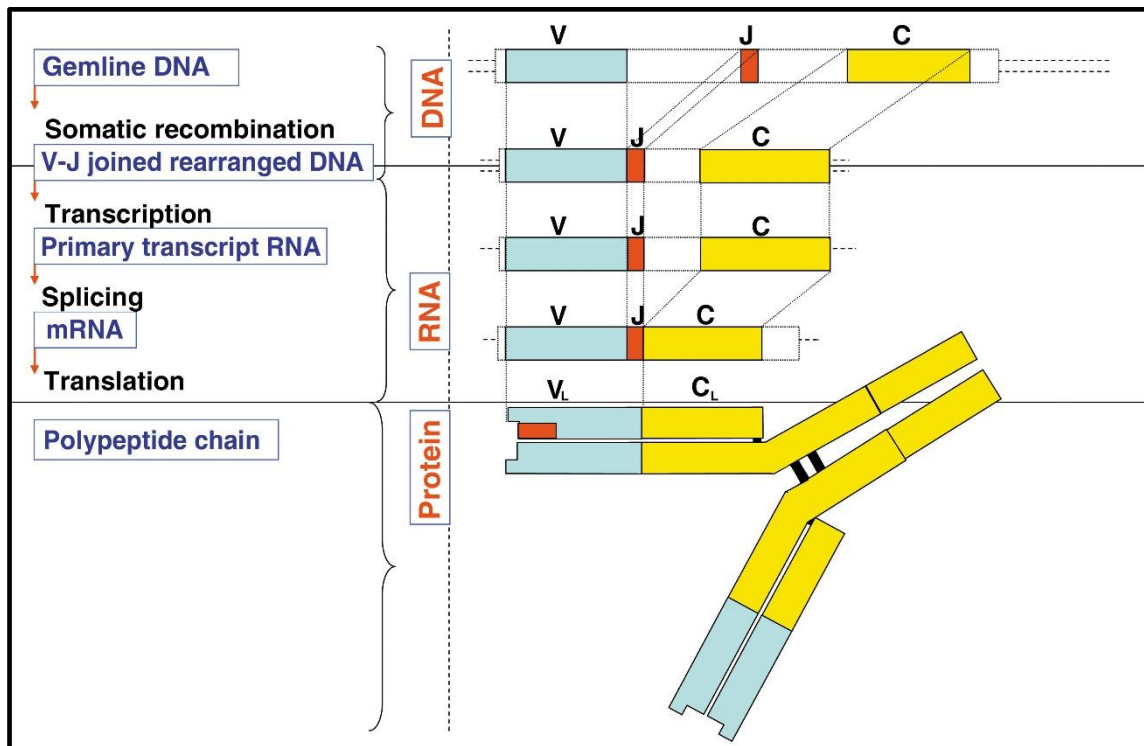


Figura 14. Construcción de cadenas ligeras (CLL).

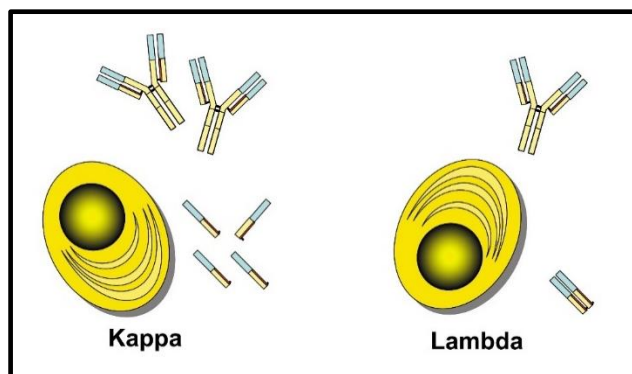


Figura 15. Producción de CLL. CLL κ en forma monomérica; CLL λ en forma dimérica.

8. PAPEL DEL LABORATORIO EN EL DIAGNÓSTICO DE LA ESCLESORIS MÚLTIPLE

El laboratorio ha desarrollado un papel importante en la ayuda al diagnóstico de la EM. A comienzos del siglo XX, Freund mostró que la relación de proteínas totales en LCR respecto al suero en los humanos era similar a la relación encontrada en conejos inmunizados pasivamente, donde esta relación resultó en 1/300. Se ha estudiado ampliamente en varias condiciones neurológicas, que existen cambios en las proporciones de proteínas en el LCR, y que la variación de proteínas séricas ejerce un efecto en la composición de las proteínas de LCR (Kabat EA, 1942).

En los pacientes con EM las concentraciones de albúmina en LCR son similares a las concentraciones en pacientes sanos. Sin embargo, las concentraciones de globulinas gamma en pacientes con EM son significativamente mayores que en los individuos sanos, por lo que la fracción de gammaglobulinas debe sintetizarse en el SNC en algunos pacientes con EM. Se estudió la posibilidad de que en la “aparentemente” materia blanca normal del cerebro, que rodea las placas activas en la EM, se encontraran concentraciones elevadas de gammaglobulinas debido a su difusión de las placas activas, donde se sintetizan las gammaglobulinas, a la materia blanca. Se encontraron en muestras de materia blanca “normales” en las que la cantidad de mielina era normal, concentraciones tan elevadas de gammaglobulinas o incluso mayores, que en muestras que no contenían mielina. Esto apoyaba la teoría de

que el exceso de gammaglobulinas en el tejido cerebral, no se debía a la existencia de un anticuerpo de mielina en el cerebro de pacientes con EM como postulaban otros autores en la época. Por otro lado, vieron una correlación positiva entre la concentración de gammaglobulinas en las placas de desmielinización como resultado de la EM y la concentración de gammaglobulina en el LCR (Tourtellotte W, 1967).

Un incremento de los niveles de albúmina en LCR puede ser debido a:

- Hemorragia dentro del espacio por dónde circula el LCR (espacio subaracnoideo, ventrículos cerebrales, y canal epindimario)
- Valor elevado en suero persistente, se establece un equilibrio entre la albúmina presente en el suero y en el LCR
- Lesiones en los plexos coroideos, las secreciones contienen albúmina
- Daño en la BHE, en el que se establece un gradiente de difusión por el que la albúmina en exceso pasa al LCR (además de otras proteínas séricas en exceso).
- Bloqueo del flujo de LCR, en particular en el espacio subaracnoideo

En la EM los niveles de albúmina sérica son normales. Si se produce un incremento en la albúmina en el LCR será como resultado de un daño en la BHE.

Tourtellotte y Parker (1967, 1968) propusieron que la concentración de albúmina en el SNC corregida por el valor de albúmina intravascular podía evaluar la disfunción de la BHE en condiciones no hemorrágicas. La relación de albúmina LCR:suero se estableció en 1:230 en individuos normales. Para IgG se estableció una relación suero:LCR de 1:300. La relación albúmina:gammaglobulina es menor en LCR que en suero en los pacientes con EM y otras patologías, además, el porcentaje de gammaglobulina en LCR es mucho mayor que en el suero.

Había dos teorías que postulaban el posible origen del incremento de IgG en el SNC: por un lado, Kabat y cols (1948, 1950) y Cutler y cols (1967, 1970) sugirieron la teoría de que se sintetizaba IgG “de novo” en el SNC y éste difundía al LCR. Por otro lado, Field (1954) postuló que el incremento de IgG producido localmente en el SNC procedía de la acumulación de tejido linfoide en el SNC.

En 1966 Tourtellotte y Parker establecieron una correlación positiva entre la concentración de IgG en las placas de desmielinización (en pacientes con EM) y su concentración en LCR. Sandberg-Wollheim y cols (1969) sugirieron que las células del LCR eran estimuladas antigénicamente cuando el paciente estaba en recaída, pero no cuando estaba en remisión. Kabat y cols (1948) encontraron que la concentración de IgG en LCR variaba de acuerdo a la concentración de proteína total, sin importar que enfermedad era la causante de esa alteración, incluso varios años antes de que se pudiera explicar cuál era el mecanismo. Además, vieron un patrón para discriminar la EM de otras patologías, en el que la relación IgG:proteínas totales en la EM estaba notablemente incrementada. Esta relación normalizaba el incremento de IgG en el LCR debido a un daño en la BHE, y en los casos en los que esta relación estaba incrementada, indicaba una síntesis “de novo” de IgG en el SNC. Schinko y Tschabitscher (1959) al igual que Bergmann y cols (1964) expresaron los cambios de gammaglobulina en términos de una relación, gammaglobulina de LCR:gammaglobulina sérica, viendo que estaba incrementado en pacientes con EM. Tourtellotte y Parker (1965) propusieron un valor de normalidad para la fracción en suero de IgG/albúmina de 0,35.

En aproximadamente un 20% de los pacientes con EM se ha visto hasta la fecha una ligera disminución en el flujo a través de la BHE. Ha sido ampliamente estudiado que en condiciones normales la totalidad de proteínas presentes en el LCR provienen del suero que atraviesa la BHE por difusión pasiva. De acuerdo a las leyes de difusión, las moléculas más grandes, como la IgM, difunden más lentamente, y van a presentar un gradiente de concentración suero:LCR más amplio (3000:1) que otras moléculas más pequeñas como la IgG (500:1) o la albúmina (200:1). Un incremento en la concentración sérica de proteínas implica una mayor concentración en LCR, pero en condiciones normales, el gradiente permanece constante en equilibrio. Esto se expresa apropiadamente como razones LCR/suero. Por ejemplo, la razón IgG fue descrita por Tourtellotte en 1971:

$$\text{Razón de IgG} = \frac{\text{IgG}_{\text{LCR}} (\text{mg/L})}{\text{Alb}_{\text{LCR}} (\text{mg/L})}$$

También se debe considerar la velocidad de flujo del LCR, que modula la concentración de moléculas. En algunas enfermedades neurológicas, una disminución de la velocidad de flujo resulta en un incremento de la concentración de proteínas en el LCR de origen sérico.

Dado que la albúmina se origina exclusivamente en el hígado pasando al torrente sanguíneo, una concentración elevada de albúmina en LCR siempre va a implicar una disfunción en la BHE, por lo que el cociente de albúmina (Q_{alb}) es un marcador de la función de la BHE.

$$\text{Cociente de Albúmina } (Q_{alb}) = \frac{\text{Alb}_{\text{LCR}} \text{ (mg/L)}}{\text{Alb}_{\text{suerO}} \text{ (mg/L)}}$$

Un incremento patológico de proteínas en LCR puede deberse a la disfunción de la BHE con un decrecimiento de la velocidad de flujo del LCR acompañado o no de síntesis intratecal.

Se ha encontrado en más del 95% de los pacientes con EMCD, síntesis intratecal de inmunoglobulinas, principalmente IgG (McLean BN, 1990). Sin embargo, esto depende del método empleado para determinar la síntesis intratecal de IgG: cualitativo o cuantitativo (Lunding J, 2000).

MÉTODO CUALITATIVO PARA DETERMINACIÓN DE SÍNTESIS INTRATECAL DE IgG

Cualitativamente, mediante análisis electroforético se observa la presencia de BOCG en LCR en pacientes con EM pero no en el correspondiente suero.

La primera técnica empleada para la detección de proteínas en LCR fue la electroforesis. Su principal limitación era la baja sensibilidad, además de las grandes cantidades de muestra que se necesitaban (alrededor de 70 mL de LCR) (Kabat EA, 1942). El isoelectroenfoque (IFE) en geles de agarosa supuso un avance importante en este campo (Figura 16). Mediante IFE seguido de inmunofijación, es posible detectar BOCG empleando entre 2-4 microL de LCR (Petzold A, 2013).

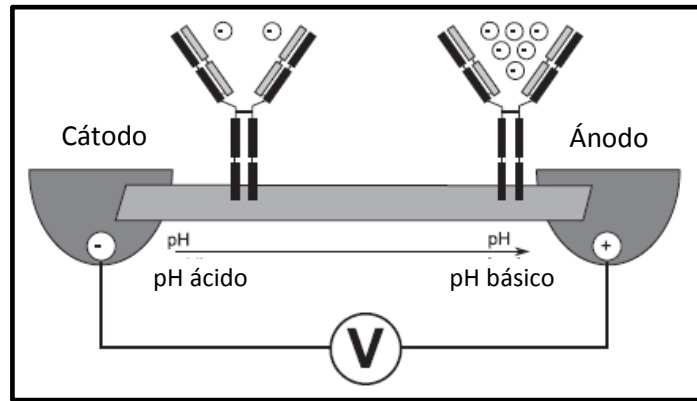


Figura 16. Mecanismo físico del isoelectroenfoco: las moléculas IgG con más carga negativa migraran hacia el ánodo (polo +) y las que presenten menos cargas negativas, migraran hacia el cátodo (-). Para realizar este estudio es fundamental mantener un gradiente isoelectroenfoco durante todo el proceso (Petzold A, 2013).

Nos encontramos con diferentes patrones de bandas en el IFE seguido de inmunofijación. El patrón mostrado permite realizar un diagnóstico diferencial, descartando otras patologías (Lunding J, 2000):

- Presencia de bandas exclusivas en LCR: en EM
- Idéntico en suero y LCR, ausencia de bandas: patrón normal o activación sistémica inmune.
- Presencia de bandas exclusivas en LCR, junto con bandas idénticas en LCR y suero: en EM y en enfermedades sistémicas de inflamación del cerebro.
- Idénticas bandas en suero y LCR: en inflamación sistémica.
- Bandas monoclonales en LCR y suero: en discrasia de células plasmáticas.

En la práctica nos encontramos con 5 tipos de patrones tras la detección de BOCG en LCR y suero de los pacientes (Figura 17):

1. Tipo 1: patrón normal (presenta respuesta policlonal en suero y en LCR)
2. Tipo 2: respuesta típica oligoclonal, se observan bandas discretas de IgG en LCR, con una respuesta normal en suero (policlonal).
3. Tipo 3: patrón “mayor que”, se observan más bandas en LCR que en suero.

4. Tipo 4: patrón en “espejo”, se observan el mismo número de bandas en LCR que en suero.
5. Tipo 5: respuesta monoclonal típica de las paraproteínas, se observan varias bandas especiadas regularmente.

Se consideran positivos para la EM los tipos 2 y 3, siempre que además, el número de BOCG diferentes en el LCR respecto al suero sea ≥ 2 .

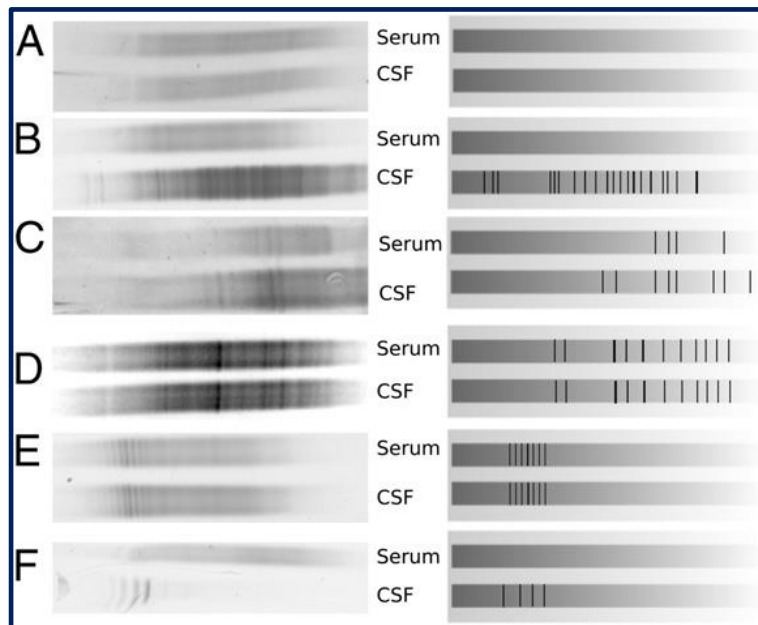


Figura 17. Patrones de bandas BOCG: A. patrón normal (tipo 1); B. síntesis local (tipo 2); C. patrón “mayor que” (tipo 3), se observan más bandas en LCR que en suero; D. patrón en “espejo” (tipo 4), se observan el mismo número de bandas en LCR que en suero; E. respuesta monoclonal típica de las paraproteínas, se observan varias bandas especiadas regularmente (tipo 5); F. artefacto (Petzold A, 2013).

Una vez establecido el patrón de bandas en pacientes con EM, este se mantiene estable en el tiempo según algunos estudios. Sólo en una minoría de estudios se ha indicado una alteración en las bandas, ya sea debida a un aumento, a una disminución o a cambios en la intensidad de las mismas durante la progresión de la enfermedad (Petzold A, 2013). En un estudio realizado en 2012, se observó que tras

el tratamiento con natalizumab, desaparecían las BOCG en un 16% de los pacientes (Harrer A, 2013).

Se cree que los anticuerpos IgM desempeñan un papel clave en la evolución de la EM. Con tal propósito, se han detectado BOC IgM en el LCR de pacientes con EM. Se ha observado en diversos estudios, que la síntesis intratecal de IgM predice una peor evolución de la enfermedad en las primeras etapas de la misma. Además, se asocia con un curso de la enfermedad más agresivo. Por tanto, la presencia de BOC IgM en LCR es un marcador de mal pronóstico de EM (Villar LM, 2003; Villar LM, 2005).

MÉTODO CUANTITATIVO PARA DETERMINACIÓN DE SÍNTESIS INTRATECAL DE IgG

Para poder demostrar la existencia de una síntesis intratecal de IgG y poder discriminarla de una disfunción en la BHE, se propusieron diversos índices y fórmulas que, en relación a las concentraciones observadas en el LCR de una proteína exclusivamente sérica (albúmina), estiman las concentraciones de IgG que tienen un origen sérico, y por exclusión, aquellas que tienen un origen local en el SNC. Con tal propósito, se han descrito cerca de 20 fórmulas para evaluar cuantitativamente la síntesis intratecal de inmunoglobulinas que podemos dividir en dos grupos: lineales y no lineales. Dentro de las fórmulas lineales se encuentran el índice de IgG o índice de Link, la fórmula de Tourtellotte, los índices IgA, IgM, IgE y de cadenas ligeras. Por otro lado, se han descrito fórmulas que no siguen una distribución lineal: el índice de Thompson, los índices ampliados de Ohman, la fórmula de Schuller, la de Reiber H. (1980) y la de Reiber H. y Felgenhauer K. (Dorta-Contreras AJ, 2004).

Para determinar cuál de estos índices y fórmulas presenta una mayor utilidad clínica, vamos a describir las más importantes en detalle. Todos ellos basan sus cálculos en diferentes modelos de comportamiento de la BHE, ofreciendo resultados poco coincidentes en la mayoría de los casos, de ahí la necesidad de seleccionar aquella fórmula que presente una mejor especificidad con la menor pérdida de sensibilidad.

En 1971, Delpech y cols definen una ecuación en la que relacionan el cociente IgG/albumina del LCR con el cociente IgG/albumina de suero, estableciendo un punto de corte de 0,85 como valor superior de la distribución normal (Delpech B, 1972). Esta fórmula para cuantificar la síntesis intratecal de IgG es conocida como Índice de IgG o índice de Tibbling-Link (Link H, 1977):

$$\text{Índice de IgG (Índice de Tibbling – Link)} = \frac{\text{IgG}_{\text{LCR}} \times \text{Alb}_{\text{suero}}}{\text{IgG}_{\text{suero}} \times \text{Alb}_{\text{LCR}}}$$

Tourtellotte y Parker establecieron una correlación positiva entre la concentración de IgG en las placas de desmielinización (en pacientes con EM) y su concentración en LCR. Tourtellotte describiría en 1969 uno de los primeros índices para cuantificar los niveles de IgG sintetizados por el SNC en mg al día (síntesis intratecal), eliminando la IgG procedente de la disfunción de la BHE en condiciones no hemorrágicas (Figura 18). Tourtellotte validó dicha fórmula empírica basándose en estudios de isótopos: empleó IgG y albúmina marcadas radiactivamente en suero, que fueron seguidas desde el torrente sanguíneo hasta al LCR durante 21 días en 9 pacientes con EMCD. La tasa de síntesis de IgG fue calculada por el método de intercambio de isótopos y comparada con los valores obtenidos mediante la fórmula empírica mostrando una buena correlación. Como consecuencia de estos estudios, la síntesis de novo de IgG del SNC (índice de Tourtellotte) fue calculado como:

$$\begin{aligned} &\text{Síntesis intratecal de IgG en mg/día} = \\ &= \left(\text{IgG}_{\text{LCR}} - \frac{\text{IgG}_{\text{suero}}}{369} \right) - \left(\text{Alb}_{\text{LCR}} - \frac{\text{Alb}_{\text{suero}}}{230} \right) \times \left(\frac{\text{IgG}_{\text{suero}}}{\text{Alb}_{\text{suero}}} \times 0,43 \right) \times 5 \end{aligned}$$

En este estudio, la media encontrada en pacientes con EM de IgG sintetizada al día por el SNC fue de 16 mg/día con un rango entre 0-100 mg (Tourtellotte W, 1970).

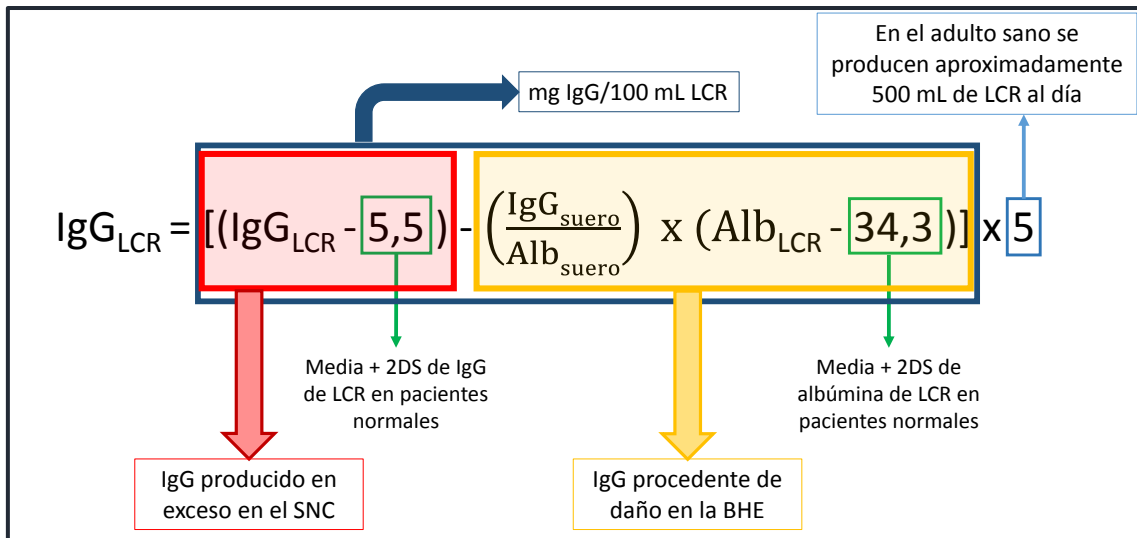


Figura 18. Fórmula descrita por Tourtellotte, se cuantifican los niveles de IgG sintetizados al día por el SNC en mg. Se obtiene mediante la diferencia del IgG producido en el SNC (calculado a partir de la diferencia de IgG en LCR menos 5,5 unidades, que es la media + 2DS de IgG en LCR en sujetos sanos) con el valor de IgG procedente de daño en la BHE (calculado mediante la multiplicación de la fracción $\text{IgG}_{\text{suero}}/\text{Alb}_{\text{suero}}$ por la diferencia de la albúmina en LCR menos 34,3 unidades, que es el valor de la media + 2DS de albúmina en LCR en sujetos sanos). Esta diferencia corresponde a los mg de IgG/100 mL de LCR. Al día se producen unos 500 mL de LCR, por lo que el resultado se multiplica por 5.

El índice de Tourtellotte requiere sólo una muestra de LCR y suero emparejados, que permite calcular la tasa de novo de síntesis de IgG en el SNC de los pacientes con EM (Tourtellotte WW, 1980).

Se han descrito índices para otras inmunoglobulinas de la misma manera que el índice de IgG o índice de Link, para el cálculo de la síntesis intratecal: índice IgA (Fryden A, 1978), índice IgM (Sindic CJ, 1982), índice IgE (Sindic CJ, 1984) e índices de CLL para las cadenas κ y λ (Fagnart OC, 1988).

Dentro de los índices no lineales descritos en la literatura, nos encontramos con el índice logarítmico de Thompson (McLean BN, 1990):

$$\text{Índice logarítmico de IgG} = \ln \left[\frac{\frac{\text{IgG}_{\text{LCR}}}{\text{IgG}_{\text{suero}}}}{\frac{\text{Alb}_{\text{LCR}}}{\text{Alb}_{\text{suero}}}} \right] + 1$$

Con el fin de mejorar el índice de IgG se desarrolló una nueva fórmula no lineal: el índice de IgG ampliado o índice de Ohman (Ohman S, 1989), que presenta una mayor sensibilidad, y disminuye el número de falsos positivos respecto al índice de IgG:

$$\text{Índice de Ohman} = \frac{\text{IgG}_{\text{LCR}} / \text{IgG}_{\text{sueros}}}{\left(\text{Alb}_{\text{LCR}} / \text{Alb}_{\text{sueros}} \right)^{1,12}}$$

En 1983 Schuller y cols describieron otra fórmula no lineal en la que observaron una síntesis local de IgG significativamente mayor en aquellos pacientes que presentaban altos niveles de discapacidad además de un curso clínico progresivo de la enfermedad, en comparación con pacientes que presentaban menores grados de discapacidad o con un curso de la enfermedad remitente recurrente. Este índice se conoce como Fórmula de Schuller (Schuller E, 1983):

$$\text{Síntesis local de IgG (mg/L)} = \text{IgG}_{\text{LCR}} - \left(30 + (\text{Alb}_{\text{LCR}} - 240) \times \frac{1}{60} \times \frac{\text{IgG}_{\text{sueros}}}{1000} \right)$$

La fórmula propuesta por Reiber H. se basa en el hecho de que cuanto mayor es el valor del Q_{alb} , menos densa es la BHE. Debido a este mayor radio hidrodinámico, la IgG atraviesa la BHE con dificultad. La gráfica de evaluación para diferentes disfunciones de la BHE se describe en la figura 19.

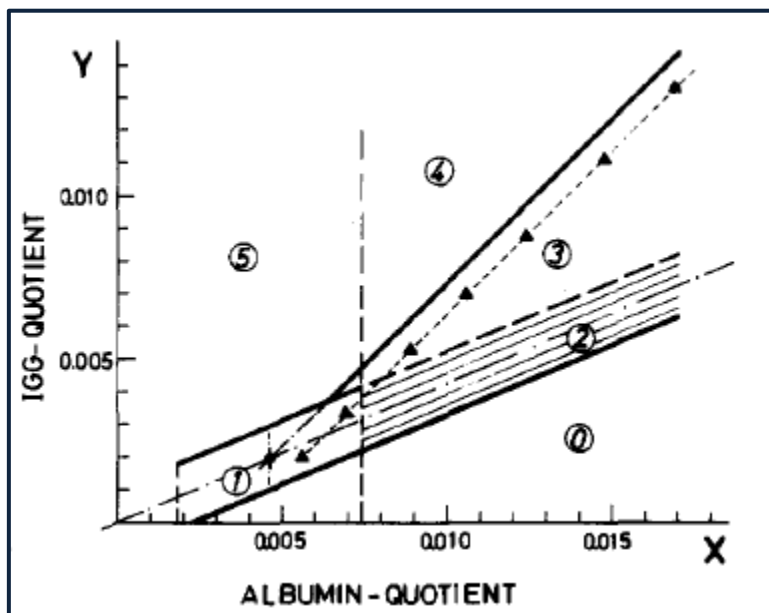


Figura 19. Reibergrama. Representación de las diferentes disfunciones de la BHE divididas en 6 áreas en el que se representa en el eje de ordenadas Q_{IgG} y en el eje de abscisas Q_{Alb} . 0: Rango biológico irrelevante. 1: Rango normal. 2: Rango de disfunción de la BHE con incremento proporcional de Q_{Alb} y Q_{IgG} . 3: Rango de disfunción de la BHE con incremento desproporcionado de Q_{IgG} . 4: Rango de disfunción de la BHE con síntesis intratecal de IgG en el SNC. 5: Rango de síntesis intratecal de IgG en el SNC (Reiber H, 1980).

Los datos obtenidos en este estudio permitieron diferenciar entre dos tipos de disfunción de la BHE: en un caso tenía lugar un incremento proporcional de los cocientes proteicos, y en otro caso este incremento no era proporcional con pérdida de la función de filtro de la barrera. De acuerdo al gráfico de la figura 19, el perfil proteico se puede dividir en 5 rangos. Se muestran ejemplos de pacientes normales y con EM presentados en el estudio de Reiber H. y cols en la figura 20.

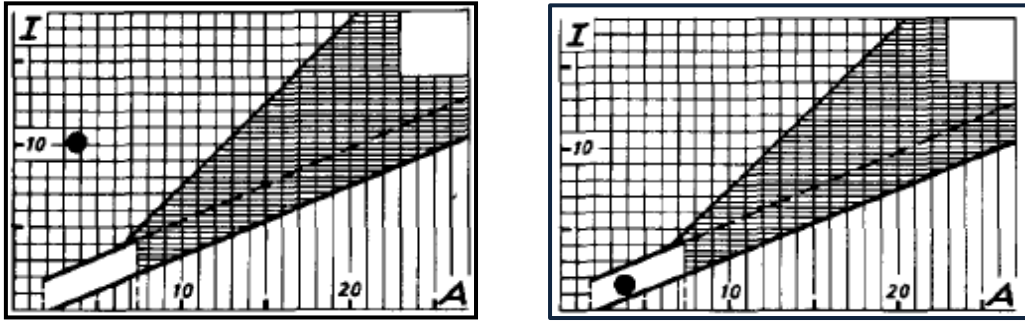


Figura 20. Reibergrama, resultados obtenidos en 2 pacientes, un sujeto sano y uno con EM. En el eje de abscisas se representa Q_{Alb} (A); y en el eje de ordenadas se representa Q_{IgG} (I); Los puntos negros representan el valor de ambos cocientes para cada sujeto. Derecha: Paciente control con un perfil normal; Izquierda: paciente con enfermedad inflamatoria crónica del SNC (EM), en el que se observa un Q_{IgG} incrementado respecto al Q_{alb} (Reiber H, 1980).

Reiber H describió una fórmula para calcular la fracción de IgG patológica (IgG_p) mediante la cual, cualquier valor de IgG_p > 0 confirmaba una producción local de IgG con una probabilidad de un 96%:

$$IgG_p = IgG_{LCR} - \left(0,43 \times \frac{Alb_{LCR}}{Alb_{suero}} + 0,001 \right) \times IgG_{suero}$$

Esta fórmula está limitada al uso sólo en aquellos casos en los que no haya interferencias debidas a la disfunción de la BHE ($Q_{\text{alb}} < 7,4$) (Reiber H, 1980).

Debido a la clarificación de los principios matemáticos de la transferencia de proteínas en la BHE fue posible cuantificar la síntesis intratecal de proteínas empleando una fórmula mejorada a la propuesta por Reiber H para la determinación de la fracción de IgG_p. La fórmula de Reiber y Felgenhauer se describió para las inmunoglobulinas G, A y M:

$$IgX (\text{local}) = \left[Q(IgX) - \frac{a}{b} \sqrt{Q(Alb)^2 + b^2} + c \right] \times IgX_{\text{suero}}$$

[Donde X= G, A o M; Para IgG: a/b= 0,8; b²=15; c=1,8. Para IgA: a/b= 0,72; b²=80; c=5,1. Para IgM: a/b=0,65; b²=150; c=7,5.]

Por tanto, la fórmula de Reiber y Felgenhauer para IgG se representa (Reiber H, 1987):

$$IgG_{local} \text{ (mg/L)} = \left[\frac{IgG_{LCR}}{IgG_{suero}} - 0,8 \sqrt{\left(\frac{Alb_{LCR}}{Alb_{suero}}\right)^2 + 15} + 1,8 \right] \times IgG_{suero}$$

La fórmula de Reiber y el índice de Ohman son las que presentan una mayor especificidad con la menor pérdida de sensibilidad según el estudio publicado por Cordero M y cols. (Cordero M, 1997).

Para facilitar el análisis e interpretación de los resultados obtenidos mediante las fórmulas descritas se ha desarrollado software para su análisis acoplado a los nefelómetros. Se ha comprobado en la relación no lineal entre Q_{IgG} y Q_{alb} , que la mejor relación numérica o gráfica es la línea de discriminación hiperbólica conocida como Reibergrama (Dorta-Contreras AJ, 2004).

El diagrama de las razones de Reiber o Reibergrama es un elemento esencial en el análisis del LCR en las enfermedades neurológicas, y en ellos se analiza de forma integrada, la funcionalidad de la BHE y la síntesis intratecal de inmunoglobulinas. Para confeccionar los Reibergramas se cuantifican los niveles de albúmina, IgG, IgA e IgM tanto en suero como en LCR en el nefelómetro.

Las curvas siguen una distribución hiperbólica obtenida experimentalmente a partir de miles de perfiles de LCR donde se comprobó que a medida que aumenta Q_{alb} se incrementa Q_{IgG} (Figura 21).

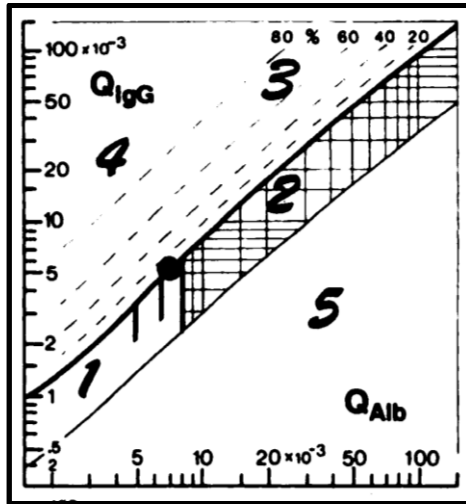


Figura 21. Reibergrama para IgG. Se representa Q_{alb} en el eje de abscisas, y Q_{IgG} en el eje de ordenadas. Clasificación por regiones: (1) Rango normal; (2) disfunción de la BHE; (3) disfunción de la BHE con síntesis intratecal de IgG en el SNC; (4) síntesis intratecal de IgG en el SNC; (5) cualquier valor en esta área indica un error metodológico.

En 1986 Rudick y cols. publicaron un estudio en el que cuantificaron las CLL κ y λ empleando el radioinmunoensayo (RIA). La falta de sensibilidad y especificidad hasta la fecha dificultó la determinación de las CLL. En este estudio un 84% de los pacientes con EM presentaron CLL κ detectables mientras que en el grupo control, sólo presentaban CLL κ detectables el 2,4% de los pacientes (Rudick RA, 1986).

La determinación de CLL no ha sido fácil debido a dos hechos: la poca sensibilidad y la baja especificidad de los métodos existentes. La baja concentración de CLL en suero y en LCR ha hecho necesaria la búsqueda de técnicas con una alta sensibilidad. El desarrollo de métodos basados en anticuerpos ha permitido superar estas dificultades. Se han desarrollado diferentes inmunoensayos: inmunoelectroforesis, western blot, ensayo de hemoaglutinación y nefelometría.

Un paso crítico en el desarrollo de inmunoensayos es la selección de anticuerpos frente a CLL κ y CLL λ respectivamente. Los primeros ensayos empleaban

anticuerpos policlonales, pero su especificidad no era buena. Los anticuerpos monoclonales permitieron mejorar la especificidad de las determinaciones.

Actualmente, se emplean métodos de nefelometría y turbidimetría para determinar las CLL. Una de las limitaciones de la nefelometría, es el exceso de Ag. En los ensayos se pueden infravalorar concentraciones muy elevadas de proteínas. Algunos equipos de medición identifican estos problemas y recomiendan diluir la muestra (Bradwell AR, 2010).

Una de las principales ventajas que presenta la determinación de CLL mediante nefelometría, además de ser un método cuantitativo, es que es automatizable y no depende de la habilidad y experiencia del personal de laboratorio. Esto permite que pueda estandarizarse y emplearse de forma rutinaria en los laboratorios clínicos. Esta metodología presenta buena linealidad y reproducibilidad en la cuantificación de las CLL en suero. Las CLL en LCR a pesar de presentar valores 10 veces inferiores a los de suero en condiciones normales, presentan una alta linealidad y reproducibilidad.

Los valores elevados de CLL κ en LCR en pacientes con SNA pueden predecir la conversión a EM. En un estudio realizado por Villar LM et al. en 2012, se obtuvo un punto de corte para las CLL κ de 0,53 mg/L (sensibilidad 90%; especificidad 82,14%) (Villar LM, 2012). En otro estudio realizado, el punto de corte para las CLL κ fue de 0,87 mg/L (sensibilidad 96,2%; especificidad 98,1%) (Hassan Smith G, 2014).

Se ha empleado el índice κ en diversos estudios, calculado como:

$$\text{Indice kappa} = \frac{\text{CLL kappa}_{\text{LCR}} \times \text{Alb}_{\text{suero}}}{\text{CLL kappa}_{\text{suero}} \times \text{Alb}_{\text{LCR}}}$$

Este índice considera la función de la BHE, mejorando la precisión en el análisis de las CLL y evitando falsos positivos debidos a la disfunción de la BHE. Las CLL λ han mostrado menor relevancia en diversos estudios, al presentar valores inferiores de sensibilidad y especificidad clínica en el estudio de la EM. En los diferentes estudios en los que se ha determinado el punto de corte para la conversión de SNA a EM se han

obtenido valores para el índice κ de: 20 (sensibilidad 69,7%; especificidad 81,8%) (Desplat-Jego S, 2005); 5,9 (sensibilidad 96%; especificidad 86%) (Presslauer S, 2008; Presslauer S, 2014); y 12 (sensibilidad 95%; especificidad 91%) (Duranti F, 2013). En todos ellos se han determinado las CLL mediante nefelometría.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Es de gran importancia establecer un diagnóstico temprano de la EM, para tratar de evitar o disminuir en la medida de lo posible el avance y progresión de la enfermedad, mediante una terapia adecuada. Como se ha descrito en la introducción, el laboratorio sirve de apoyo al diagnóstico de esta patología. Lo ideal sería disponer de un biomarcador con una sensibilidad y especificidad próximas al 100%, además de ser reproducible, fiable, sencillo de realizar y de bajo coste. Con tal fin, se ha planteado el presente estudio, cuyo objetivo principal es evaluar la utilidad clínica del biomarcador kappa en la conversión de pacientes con SNA a EM, empleando para ello el índice kappa.

Para ello se han planteado una serie de hipótesis y objetivos secundarios:

- Evaluar el valor predictivo de los niveles altos de CLL κ y λ en LCR como marcador de conversión a EMCD en nuestra cohorte de pacientes.
- Calcular la especificidad y sensibilidad de las CLL κ y λ en LCR, y del índice kappa respecto al diagnóstico temprano de EM.
- Establecer un punto de corte para el índice kappa, que permita diferenciar los SNA que han progresado a EM de los que se han mantenido estables.
- Establecer la correlación entre el índice kappa y el índice de Tibbling-Link o Índice IgG, que se emplea actualmente en el hospital como prueba paraclínica de laboratorio de apoyo al diagnóstico de la EM.
- Estudiar la concordancia entre el índice kappa y las BOCG, también empleadas actualmente como prueba paraclínica de laboratorio de apoyo al diagnóstico de la EM.
- Relacionar los valores del índice kappa y los parámetros clínicos habituales de diagnóstico de la EM, como son los parámetros de RM o los de discapacidad del paciente (EDSS) a lo largo de su historia natural.

DISEÑO Y METODOLOGÍA

DISEÑO Y METODOLOGÍA

1. SELECCIÓN DE MUESTRAS

Para la realización de esta tesis doctoral se seleccionaron las muestras de pacientes cedidas por el Nodo Biobanco Hospitalario Virgen Macarena [Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía (BBSSPA) (Sevilla). Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado para la extracción de las muestras de LCR y suero, y para los estudios de investigación biomédica (ver modelo en anexo 1). Todos los consentimientos informados fueron regulados y aprobados por el Comité Ético de Investigación del centro Hospital Universitario Virgen Macarena (Sevilla) en mayo de 2013 (se incluye copia en el anexo 2). Una ampliación del estudio, fue igualmente regulada y aprobada por el Comité Ético de Investigación de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena y Virgen del Rocío (Sevilla) en abril de 2016 (se incluye copia en el anexo 3). Se asume que todas las muestras y datos cedidos por el Biobanco cumplen los requisitos de calidad y trazabilidad adecuados además de lo exigido en cuanto a muestras para investigación biomédica se trata respecto a la legislación vigente.

ESTUDIO PILOTO

Mediante un estudio transversal retrospectivo se realizó un estudio piloto para evaluar la utilidad clínica del índice kappa como marcador de conversión a EMCD. Para el grupo de estudio se seleccionó la cohorte de pacientes del área Hospitalaria Virgen Macarena compuesta por aquellos sujetos a los que se les había realizado una punción lumbar por presentar SNA como prueba complementaria para su diagnóstico definitivo. Se seleccionaron las muestras del Biobanco, colección paralela a la de rutina en la que se había seguido un control de las mismas. Las condiciones preanalíticas eran conocidas, y podemos asegurar que las muestras no habían sido sometidas a ningún ciclo de congelación-descongelación previo al estudio. Se emplearon muestras pareadas de LCR y suero de los sujetos en estudio.

Como grupo control se utilizaron muestras de pacientes, preferentemente lo más homogéneas posible tanto en edad como en diagnóstico. Dentro de este grupo, definimos tres subgrupos:

- Un grupo más homogéneo en el que todos los pacientes presentaban Hidrocefalia Normotensiva (HN)
- Un segundo grupo en el que se incluyeron pacientes que presentaban enfermedad neurológica no inflamatoria (ENNI) diferente de HN (Esclerosis lateral amiotrófica (ELA), mareo, epilepsia, dolor facial, dolor de cabeza, miscelánea)
- Un tercer grupo en el que se incluyeron pacientes con enfermedades neurológicas inflamatorias (ENI) diferentes de la EM (síndrome de Sjögren, vasculitis, síndrome de Devic, miscelánea)

Como grupo casos se incluyeron aquellos pacientes ya diagnosticados, que habían presentado un SNA como primer evento clínico y un estudio de BOCG como apoyo a su diagnóstico. Además se seleccionaron aquellos sujetos que llevaban al menos dos años de seguimiento tras la presentación de la primera clínica. Los criterios de exclusión se detallan a continuación:

Pacientes con edades inferiores a 14 años. Estos casos pertenecen a pediatría y son casos atípicos de EM muy temprana. Se considera que estos pacientes deben de tratarse de forma particular tanto su estudio como los resultados que se obtienen de las distintas pruebas como consecuencia de la precocidad de la enfermedad.

Pacientes que presentan comorbilidad de gammapatía monoclonal con la EM. En estos pacientes podrían verse afectados los niveles de CLL en circulación y por tanto mostrar un dato erróneo en su determinación.

El grupo casos se dividió en 2 subgrupos: SNA y EMRR. Todos los diagnósticos de los pacientes con EMCD se realizaron mediante la evaluación clínica y la RM del paciente, considerando los criterios de McDonald, y con apoyo de las pruebas de laboratorio (determinación de BOCG).

En la tabla 5 se definen las características de cada grupo de estudio:

	PACIENTES (N)	EDAD MEDIA (rango)	MUJERES (%)
GRUPO CONTROL			
Grupo 1: HN	41	75,72 (40-87)	11 (26,8)
Grupo 2: ENNI	15	39,11 (15-71)	10 (66,7)
Grupo 3: ENI	14	44,77 (30-75)	9 (64,3)
TOTAL	70	61,69 (15-87)	30 (42,9)
GRUPO CASOS			
Grupo 4: SNA	77	35,26 (15-62)	60 (77,9)
Grupo 5: EMRR	29	34,81 (17-57)	17 (58,6)
TOTAL PACIENTES	176	45,70 (15-87)	107 (60,8)

Tabla 5. Características de cada grupo de estudio: grupo control y grupo casos, en relación al número de pacientes, edad y sexo, divididos a su vez en subgrupos. Grupo 1: Hidrocefalia Normotensiva (HN); Grupo 2: enfermedades neurológicas no inflamatorias (ENNI) diferentes de la HN; Grupo 3: enfermedades neurológicas inflamatorias (ENI) diferentes de la EM; Grupo 4: Síndrome Neurológicamente Aislado (SNA); Grupo 5: Esclerosis Múltiple Remitente Recurrente (EMRR).

AMPLIACIÓN DEL ESTUDIO

Se realizó un estudio longitudinal prospectivo para validar la información obtenida en el estudio piloto. La cohorte de estudio estaba formada por pacientes con sospecha de EM a los que se les realizó una punción lumbar. Los diagnósticos definitivos de los pacientes con EM se realizaron mediante la evaluación clínica y la RM del paciente (criterios de McDonald), y con apoyo de las pruebas de laboratorio (determinación de BOCG). Tras la presentación de la primera clínica, se realizó el seguimiento de estos pacientes durante un año. Todos los sujetos procedían de la Unidad de Gestión Clínica de neurología del área Hospitalaria Virgen Macarena. Se

dividió a los pacientes en dos grupos de estudio de acuerdo al punto de corte establecido para el índice kappa en el estudio piloto, grupo 1 (índice kappa normal), y grupo 2 (índice kappa patológico) (ver tabla 6). Al igual que en el estudio piloto, se excluyeron los pacientes pediátricos con edades inferiores a 14 años, por ser casos atípicos de EM muy temprana.

	PACIENTES (N)	EDAD MEDIA (rango)	MUJERES (%)
GRUPO 1 (Índice kappa patológico)	34	39,25 (22-73)	21 (61,8)
GRUPO 2 (Índice kappa normal)	124	50,09 (15-89)	68 (54,8)
TOTAL PACIENTES	158	48,43 (15-89)	89 (56,3)

Tabla 6. Características de cada grupo de estudio en relación al número de pacientes, edad y sexo; Grupo 1: índice kappa patológico, Grupo 2: índice kappa normal.

2. OBTENCIÓN, PROCESAMIENTO Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

El LCR se extrae mediante punción lumbar previo consentimiento firmado del paciente (documento mostrado en el anexo 1). Una vez separadas las células del LCR se alicuota y conserva a una temperatura de -80°C en condiciones de Biobanco hasta su posterior uso (tiempo desde la extracción de la muestra hasta su conservación a -80°C inferior a 2 horas). A la vez, se toma una muestra de sangre del paciente para la obtención posterior del suero. Con el LCR y el suero se realiza la determinación de las BOCG como ayuda al diagnóstico de manera asistencial. Previa firma del consentimiento informado de Biobanco el material excedente de las pruebas diagnósticas se almacena en los equipos frigoríficos del Biobanco para su posterior uso en proyectos de investigación.

3. PARÁMETROS DE LABORATORIO

CUANTIFICACIÓN DE CADENAS LIGERAS LIBRES EN LCR Y EN SUERO

NEFELOMETRÍA

En el estudio piloto los niveles de CLL han sido cuantificados mediante una técnica nefelométrica en el equipo BNII™ (Siemens Healthcare Diagnostics Inc.), usando el kit para kappa libre humana Freelite® (The Binding Site Group Ltd., Birmingham, UK) y el kit para lambda libre humana Freelite® (The Binding Site Group Ltd., Birmingham, UK). La determinación se realizó siguiendo el protocolo establecido para la determinación de Freelite® en el BNII™ según el fabricante del reactivo (The Binding Site Group Ltd., Birmingham, UK). El analizador BNII™ es un sistema cerrado. Los reactivos se introducen en el equipo en viales destapados y a temperatura ambiente, al igual que los viales para la realización de la calibración y de los controles.

PRINCIPIO DEL TEST

Empleamos la técnica de nefelometría de punto final para la cuantificación de las CLL en suero y en LCR (Figura 22). Esta determinación consiste en la determinación de un antígeno soluble, CLL κ o CLL λ respectivamente. Se añade la muestra a la cubeta de reacción que contiene una solución con el anticuerpo correspondiente. Durante la reacción Antígeno-Anticuerpo un rayo de luz pasa a través de la cubeta incrementando su intensidad mientras se forman complejos inmunológicos insolubles. Se mide la luz dispersada en un ángulo fijo de 13-24° respecto a la luz incidente. El anticuerpo presente en la cubeta está en exceso, por lo que la cantidad de complejo inmunológico formado será proporcional a la concentración del antígeno. El nefelómetro BN™II emplea partículas de látex con el anticuerpo específico fijado, más en concreto, partículas de látex poliestireno recubiertas con antisuero de oveja con el anticuerpo policlonal específico para CLL κ o para CLL λ fijado en dichas partículas, con lo que se consigue aumentar la sensibilidad de las mediciones (Figura 23). Esto se basa en que el aumento del tamaño final del complejo inmunológico formado, al estar unido al látex, permite detectar concentraciones bajas de antígeno.

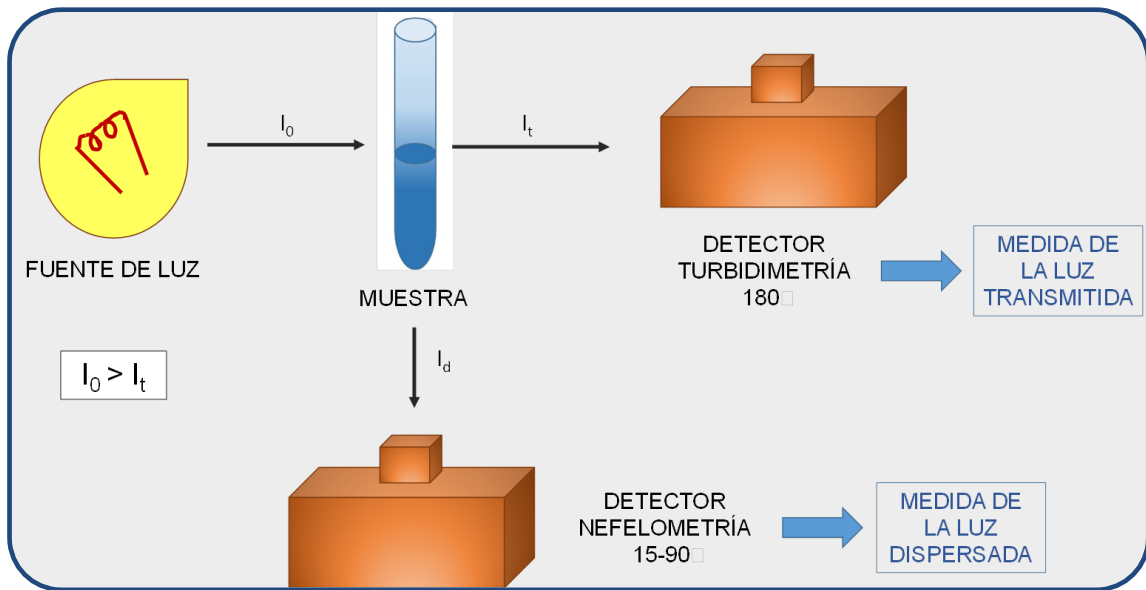


Figura 22. Esquema de un detector turbidimétrico y de un nefelómetro. El detector de turbidimetría se sitúa a 180° y mide la luz transmitida por la fuente de luz. El detector de nefelometría se sitúa entre $15-90^\circ$ y mide la luz dispersada ganando sensibilidad respecto al detector de turbidimetría.

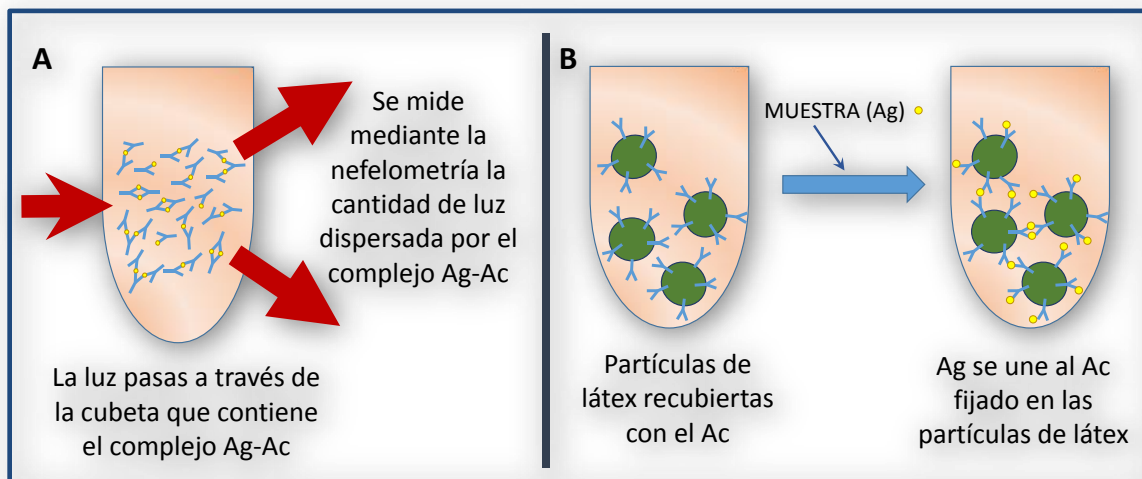


Figura 23. Mecanismo de las técnicas nefelométricas. En la figura A se representa la dispersión de la luz que ocurre al pasar el haz de luz a través de la cubeta que contiene los complejos Ag-Ac. En la figura B se muestra la interacción de los Ag de la muestra con los Ac de las partículas de látex.

REACTIVOS

Reactivo Látex: anticuerpo monoespecífico fijado a partículas de látex poliestireno. Lleva un conservante incluido formado por 0,05% de ProClin™*, 0,1% de ácido E-amino-n-caproico (EACA) y 0,01% de benzamidina.

Calibradores y controles: sueros humanos normales con CLL policlonales Kappa y Lambda respectivamente. Se encuentran en forma líquida estable. Contienen un 0,099% de azida sódica, 0,1% de EACA y 0,01% de benzamidina como conservantes.

Reactivo adicional: conservante 0,099% de azida sódica.

*ProClin™ es una marca registrada de Rohm and Haas Corp., Philadelphia, PA.

CALIBRACIÓN

Para asegurar la calidad de las determinaciones, se realizó una calibración (6 puntos) al comienzo del estudio. La concentración de antígeno de los calibradores es conocida, y se emplea para realizar una curva de calibración sobre la relación entre la medición de la luz difundida y la concentración de antígeno. Las muestras con concentración de antígeno desconocida pueden ensayarse y leerse los resultados en la curva de calibración.

Los 6 puntos de la curva de calibración se obtienen de las diluciones que realiza el equipo: 1/10; 1/20; 1/40; 1/80; 1/160; y 1/320. En las tablas 7 y 8 se muestran las mediciones de la luz difundida (bits) y las concentraciones de antígeno (mg/L) de ambas series de calibradores, kappa libre humano y lambda libre humano respectivamente; también se indican las desviaciones respecto al valor verdadero y la desviación media para kappa libre humano y lambda libre humano. Además se muestra la representación gráfica de las curvas de calibración (Figuras 24 y 25).

PUNTO	DILUCIÓN	CONCENTRACION (mg/L)	VALOR (bits)	DESVIACIÓN
1	1/320	0,0534	147	-0,44
2	1/160	0,1069	284	1,91
3	1/80	0,2438	549	-3,14
4	1/40	0,4275	1227	4,29
5	1/20	0,8550	2248	-3,75
6	1/10	1,7100	4194	1,28
Calibración para CLL kappa				2,47

Tabla 7. Datos obtenidos para la calibración de CLL κ en el BNII™. Se indican las diluciones empleadas para cada punto de la curva, con sus correspondientes concentraciones (mg/L), el valor de la medición de la luz difundida (bits) y la desviación de cada punto respecto al valor verdadero.

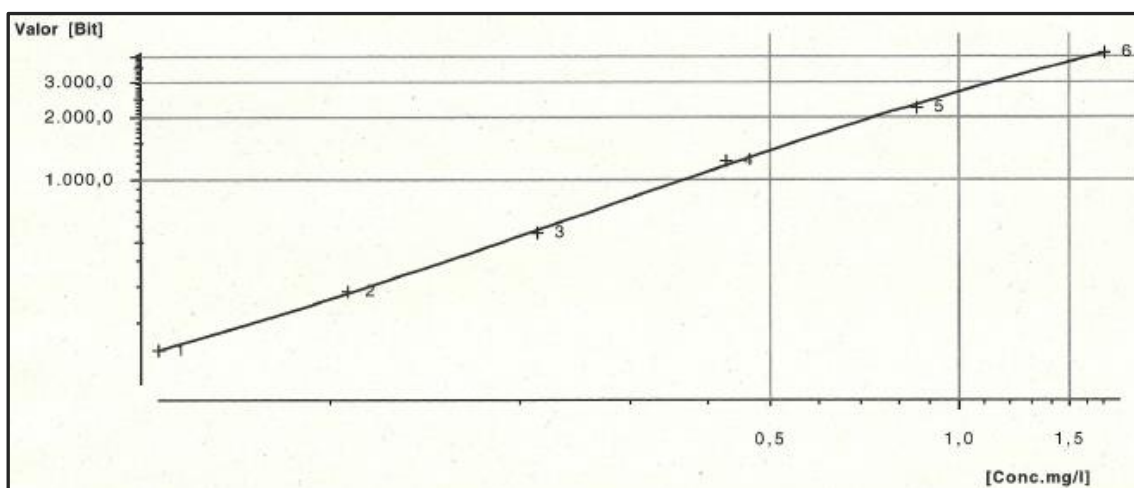


Figura 24. Representación gráfica de la curva de calibración obtenida para la determinación de los valores de CLL κ en el BNII™. En el eje de ordenadas se representa el resultado de la medición de la luz difundida en bits, y en el eje de abscisas se representa la concentración de CLL κ en mg/L para cada punto de la curva de calibración.

PUNTO	DILUCIÓN	CONCENTRACION (mg/L)	VALOR (bits)	DESVIACIÓN
1	1/320	0,0490	108	-2,11
2	1/160	0,0981	250	5,46
3	1/80	0,1961	535	-3,06
4	1/40	0,3922	1330	-1,72
5	1/20	0,7845	3379	4,39
6	1/10	1,5690	6639	-2,52
Calibración para CLL lambda				3,21

Tabla 8. Datos obtenidos para la calibración de CLL λ en el BNII™. Se indican las diluciones empleadas para cada punto de la curva, con sus correspondientes concentraciones (mg/L), el valor de la medición de la luz difundida (bits) y la desviación de cada punto respecto al valor verdadero.

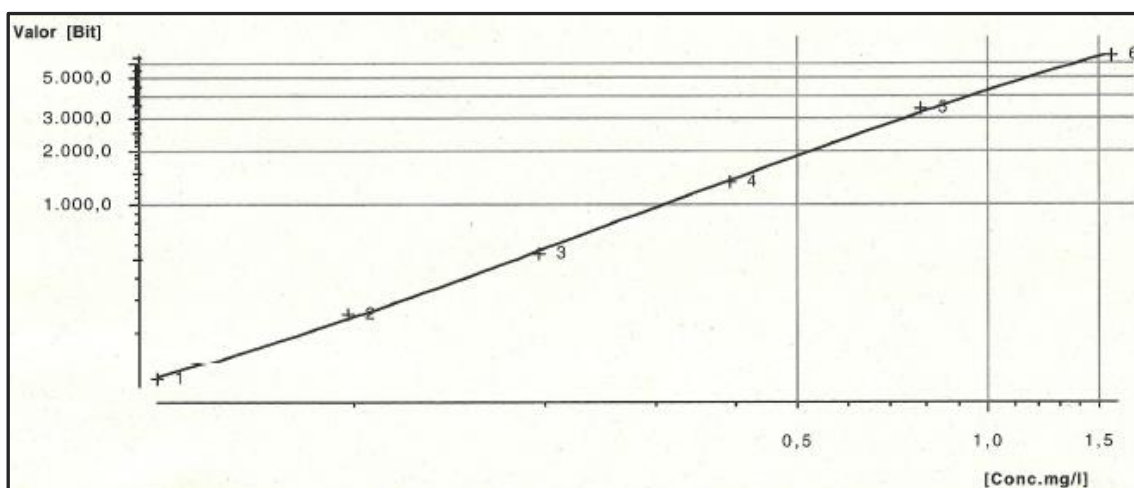


Figura 25. Representación gráfica de la curva de calibración obtenida para la determinación de los valores de CLL λ en el BNII™. En el eje de ordenadas se representa el resultado de la medición de la luz difundida en bits, y en el eje de abscisas se representa la concentración de CLL λ en mg/L para cada punto de la curva de calibración.

El analizador está preparado para rechazar las curvas de calibración con una desviación media de todos los puntos de $> 7\%$. En aquellos casos en los que el valor medio es aceptado, debe rechazarse si en alguno de los puntos la desviación es $\geq 10\%$.

Durante la realización del estudio no fue necesario realizar nuevas calibraciones. El lote de los controles y reactivos se mantuvo a lo largo del análisis. Se deben realizar nuevas curvas de calibración cuando se realice un cambio en los lotes de los controles y/o reactivos. En el caso de que alguno de los controles se encontrara fuera del rango aceptado, estaríamos ante otra situación en la que sería necesario repetir la curva de calibración.

CONTROLES

Antes de proceder a analizar las muestras se procesaron diariamente un control de calidad bajo (QC1) y un control de calidad alto (QC2) para la determinación de CLL κ y CLL λ respectivamente. El volumen mínimo de muestra para poder realizar las determinaciones es de 300 μL .

Los controles fueron rechazados para desviaciones $> 1,96 \cdot \text{DS}$. Se representan en las figuras 26-29 los gráficos de Levey-Jennings que recogen los resultados de los controles medidos al comienzo de cada día de estudio: QC1 y QC2 para CLL κ y CLL λ respectivamente. La línea continua representa el valor medio esperado para cada QC, y las líneas punteadas representan $1,96 \cdot \text{DS}$.

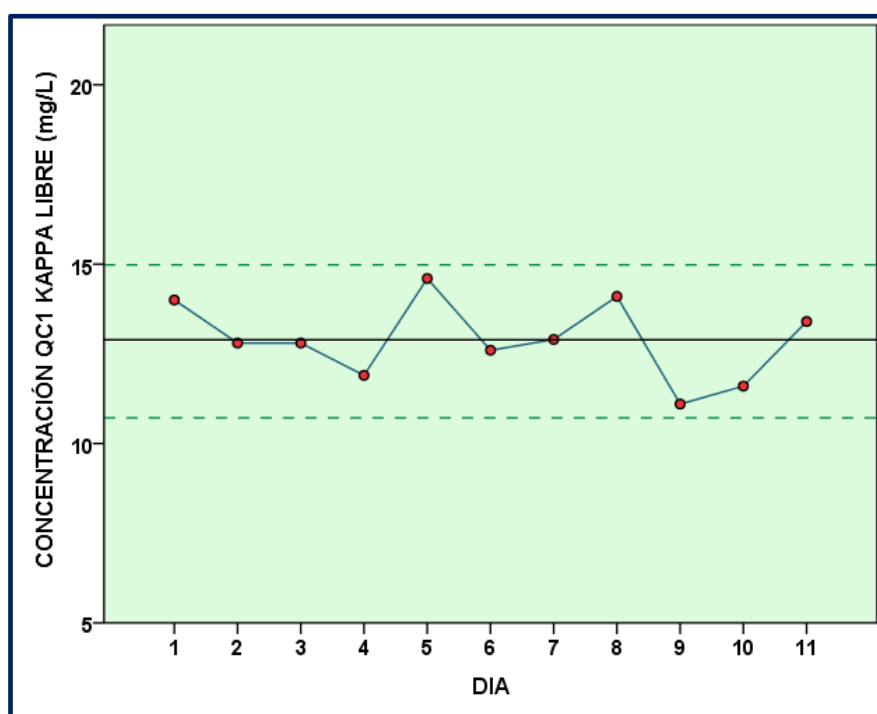


Figura 26. Gráfico de Levey-Jennings para los controles QC1 (nivel bajo) de CLL κ en el BNII™.

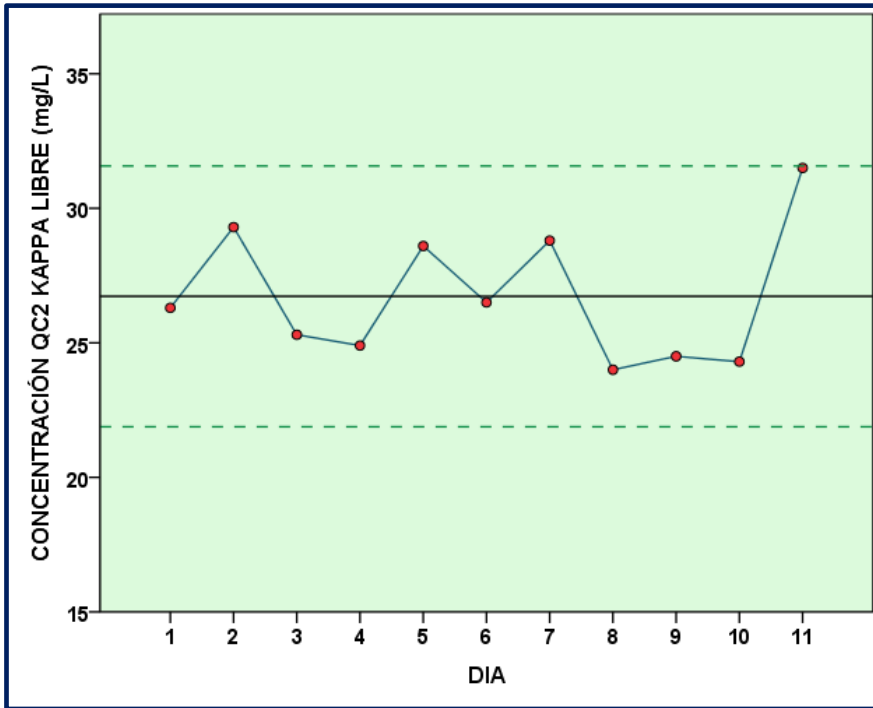


Figura 27. Gráfico de Levey-Jennings para los controles QC2 (nivel alto) de CLL κ en el BNII™.

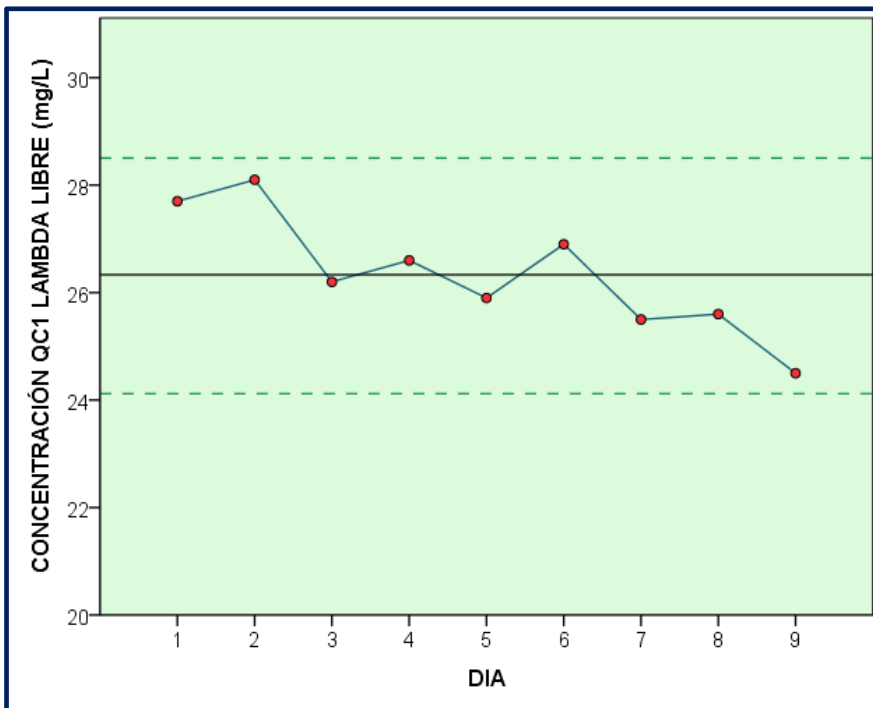


Figura 28. Gráfico de Levey-Jennings para los controles QC1 (nivel bajo) de CLL λ en el BNII™.

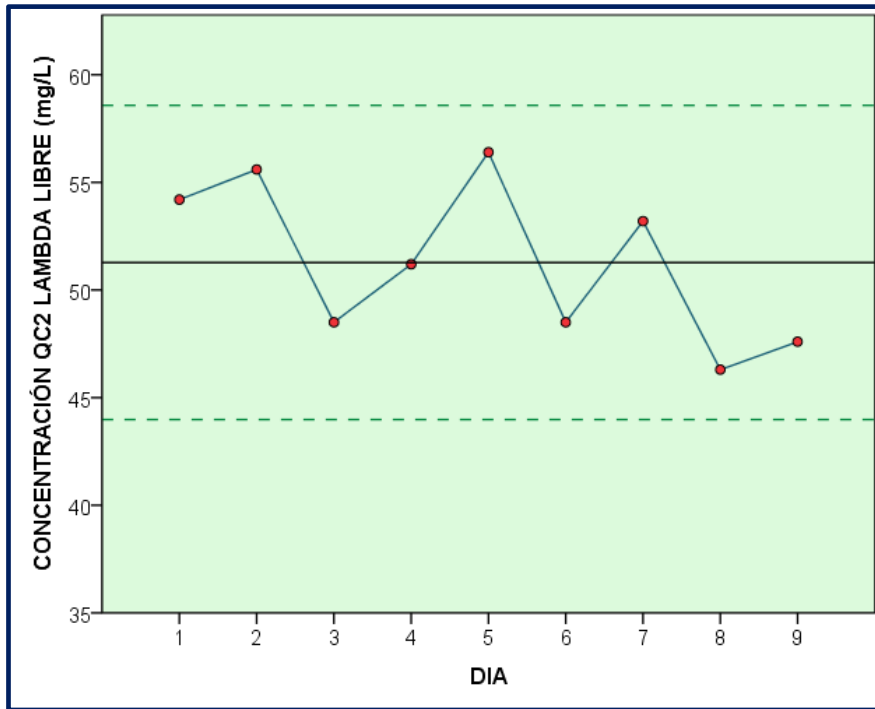


Figura 29. Gráfico de Levey-Jennings para los controles QC2 (nivel alto) de CLL λ en el BNII™.

Los coeficientes de variación (CV) más bajos se obtuvieron para los valores bajos de los QC, tanto para las CLL κ , como para las CLL λ , 8,43% y 4,28% respectivamente. Como se observa en las figuras 26-29, todos los puntos de QC se encuentran dentro del rango de aceptación de la media $\pm 1,96 \cdot DS$ (ver resto de datos de QC en tabla 9).

	CLL KAPPA		CLL LAMBDA	
	QC1	QC2	QC1	QC2
VALOR ASIGNADO (mg/L)	13,10	27,60	27,90	57,50
MEDIA VALORES MEDIDOS (mg/L)	12,89	26,73	26,33	51,28
DS	1,0876	2,4718	1,1280	3,7231
CV	0,0843	0,0924	0,0428	0,0726
CV (%)	8,43	9,24	4,28	7,26
MEDIA ± 1,96*DS	10,76-15,02	21,88-31,57	24,12-28,54	43,98-58,58

Tabla 9. Datos obtenidos para los controles procesados en el equipo BNII™: valor asignado por el fabricante (mg/L), media de los valores medidos (mg/L), desviación estándar (DS), y coeficiente de variación (CV) para cada control. Además, se indica el intervalo de aceptación de los controles empleando la media calculada $\pm 1,96*DS$.

MUESTRAS

Como ya se ha indicado, el volumen mínimo de muestra para poder realizar las determinaciones es de 300 μL . Las muestras de LCR se procesaron sin necesidad de hacer diluciones en primera instancia. Sin embargo, las muestras de suero al presentar concentraciones mayores de CLL fueron diluidas directamente a 1/100 de manera automática por el equipo de medición.

Para algunas de las muestras fue necesario realizar diluciones mayores (en el caso de LCR): 1/5, 1/20 y 1/100; o diluciones menores (para el caso del suero) 1/20, 1/5 y 1/1 para poder cuantificar las muestras dentro de los rangos de medición del equipo. Todas las diluciones fueron realizadas automáticamente por el equipo de medición una vez programadas en el mismo.

En la tabla 10 se representan los rangos de medición aproximados según las diluciones automáticas empleadas por el equipo de medición BNII™. La sensibilidad del equipo es de 0,05 mg/L.

DILUCIÓN	RANGO APROXIMADO (mg/L)
1/1	0,05-1,9
1/5	0,3-9,5
1/20	1,2-38,0
1/100	5,9-190

Tabla 10. Rangos de medición para las CLL según la dilución de la muestra en el BNII™.

La dilución estándar a 1/100 para los sueros, proporciona un rango de medición aproximado de 5,9-190 mg/L, dentro del cual se sitúan los valores normales de CLL en suero. Los valores normales de referencia en suero de adultos para CLL κ incluyen el intervalo 3,3-19,4 mg/L; y para CLL λ 5,7-26,3 mg/L (Katzmann JA, 2002). Para CLL en LCR no se han determinado los valores normales de referencia.

Las limitaciones en las medidas nefelométricas en cuanto al exceso de Ag, se solventan con la dilución de las muestras que presentan valores elevados de CLL (Bradwell AR, 2008). Es el procedimiento que hemos seguido en nuestro estudio para evitar las interferencias debidas al exceso de Ag.

Los LCR se realizan a 1/1, es decir, sin dilución, lo que proporciona una sensibilidad en las mediciones de 0,05 mg/L. Usando una dilución de 1/5 en las muestras se consigue una sensibilidad de 0,3 mg/L.

Dentro de las características técnicas proporcionadas por el fabricante, se indica la precisión obtenida en el estudio de CLL en suero: en el intraensayo se realizaron 10 mediciones para cada muestra en la misma serie de análisis, y para el interensayo se analizaron las muestras en 10 series de análisis diferentes (resultados en tabla 11). Para el estudio de precisión de las CLL en LCR, se siguieron las guías CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute) *User Verification of Performance for Precision and Trueness: Approved Guideline- Second Edition (EP15-A2)*, se realizaron mediciones de cada muestra durante 5 días, realizando dos repeticiones por día (resultados en tabla 12).

INTRAENSAYO PARA CLL (SUERO)			
	Suero 1	Suero 2	Suero 3
MEDIA (mg/L)	13,56	32,76	51,06
CV (%)	3,10	4,84	4,23
INTERENSAYO PARA CLL (SUERO)			
	Suero 1	Suero 2	Suero 3
MEDIA (mg/L)	12,02	32,17	54,66
CV (%)	6,27	8,38	7,40

Tabla 11. Estudio de precisión para CLL en suero para el equipo de medición BNII™ (Siemens Healthcare Diagnostics Inc.) proporcionado por el fabricante.

INTRAENSAYO PARA CLL (LCR)			
	LCR 1	LCR 2	LCR 3
MEDIA (mg/L)	0,10	0,54	1,20
CV (%)	13	3,3	2,8
INTERENSAYO PARA CLL (LCR)			
	LCR 1	LCR 2	LCR 3
MEDIA (mg/L)	0,1	0,54	1,20
CV (%)	2,1	0,0	1,7

Tabla 12. Estudio de precisión para CLL en LCR para el equipo de medición BNII™ (Siemens Healthcare Diagnostics Inc.) proporcionado por el fabricante.

TURBIDIMETRÍA

Para la ampliación del estudio, y debido a cambios en la gestión del laboratorio de inmunología, se modificó el equipo de medición de CLL. Se cuantificaron las muestras mediante turbidimetría en el equipo SpaPlus® (The Binding Site Group Ltd., Birmingham, UK), usando el kit para kappa libre humana Freelite® (The Binding Site Group Ltd., Birmingham, UK). La determinación se realizó siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. El analizador SpaPlus® es un sistema cerrado. Los

reactivos se introducen en viales destapados a temperatura ambiente, al igual que los viales para la realización de la calibración y los controles.

PRINCIPIO DEL TEST

Empleamos la técnica de turbidimetría para determinar el antígeno soluble presente en la muestra, que permite cuantificar las CLL κ en suero y en LCR (Figura 22). Se añade la muestra a la cubeta de reacción que contiene una solución con el anticuerpo correspondiente. Durante la reacción Antígeno-Anticuerpo se hace incidir un haz de luz, que incrementa la dispersión de la misma a medida que se van formando los complejos inmunológicos insolubles. Se mide la disminución de la intensidad de luz que incide sobre la muestra, es decir, se mide la luz transmitida. El anticuerpo presente en la cubeta está en exceso, por lo que la cantidad de complejo inmunológico formado será proporcional a la concentración del antígeno. Se incrementa la sensibilidad de la técnica mediante la unión del anticuerpo a partículas de mayor tamaño que incrementan la señal emitida por el paso de la luz a través de los complejos Antígeno-Anticuerpo. Para ello, se emplean partículas de látex poliestireno recubiertas con antisuero de oveja con el anticuerpo policlonal específico para CLL κ fijado en dichas partículas.

REACTIVOS

Reactivo Látex: anticuerpo monoespecífico fijado a partículas de látex poliestireno. Lleva un conservante incluido formado por 0,05% de ProClin™*, 0,1% de EACA y 0,01% de benzamidina.

Calibradores y controles: sueros humanos normales con CLL policlonales κ respectivamente. Se encuentran en forma líquida estable. Contienen un 0,099% de azida sódica, 0,1% de EACA y 0,01% de benzamidina como conservantes.

Reactivo adicional: conservante 0,099% de azida sódica.

*ProClin™ es una marca registrada de Rohm and Haas Corp., Philadelphia, PA.

CALIBRACIÓN

Para asegurar la calidad de las determinaciones, se realiza una calibración (6 puntos) al comienzo del estudio. La concentración de antígeno de los calibradores es

conocida (0,400 mg/L, 1,480 mg/L, 3,450 mg/L, 8,890 mg/L, 12,840 mg/L, 17,780 mg/L), y se emplea para realizar una curva de calibración sobre la relación entre la medición de la luz transmitida y la concentración de antígeno. Las muestras con concentración de antígeno desconocida pueden ensayarse y leerse los resultados en la curva de calibración. En la figura 30 se muestra la representación gráfica de una de las curvas de calibración empleadas en el estudio. Se realizaron nuevas curvas de calibración debido a cambios en el lote de los controles y reactivos.

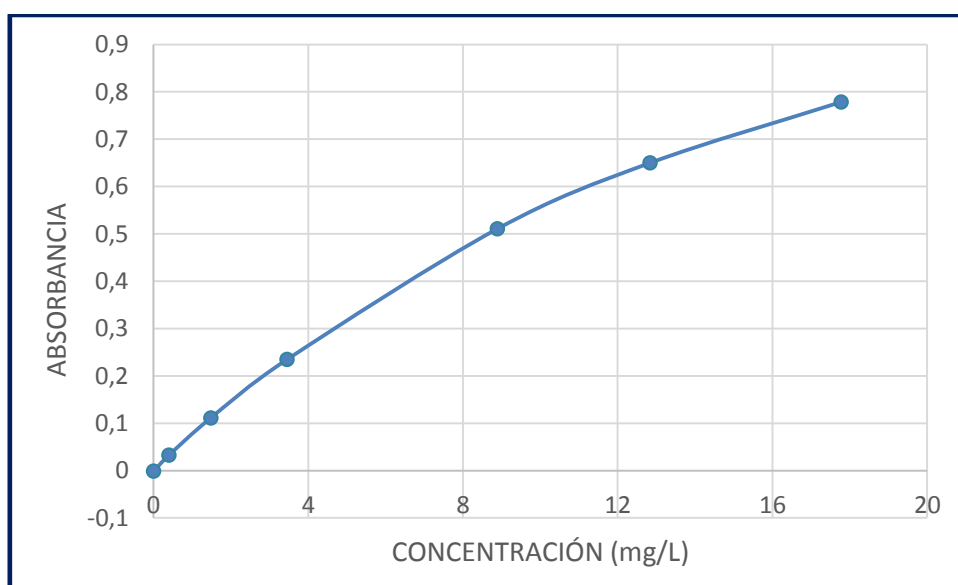


Figura 30. Representación gráfica de la curva de calibración obtenida para la determinación de los valores de CLL κ en el SpaPlus®.

CONTROLES

Antes de proceder a analizar las muestras se procesaron diariamente un control de calidad bajo (QC1) y un control de calidad alto (QC2) para la determinación de CLL κ . El volumen mínimo de muestra para poder realizar las determinaciones es de 150 μ L.

Los controles fueron rechazados para desviaciones $> 1,96 \cdot DS$. Se representan en las figuras 31 y 32 los gráficos de Levey-Jennings que recogen los resultados de los controles medidos al comienzo de cada día de estudio: QC1 y QC2 para CLL κ . La línea

continua representa el valor medio esperado para cada QC, y las líneas punteadas representan $1,96 \cdot DS$ (datos en tabla 13).

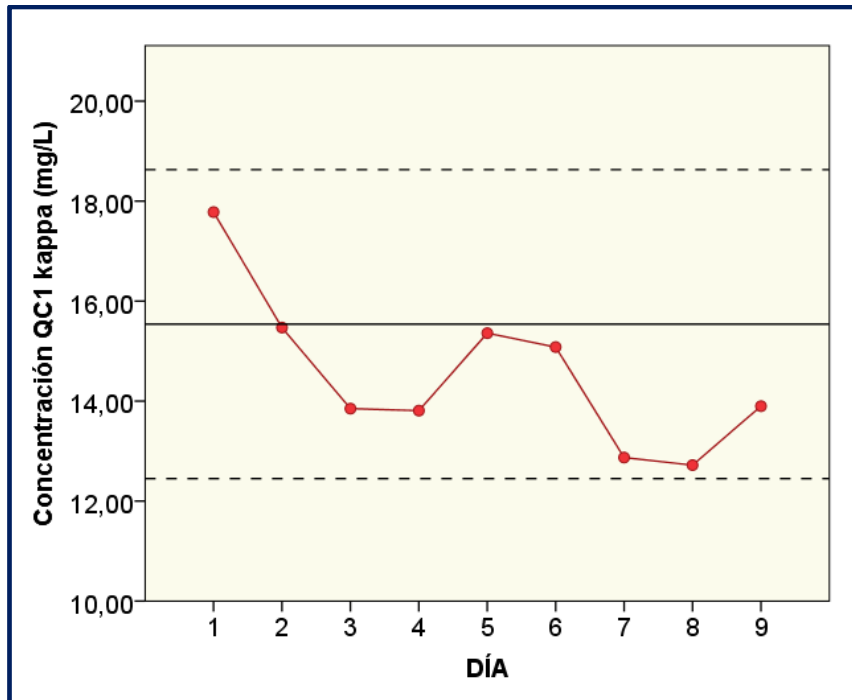


Figura 31. Gráfico de Levey-Jennings para los controles QC1 (nivel bajo) de CLL κ en el SpaPlus®.

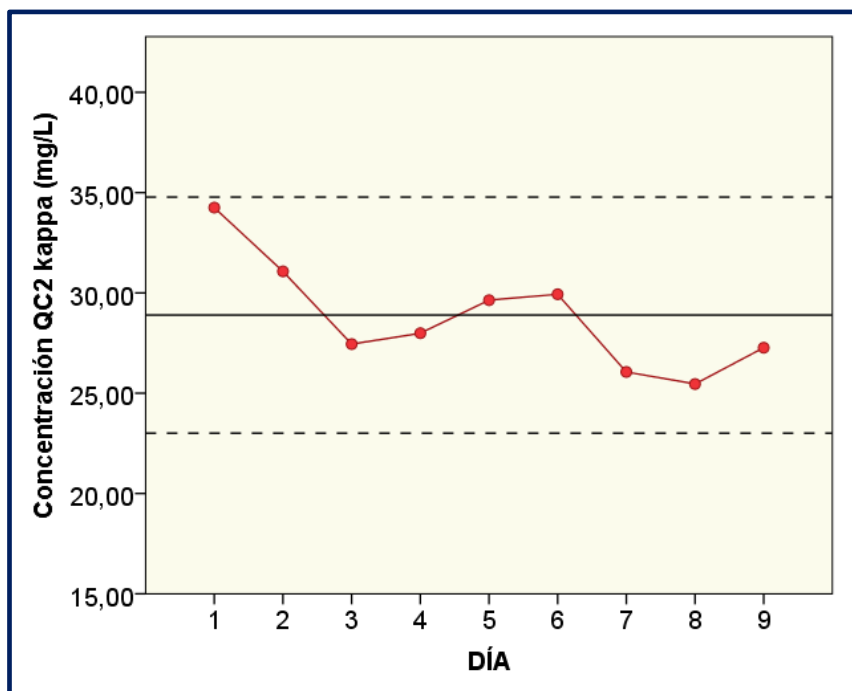


Figura 32. Gráfico de Levey-Jennings para los controles QC2 (nivel alto) de CLL κ en el SpaPlus®.

	CLL KAPPA	
	QC1	QC2
VALOR ASIGNADO (mg/L)	15,80	31,40
MEDIA VALORES MEDIDOS (mg/L)	15,54	28,90
DS	1,5750	3,0026
CV	0,1014	0,1039
CV (%)	10,14	10,39
MEDIA \pm 1,96*DS	12,45-18,63	23,01-34,78

Tabla 13. Datos obtenidos para los controles procesados en el SpaPlus®: valor asignado por el fabricante (mg/L), media de los valores medidos (mg/L), desviación estándar (DS), y coeficiente de variación (CV) para cada control. Además, se indica el intervalo de aceptación de los controles empleando la media calculada \pm 1,96*DS.

MUESTRAS

Las muestras de LCR se procesaron sin necesidad de hacer diluciones en primera instancia. Antes de cada medición de LCR se realizó un lavado de las cubetas con hipoclorito sódico, para evitar un posible carryover (contaminación) debido a la mayor concentración de CLL en las muestras de suero respecto a las de LCR. Sin embargo, las muestras de suero al presentar concentraciones mayores de CLL fueron diluidas directamente a 1/10 de manera automática por el equipo de medición.

El rango de medición aproximado del equipo sin dilución es de 0,1-18 mg/L. Para una dilución 1/10, el rango es de 1-180 mg/L. Por lo que para algunas muestras de LCR fue necesario realizar una dilución 1/10 que se realizó de forma manual con el diluyente proporcionado por el fabricante. La sensibilidad del equipo es de 0,1 mg/L.

Para evitar las interferencias debidas al exceso de Ag, el SpaPlus® presenta un sistema de detección automático del exceso de Ag.

Dentro de las características técnicas proporcionadas por el fabricante, se indica la precisión obtenida para las CLL en suero, siguiendo las guías CLSI *Precision Performance of Clinical Chemistry Approved Guideline (EP5-A)*, se procesaron las muestras durante 21 días, realizando dos mediciones por día (resultados en tabla 14). Mientras que para el estudio de la precisión de CLL en LCR, se realizaron mediciones de cada muestra durante 5 días, realizando dos repeticiones por día (resultados en tabla 15).

INTRAENSAYO PARA CLL (SUERO)			
	Suero 1	Suero 2	Suero 3
MEDIA (mg/L)	7,21	35,72	123,77
CV (%)	3,3	1,6	1,8
INTERENSAYO PARA CLL (SUERO)			
	Suero 1	Suero 2	Suero 3
MEDIA (mg/L)	7,21	35,72	123,77
CV (%)	4,2	1,9	2,3

Tabla 14. Estudio de precisión para CLL en suero para el equipo de medición SpaPlus® (The Binding Site Group Ltd., Birmingham, UK) proporcionado por el fabricante.

INTRAENSAYO PARA CLL (LCR)			
	LCR 1	LCR 2	LCR 3
MEDIA (mg/L)	-	-	-
CV (%)	9,8	3,3	1,8
INTERENSAYO PARA CLL (LCR)			
	LCR 1	LCR 2	LCR 3
MEDIA (mg/L)	-	-	-
CV (%)	10,1	4,0	6,8

Tabla 15. Estudio de precisión para CLL en LCR para el equipo de medición SpaPlus® (The Binding Site Group Ltd., Birmingham, UK) proporcionado por el fabricante.

DETERMINACIONES PREVIAS AL ESTUDIO

Aunque el diagnóstico de EM sigue basándose principalmente en datos clínicos, en ciertos casos, es de gran utilidad la determinación de la síntesis intratecal de IgG. Es importante su determinación en aquellos casos en los que los resultados clínicos son dudosos o insuficientes para alcanzar un diagnóstico adecuado. La concentración de IgG en LCR está incrementada en los pacientes con EM debido a la síntesis intratecal. La detección de un perfil oligoclonal de IgG exclusivo del LCR permite confirmar el diagnóstico de EM en el contexto clínico adecuado.

La principal limitación de la determinación de IgG de origen local en SNC viene dada por la falta de especificidad, ya que la síntesis intratecal se presenta en diversas enfermedades neurológicas diferentes a la EM, especialmente las que presentan una afectación inflamatoria central. El análisis cualitativo de la síntesis intratecal se realiza mediante el estudio de BOCG, incluido dentro de los Criterios de McDonald de 2001. La cuantificación de la IgG permite distinguir entre enfermedades asociadas a una mayor o menor producción intratecal de IgG. Como ya se ha descrito en la introducción, son numerosos los índices y fórmulas descritos en la bibliografía que permiten cuantificar la síntesis intratecal de IgG (Cordero M., 1997) de los cuáles el más utilizado hasta la fecha es el índice de Tibbling-Link (índice IgG).

Debido a la gran importancia que tienen la determinación de BOC y el análisis del índice IgG en el apoyo al diagnóstico de la EM y en el desarrollo de nuestro estudio, detallaré la metodología que se emplea en nuestro laboratorio para su análisis.

DETERMINACIÓN DE BANDAS OLIGOCLONALES

El análisis de BOC se realiza por el método de isoelectroenfoque. Esto se basa en el principio de que todas las proteínas presentes en LCR y suero se separan según su punto isoeléctrico empleando un gradiente de pH, en un gel de agarosa. Una vez finalizado el isoelectroenfoque, se transfieren las proteínas a una membrana de nitrocelulosa donde se incuban con anticuerpos frente a IgG e IgM marcados. Se añade una solución sustrato que permite visualizar las bandas. La presencia de bandas en LCR pero no en suero, es indicativo de EM.

DETERMINACIÓN DEL INDICE IgG (INDICE DE TIBBLING-LINK)

En nuestro laboratorio empleamos el índice IgG o índice de Tibbling-Link, que se encuentra integrado en un software acoplado al equipo de nefelometría. Los niveles de IgG y albúmina tanto en suero como en LCR son cuantificados en el equipo automatizado BNII™ de Siemens Healthcare Diagnostics Inc.

Para observar los resultados de una manera más visual, se construyen los diagramas de Reiber o Reibergramas empleando el software Protein Statistic in CSF Analysis with Reibergrams, Versión 4.17, desarrollado por los Dres. Werner Albaum y Hansotto Reiber de la Universidad de Gottingen, Alemania (2012-2013) y de descarga gratuita. Este software se encuentra validado por el Laboratorio Clínico de la Universidad de Gottingen, Alemania. En estos diagramas, se representan gráficamente Q_{Alb} en el eje de abscisas y Q_{IgX} en el eje de ordenadas (IgX= IgG, IgA e IgM) en función de una línea base que sirve de patrón para obtener el porcentaje de secreción intratecal que presentan los pacientes.

4. PARÁMETROS CLÍNICOS

RESONANCIA MAGNÉTICA

Los resultados de las resonancias magnéticas realizadas a los pacientes son claves para el diagnóstico de EM. En el servicio de neurología se sigue un protocolo para el diagnóstico de la esclerosis múltiple, en el que se mide en cada RM el número de lesiones en T1, el número de lesiones en T2, el número de lesiones en T1 con captación de Gd, y el número de criterios de Barkhof-Tintoré que cumple la RM. Estos datos fueron obtenidos de las historias clínicas de los pacientes en colaboración con los neurólogos de la Unidad de Neurología del Hospital Universitario Virgen Macarena.

ESCALA EXPANDIDA DEL ESTADO DE DISCAPACIDAD (EDSS)

Para establecer el grado de discapacidad de los pacientes se les asigna un valor de acuerdo a la escala EDSS de Kurtzke, que va de 0 (normal) a 10 (muerte por EM), presentando una discapacidad máxima a partir de valores 5-6. Estos datos fueron recogidos de las historias clínicas de los pacientes en colaboración con los neurólogos de la Unidad de Neurología del Hospital Universitario Virgen Macarena.

5. ESTADÍSTICA

Para el análisis estadístico empleamos el programa informático SPSS Statistics versión 20 (2011), el MedCalc versión 11.4.2.0 (2010) y el Epidat (programa para análisis epidemiológico de datos) versión 3.1 (2006) para el cálculo del tamaño muestral.

El primer paso fue calcular el tamaño muestral para el estudio piloto, y a posteriori para la ampliación realizada del estudio.

Se definieron las diferentes variables mediante el análisis descriptivo para poder categorizarlas, y se aplicó el test de Kolmogorov-Smirnov para determinar si las variables seguían la normalidad. Para muestras con menos de 30 casos, se aplicó el test de Shapiro-Wilks.

Para comparar variables cuantitativas (variable dependiente o resultado) frente a variables cualitativas policotómicas (variable independiente o predictora) se emplea el análisis de varianza (ANOVA), que es una generalización del contraste de igualdad de medias para dos muestras independientes. En nuestro caso, no se cumple la normalidad en las variables estudiadas, por lo que empleamos test no paramétricos. Para la comparación entre grupos, usando la mediana de cada uno de ellos, se empleó la prueba de Kruskal-Wallis. Para comparar dos grupos independientes, empleamos la U de Mann-Whitney. Por otro lado, en el caso de que la variable predictora sea ordinal, lo más adecuado es emplear el test de Jonckheere-Terpstra.

Para comparar variables cualitativas entre los grupos estudiados, empleamos el test de Chi cuadrado y el test de Fisher (para tamaños de muestra pequeños). Para el

estudio de variables cuantitativas entre diferentes grupos empleamos el test t de Student.

Mediante el análisis de curvas ROC se determinó la sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de algunas variables, y se establecieron puntos de corte para las variables en estudio.

Mediante el análisis Kaplan-Meier se compararon curvas de supervivencia entre los grupos definidos en el estudio para tal fin. Se obtuvieron los tiempos de conversión medios aplicando el test log-rank.

Los Hazard Ratios (que permiten comparar curvas entre sí), se calcularon mediante la regresión de Cox univariante y multivariante.

El resumen de estimación de un conjunto de cohortes mediante metaanálisis fue realizado con el programa MetaDisc (ES)[®] (versión beta 1.1.1.), y los resultados se sintetizaron con la representación gráfica mediante figuras *forest plot*. Para el metaanálisis se empleó el método de efectos aleatorios (DerSimonian y Laird), y se estimó la heterogeneidad por el valor estadístico Q. El modelo de efectos aleatorios asume que los estudios incluidos en la revisión constituyen una muestra aleatoria de todos los estudios existentes.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. ESTUDIO PILOTO

Para el estudio piloto se estudiaron un total de 176 pacientes, de los cuales un 60,8% eran mujeres (Tabla 5). El porcentaje mayor de mujeres respecto a los hombres es consecuente con los estudios previos, así como la media de edad encontrada en el grupo 5 (EMRR) con una media de 34,81 años (Tabla 5) (Izquierdo G, 2015).

El grupo control formado por 70 pacientes se dividió en 3 grupos como se especifica en el diseño del estudio:

- Hidrocefalia Normotensiva (HN)
- Enfermedades neurológicas no inflamatorias (ENNI) diferentes de la HN
- Enfermedades neurológicas inflamatorias (ENI) diferentes de la EM

El grupo de casos lo forman 77 pacientes con Síndrome Neurológicamente Aislado (SNA) y 29 pacientes con Esclerosis Múltiple Remitente Recurrente (EMRR).

	<i>N</i>	<i>CLL kappa en LCR (mg/L)</i>	<i>CLL lambda en LCR (mg/L)</i>	<i>Índice kappa</i>	<i>Índice lambda</i>
GRUPO CONTROL					
<i>Grupo 1: HN</i>	41	0,16 (0,10-0,22)	0,15 (0,09-0,25)	1,62 (0,99-2,27)	1,28 (0,93-1,68)
<i>Grupo 2: ENNI</i>	15	0,12 (0,10-0,20)	0,08 (0,05-0,10)	3,37 (1,95-7,05)	1,35 (0,96-1,90)
<i>Grupo 3: ENI</i>	14	0,14 (0,04-0,20)	0,07 (0,58-0,14)	2,87 (1,47-7,00)	1,10 (0,81-2,71)
<i>TOTAL</i>	70	0,15 (0,10-0,20)	0,11 (0,07-0,18)	1,96 (1,13-3,56)	1,27 (0,93-1,69)
GRUPO CASOS					
<i>Grupo 4: SNA</i>	77	0,73 (0,13-3,2)	0,18 (0,07-0,68)	35,61 (4,48-132,73)	3,81 (1,49-16,95)
<i>Grupo 5: EMRR</i>	29	1,45 (0,52-6,67)	0,22 (0,09-0,82)	88,00 (33,96-295,13)	5,43 (2,01-19,40)

Tabla 16. Características basales de los pacientes del estudio piloto divididos en 5 grupos: HN (Hidrocefalia Normotensiva), ENNI (enfermedades neurológicas no inflamatorias) diferentes de la HN, ENI (enfermedades neurológicas inflamatorias) diferentes de la EM; SNA (Síndrome Neurológicamente Aislado); EMRR (Esclerosis Múltiple Remitente Recurrente). Se indican las medianas y el rango intercuartílico (RIC) del 95% de cada grupo de estudio.

Dado que las variables estudiadas: CLL κ en LCR, CLL λ en LCR, índice kappa e índice lambda no siguen la normalidad [una vez aplicados los test de normalidad: Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilks (para muestras menores de 30 casos)], se calcularon las medianas y los rangos intercuartílicos para cada grupo.

Inicialmente estudiamos las CLL κ y λ en LCR, y sus respectivos índices. Como se ha observado en estudios previos publicados, es el índice kappa el que muestra una mayor sensibilidad y especificidad clínica para detectar pacientes que presenten EM, siendo el índice lambda menos informativo (Desplat-Jego S, 2005). Como se muestra en la tabla 16, la mediana de los controles para el índice kappa de 1,96 (rango intercuartílico (RIC) del 95%: 1,13-3,56), fue mucho menor que las presentadas por los grupos 4 (SNA) y 5 (EMRR), cuyas medianas fueron 35,61 (RIC del 95%: 4,48-132,73), y

88,00 (RIC del 95%: 33,96-295,13) respectivamente. También se observa un ligero incremento en los niveles de índice lambda en los grupos 4 (SNA) y 5 (EMRR), cuyas medianas fueron 3,81 (RIC del 95%: 1,49-16,95) y 5,43 (RIC del 95%: 2,01-19,40) respectivamente, respecto a la mediana de los controles de 1,27 (RIC del 95%: 0,93-1,69) (Tabla 16).

Cuando estudiamos los cinco grupos de acuerdo a las medianas de las CLL κ y λ en LCR, y de sus respectivos índices, encontramos globalmente diferencias estadísticamente significativas entre ellos aplicando la prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0,0001$).

Para analizar las diferencias entre los diferentes grupos, aplicamos la U de Mann-Whitney. No encontramos diferencias estadísticamente significativas al estudiar los valores de CLL κ en LCR entre los controles, (HN vs ENNI $p=0,182$; HN vs ENI $p=0,139$; ENNI vs ENI $p=0,677$), pero sí entre estos grupos frente a SNA y EMRR (valores p en figura 33); y entre el grupo SNA y EMRR ($p=0,03$).

Para los valores de CLL λ en LCR, no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre el grupo ENNI y el grupo ENI ($p=0,661$), aunque si entre estos grupos frente a HN ($p < 0,0001$ y $p=0,025$). Las diferencias entre los grupos control ENNI y ENI frente a los grupos casos se muestran en la figura 34.

Para el índice kappa se muestran diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos (valores p en figura 35), excepto entre los grupos ENNI y ENI ($p=0,861$).

Por último, para el índice lambda, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los controles (HN vs ENNI $p=0,611$; HN vs ENI $p=0,954$; ENNI vs ENI $p=0,727$), ni entre los grupos 4 (SNA) y 5 (EMRR) ($p=0,267$). Aunque si se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control y los grupos caso (valores p en figura 36).

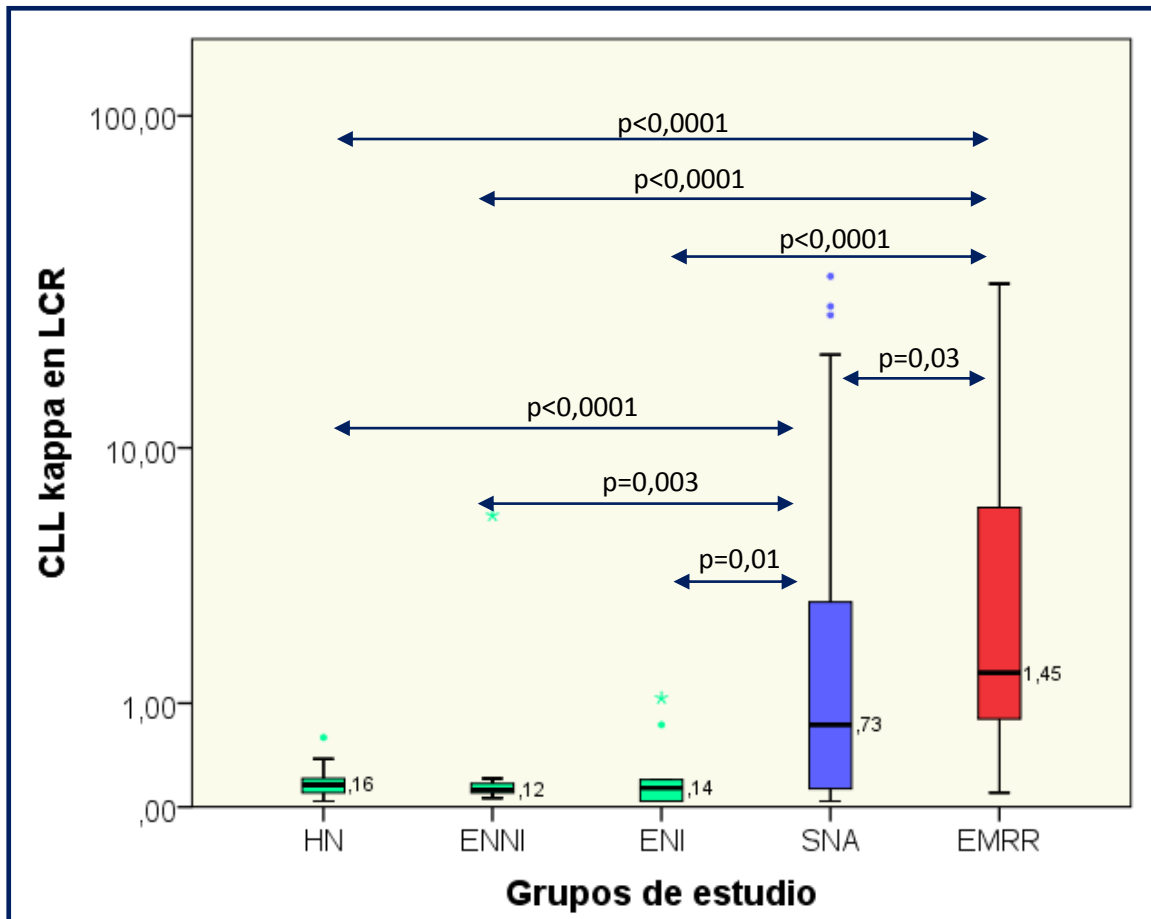


Figura 33. Diagrama de cajas para las CLL kappa en LCR. Se representan la mediana y los percentiles 25 y 75 (cajas coloreadas); el mínimo y máximo (barras de error); y los outliers (*). Cajas verdes corresponden a los controles: HN (hidrocefalia normotensiva) [mediana 0,16], ENNI (enfermedades neurológicas no inflamatorias) distintas de HN [mediana 0,12], ENI (enfermedades inflamatorias) distintas de EM [mediana 0,14]; caja azul: SNA (síndrome neurológicamente aislado) [mediana 0,73]; caja roja: EMRR (EM remitente recurrente) [mediana 1,45]. Se representan los valores p significativos entre los grupos (flechas).

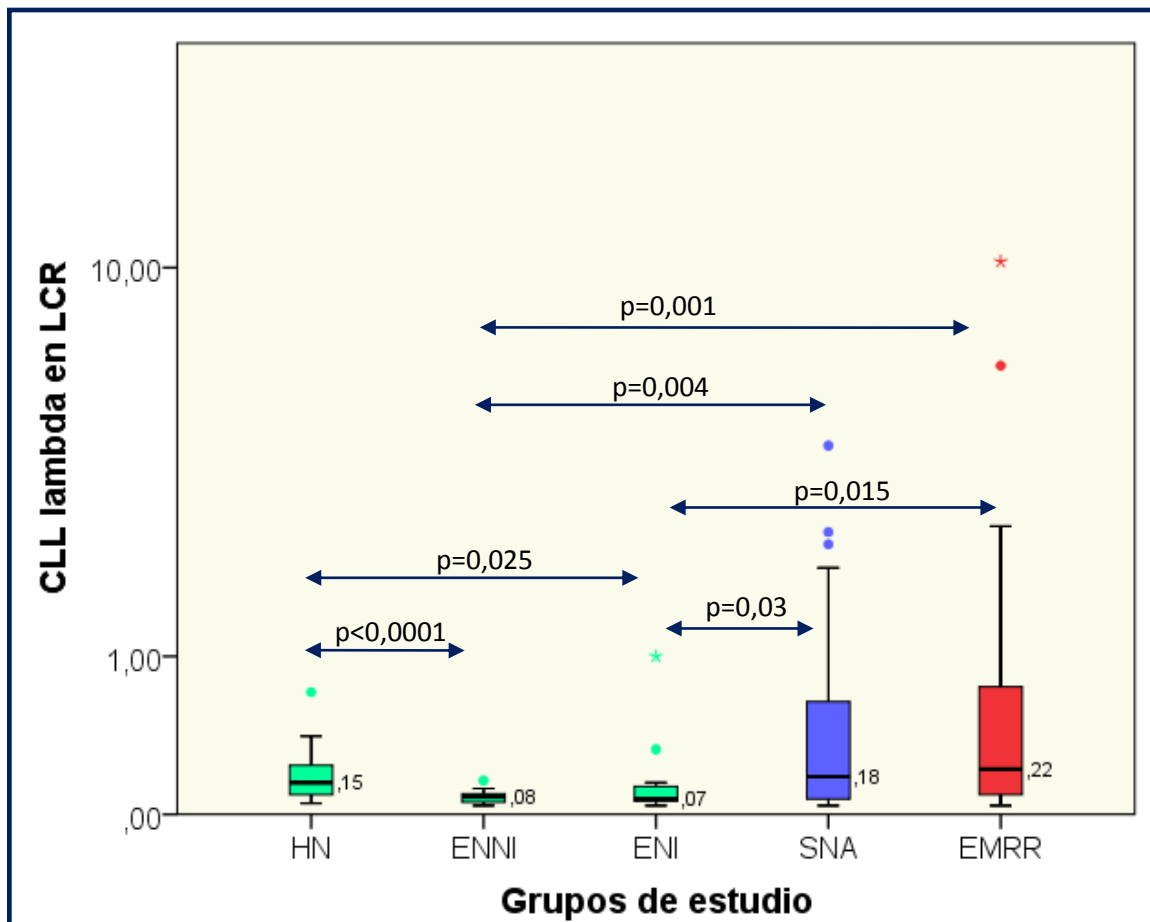


Figura 34. Diagrama de cajas para las CLL lambda en LCR. Se representan la mediana y los percentiles 25 y 75 (cajas coloreadas); el mínimo y máximo (barras de error); y los outliers (*). Cajas verdes corresponden a los controles: HN (hidrocefalia normotensiva) [mediana 0,15], ENNI (enfermedades neurológicas no inflamatorias) distintas de HN [mediana 0,08], ENI (enfermedades inflamatorias) distintas de EM [mediana 0,07]; caja azul: SNA (síndrome neurológicamente aislado) [mediana 0,18]; caja roja: EMRR (EM remitente recurrente) [mediana 0,22]. Se representan los valores p significativos entre los grupos (flechas).

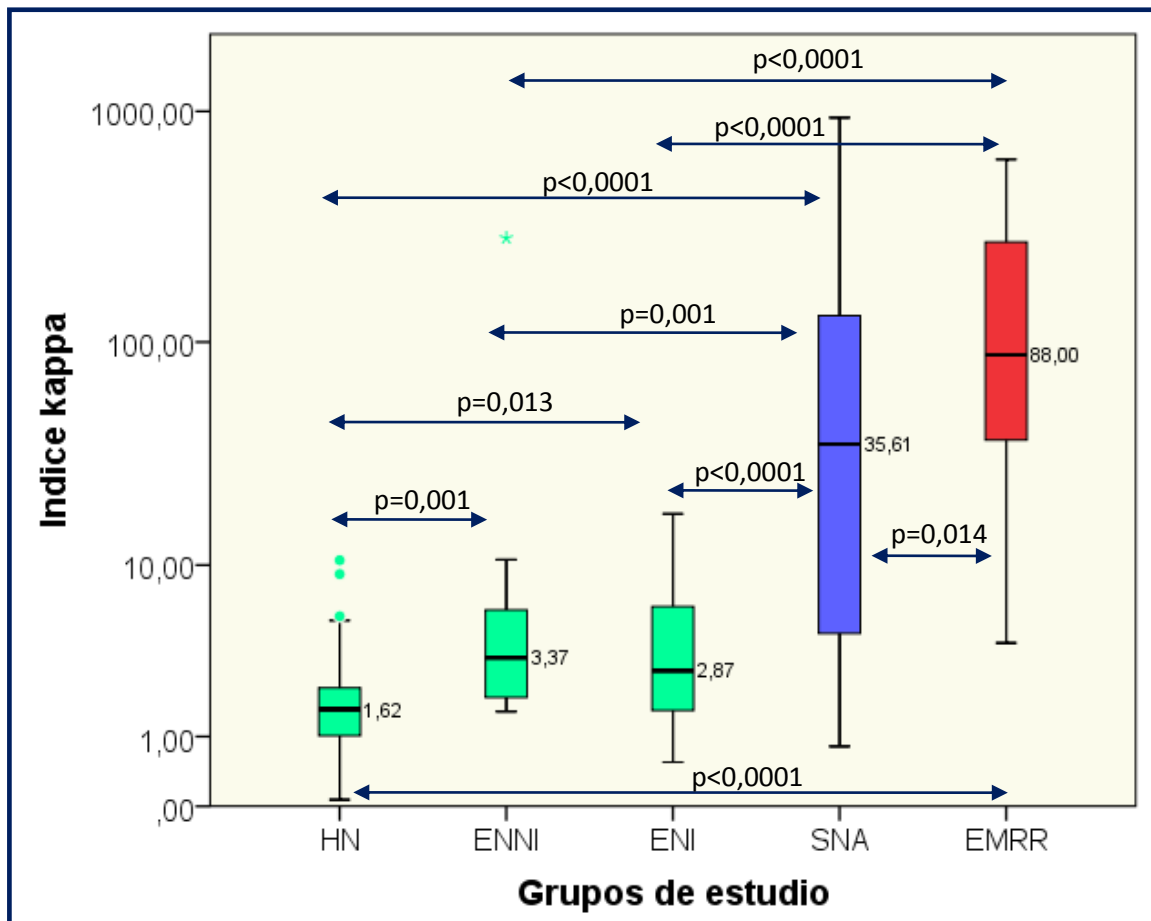


Figura 35. Diagrama de cajas para el índice kappa. Se representan la mediana y los percentiles 25 y 75 (cajas coloreadas); el mínimo y máximo (barras de error); y los outliers (*). Cajas verdes corresponden a los controles: HN (hidrocefalia normotensiva) [mediana 1,62], ENNI (enfermedades neurológicas no inflamatorias) distintas de HN [mediana 3,37], ENI (enfermedades inflamatorias) distintas de EM [mediana 2,87]; caja azul: SNA (síndrome neurológicamente aislado) [mediana 35,61]; caja roja: EMRR (EM remitente recurrente) [mediana 88,00]. Se representan los valores p significativos entre los grupos (flechas).

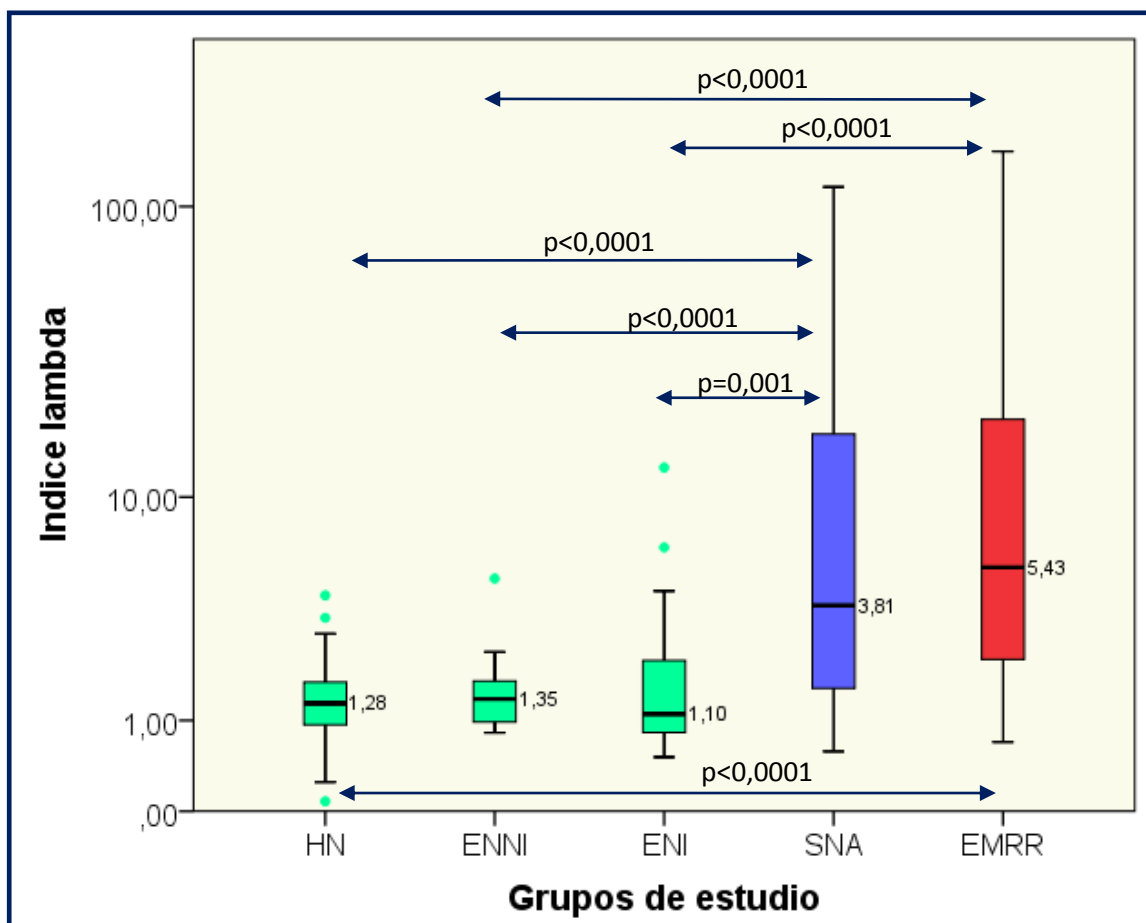


Figura 36. Diagrama de cajas para el índice lambda. Se representan la mediana y los percentiles 25 y 75 (cajas coloreadas); el mínimo y máximo (barras de error); y los outliers (*). Cajas verdes corresponden a los controles: HN (hidrocefalia normotensiva) [mediana 1,28], ENNI (enfermedades neurológicas no inflamatorias) distintas de HN [mediana 1,35], ENI (enfermedades inflamatorias) distintas de EM [mediana 1,10]; caja azul: SNA (síndrome neurológicamente aislado) [mediana 3,81]; caja roja: EMRR (EM remitente recurrente) [mediana 5,43]. Se representan los valores p significativos entre los grupos (flechas).

Se observa que los valores de los 3 grupos de controles se asemejan entre sí, y se diferencian notablemente respecto a los valores de los grupo casos (grupos 4 y 5) para las CLL κ en LCR, y para los índices kappa y lambda. Cabe destacar, que es entre los grupos de controles versus grupo casos donde se presentan principalmente diferencias estadísticamente significativas. Llegados a este punto, podemos considerar los tres grupos control (HN, ENNI y ENI) como un único grupo para simplificar el análisis posterior de los datos (Figura 37).

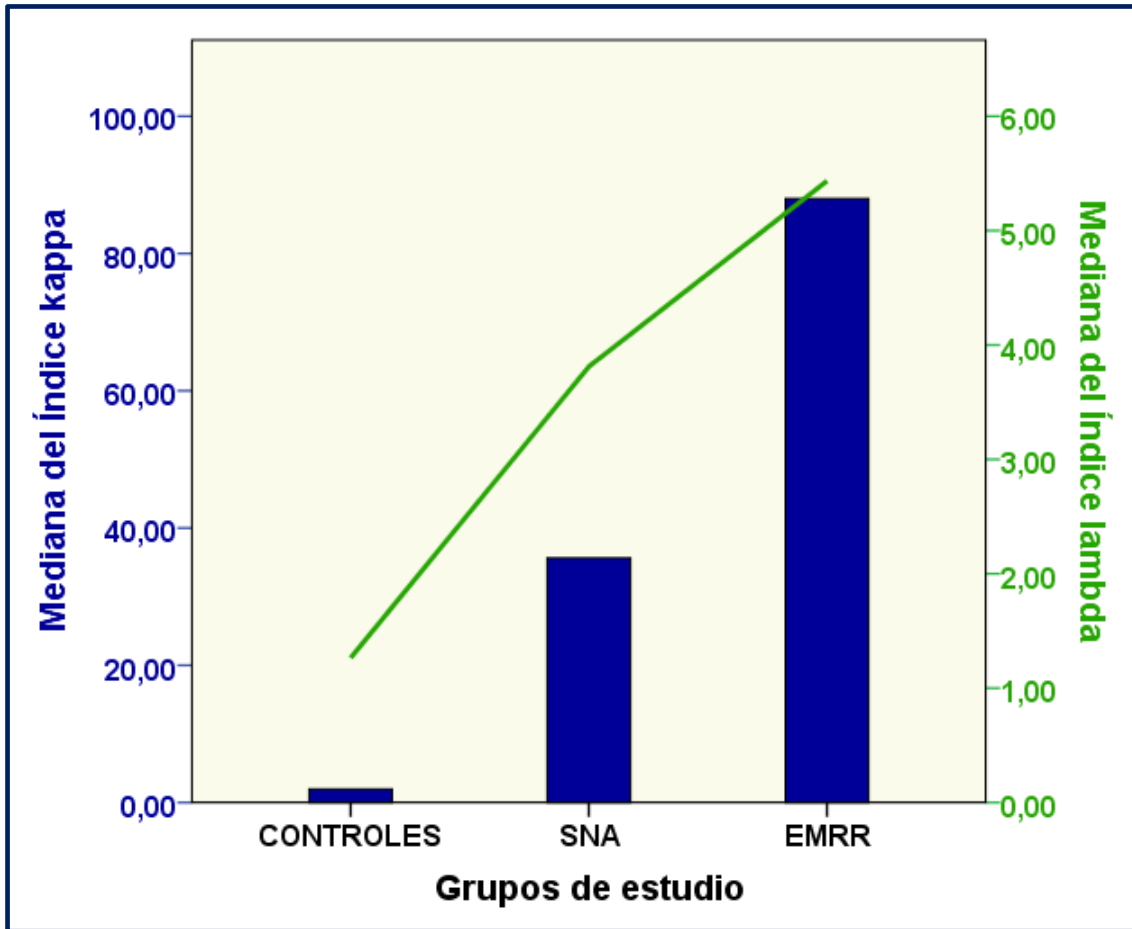


Figura 37. Representación de las medianas del índice kappa (columnas azules) y del índice lambda (línea verde), para cada grupo de estudio: controles (n=70), SNA (síndrome neurológicamente aislado) [n=77], EMRR (EM remitente recurrente) [n=29].

PRIMERA BÚSQUEDA DE UN PUNTO DE CORTE DE CONVERSIÓN DE SNA A EM

La elección de un punto de corte se basa a menudo en el conocimiento biológico del factor de riesgo de una determinada enfermedad, en la experiencia de los clínicos o en resultados previos publicados en otros estudios. Es importante considerar que los puntos de corte obtenidos en otros estudios pueden diferir del nuestro dependiendo de diversos factores (objetivo del estudio, población estudiada, diseño del estudio, etc.). Los métodos estadísticos para la determinación del punto de corte caen en dos grandes categorías: orientado a datos y orientado a resultados.

Métodos orientados a datos: incluyen dicotomizar una variable continua basándose en el cálculo de los cuantiles.

Métodos orientados a resultados: proporcionan un valor de punto de corte que se corresponden con la relación más significativa de los resultados, y se basan en los estadísticos log rank, likelihood ratio y de Wald.

Se espera que se obtengan mejores indicadores empleando los métodos orientados a resultados que los orientados a datos (Mandrekar JN, 2003).

En una primera aproximación determinamos un punto de corte empleando un método orientado a datos. Para ello, calculamos el punto de corte de las CLL κ en LCR, en base al artículo previamente publicado por la Dra. Villar en 2012 (Villar LM, 2012). En él se obtiene un punto de corte a partir de la media más 2 desviaciones estándar (DS) del grupo control.

En nuestra cohorte de pacientes, los valores de CLL κ en LCR no siguen una distribución normal (Figura 38), por lo que lo más correcto en este caso, sería emplear la mediana o realizar una transformación de los datos. Sin embargo, en el grupo control con HN, las CLL κ en LCR, sí siguen una distribución normal (Figura 39). Por tanto, empleamos el valor medio de CLL κ obtenido para este grupo: $0,18 \pm 0,10$ mg/L [media \pm DS]. En esta primera aproximación obtuvimos un **punto de corte de 0,38 mg/L** para las **CLL κ en LCR**.

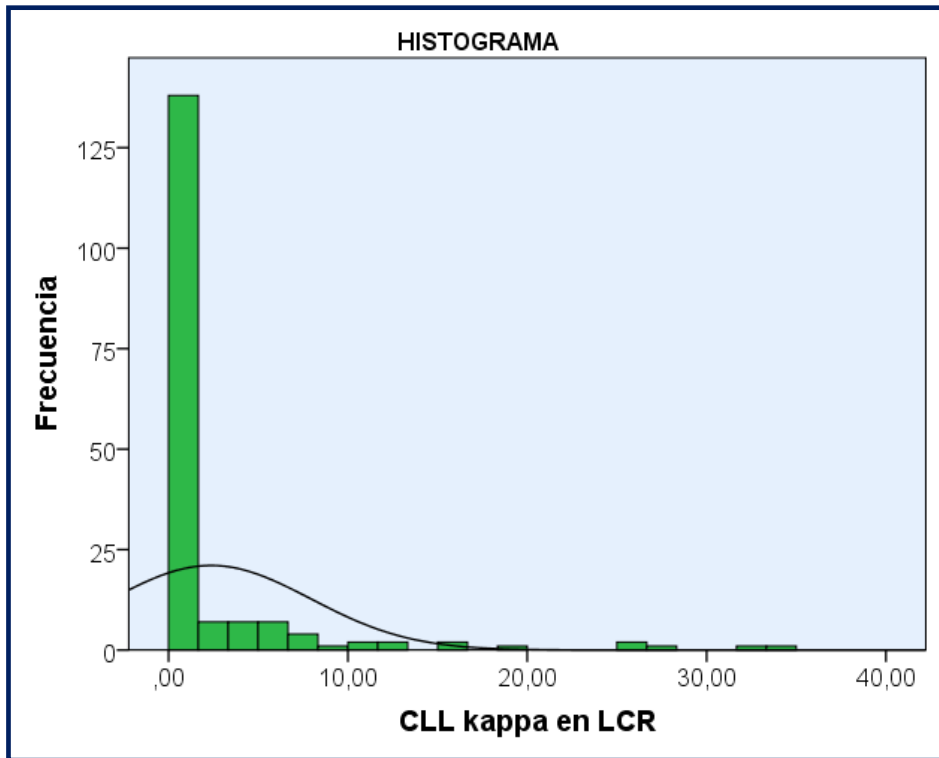


Figura 38. Histograma para las CLL kappa en LCR.

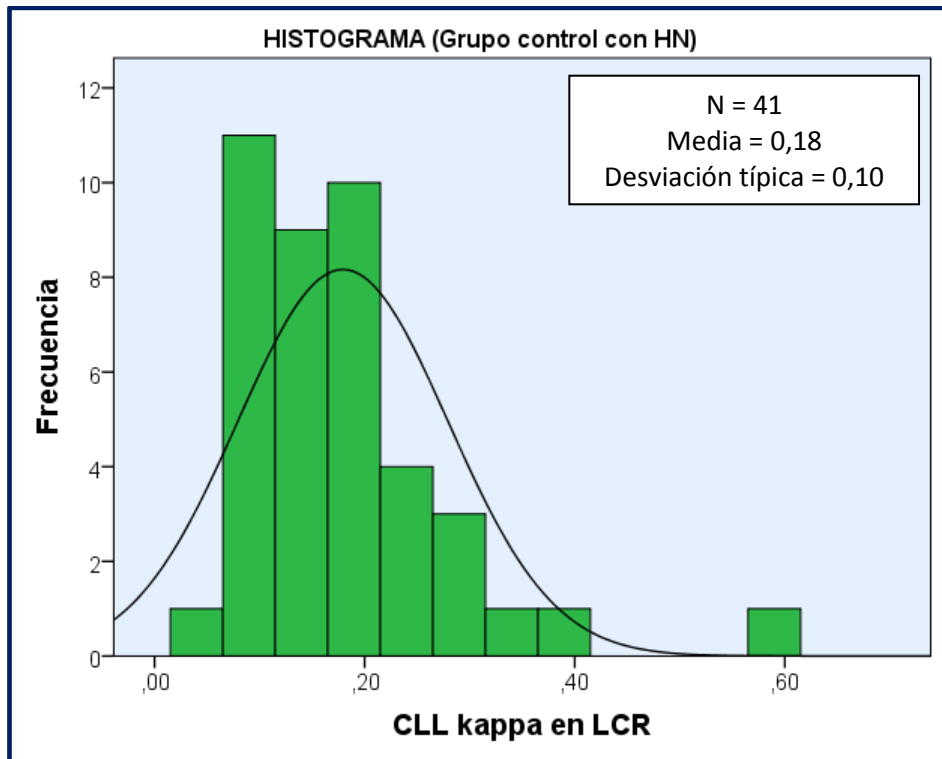


Figura 39. Histograma para las CLL kappa en LCR del grupo control con HN (Hidrocefalia Normotensiva).

Con el punto de corte para las CLL κ en LCR de 0,38 mg/L, dividimos a los pacientes que presentaban SNA en 2 subgrupos (Tabla 17):

- Subgrupo 1: pacientes con CLL κ en LCR > 0,38 mg/L
- Subgrupo 2: pacientes con CLL κ en LCR < 0,38 mg/L

Ambos subgrupos son homogéneos en cuanto a edad y sexo de los pacientes. En el subgrupo 1 todos los pacientes presentan BOCG positivas e índice IgG > 0,56. Además, un mayor número de pacientes cumple criterios de BTC (29) respecto al subgrupo 2 (7). Al combinar criterios de BTC con BOCG, es también en el grupo 1 donde se encuentra un mayor número de pacientes que cumple ambos criterios, 67,4% frente al 13% en el subgrupo con CLL κ en LCR inferior a 0,38 mg/L. No existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos subgrupos en la presencia de contraste con Gd (Gadolinio) positivo, que sería indicativo de actividad de la enfermedad.

CLL κ en LCR (0,38 mg/L)	Subgrupo 1	Subgrupo 2	Valor p
Pacientes (N)	45	32	-
Mujeres (%)	37 (82,2)	23 (71,9)	0,281
Edad media (IC del 95%)	34,6 (31,8-37,3)	36,2 (31,9-40,6)	0,446
BOCG (+/-)	45/0	3/29	<0,0001
BOC IgM (+/-)	23/21	3/11	0,064
Indice IgG (>0,56/<0,56)	45/0	17/15	<0,0001
≥ 3 criterios de BTC (%)	29 (67,4)	7 (30,4)	0,004
Contraste con Gd positivo (%)	12 (18,8)	3 (7,3)	0,153
Cumple criterios de RM y BOCG (si/no)	29/14	3/20	<0,0001
Conversión a EM (%)	35 (77,8)	3 (9,4)	<0,0001

Tabla 17. Datos de laboratorio y clínicos para pacientes con síndrome neurológicamente aislado (SNA) empleando un punto de corte para las CLL κ en LCR de 0,38 mg/L. Subgrupo 1: pacientes con CLL κ en LCR>0,38 mg/L; subgrupo 2: pacientes con CLL κ en LCR<0,38 mg/L. IC: intervalo de confianza. BOCG: bandas oligoclonales IgG, BTC: criterios de Barkhof-Tintoré; Gd: gadolinio; RM: resonancia magnética.

En lo referente a la conversión de SNA a EM, un 77,8% de los pacientes con CLL κ en LCR con un valor superior a 0,38 mg/L convierten a EM. Por otro lado, sólo el 9,4% de los pacientes del subgrupo 2 convierten a EM.

La probabilidad de conversión a EM de los pacientes con SNA considerando el punto de corte de 0,38 mg/L para las CLL κ en LCR, se representa mediante una curva de supervivencia ($p < 0,0001$) (Figura 40), obteniéndose un hazard ratio (HR) = 9,66 (IC del 95%: 5,10-18,30). La mediana de conversión del subgrupo 1 fue de 14 meses con un error estándar de 0,0755.

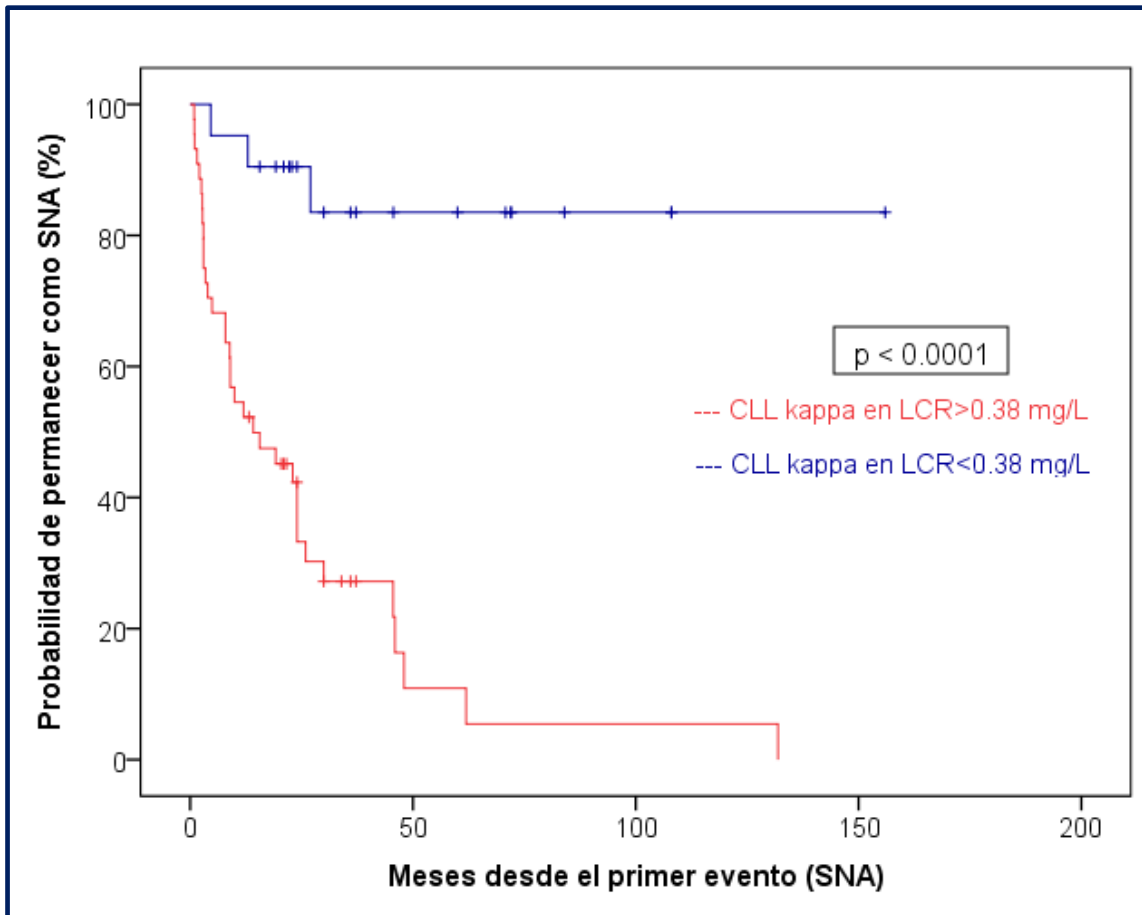


Figura 40. Representación de la curva de supervivencia mediante el análisis Kaplan-Meier de los pacientes con Síndrome Neurológicamente Aislado (SNA), en la que se muestra la probabilidad de permanecer como SNA de acuerdo al punto de corte para las CLL κ en LCR de > 0,38 mg/L (línea roja), valores inferiores a 0,38 mg/L (línea azul). Se representa el tiempo en meses desde el primer evento clínico o SNA. BOCG: bandas oligoclonales IgG.

SEGUNDA BÚSQUEDA DE UN PUNTO DE CORTE DE CONVERSIÓN DE SNA A EM

En una segunda aproximación analizamos las CLL κ y λ en LCR, empleando un método orientado a resultados: las curvas ROC (Receiver Operating Characteristic) presentan la sensibilidad de una prueba diagnóstica que produce resultados continuos, en función de los falsos positivos (complementario de la especificidad), para distintos puntos de corte. El área bajo la curva (ABC) permite evaluar la bondad de una prueba

diagnóstica con resultados continuos. Se suele aceptar como valor aceptable de discriminación cuando ABC supera el valor de 0,7.

Desarrollamos curvas ROC para las variables en estudio (CLL κ y CLL λ en LCR) y para el índice IgG (Figura 41). Para ello analizamos los valores del grupo control (n=70) frente a los valores del grupo EMRR (n=29). El mayor ABC encontrada para las **CLL κ en LCR** fue: 0,906, con una sensibilidad del 75,86% (intervalo de confianza (IC) del 95%: 56,5-89,7) y una especificidad del 97,14% (IC del 95%: 90,1-99,7), para un punto de corte de **0,73 mg/L**. Estos resultados son ligeramente mejores que los obtenidos para el índice IgG: ABC=0,886, con una sensibilidad del 75,86% (IC del 95%: 56,5-89,7) y una especificidad del 94,29% (IC del 95%: 86,0-98,4), para un punto de corte de 0,56. Esta punto de corte para el índice IgG es similar el encontrado en otros estudios previos (Cordero M, 1997). Mientras que las CLL λ en LCR no presentan valores aceptables: ABC=0,677, con una sensibilidad del 44,83% (IC del 95%: 26,4-64,3) y una especificidad del 97,14% (IC del 95%: 90,1-99,7), para un punto de corte de 0,41 mg/L (Tabla 18).

	CLL kappa en LCR (mg/L)	CLL lambda en LCR (mg/L)	Índice IgG
Sensibilidad (IC del 95%)	75,86 (56,5-89,7)	44,83 (26,4-64,3)	75,86 (56,5-89,7)
Especificidad (IC del 95%)	97,14 (90,1-99,7)	97,14 (90,1-99,7)	94,29 (86,0-98,4)
VPP (IC del 95%)	91,7 (73,0-99,0)	86,7 (59,5-98,3)	84,6 (65,1-95,6)
VPN (IC del 95%)	90,7 (81,7-96,2)	81 (70,8-88,7)	90,4 (81,2-96,1)
ABC (valor p)	0,906 (p<0,0001)	0,677 (p=0,0086)	0,886 (p<0,0001)
Punto de corte	0,73	0,41	0,56

Tabla 18. Datos extraídos del análisis de las curva ROC para las variables CLL κ y λ en LCR, y el índice IgG. [IC: intervalo de confianza. VPP: valor predictivo positivo. VPN: valor predictivo negativo. ABC: área bajo la curva].

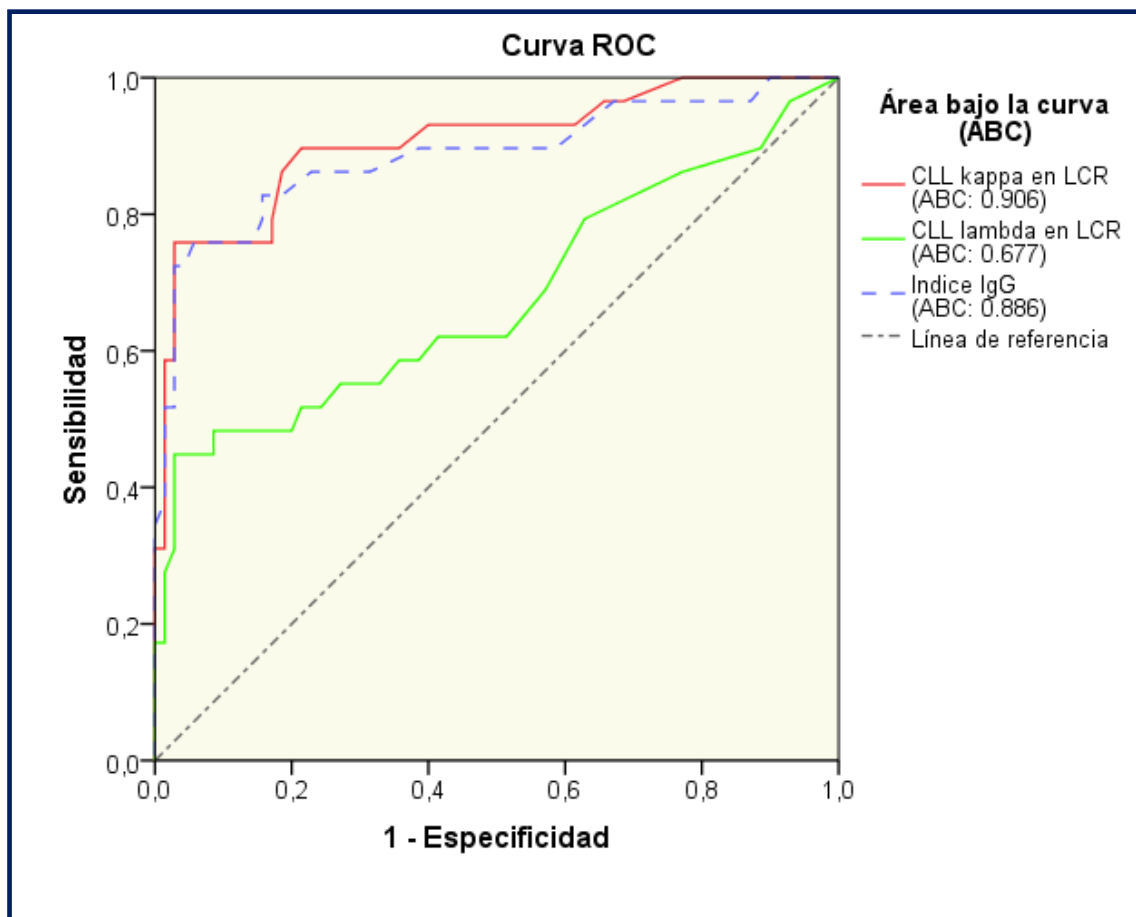


Figura 41. Comparación de curvas ROC (Receiver Operating Characteristic) para el índice IgG (línea discontinua azul), CLL κ en LCR (línea continua roja), y CLL λ en LCR (línea continua verde). Cada punto de la curva ROC corresponde a un posible punto de corte del test diagnóstico, y nos informa de su sensibilidad (eje Y), y de 1-especificidad (eje x). Ambos ejes incluyen valores entre 0 y 1 (0%-100%). La línea trazada desde el punto 0,0 al punto 1,0 recibe el nombre de línea de referencia.

Con los datos obtenidos del análisis de las curvas ROC obtuvimos un punto de corte para las CLL κ en LCR con unas características de sensibilidad y especificidad aceptables. Con este punto de corte de 0,73 mg/L, dividimos a los pacientes con SNA en 2 subgrupos:

- Subgrupo 1: pacientes con CLL κ en LCR >0,73 mg/L
- Subgrupo 2: pacientes con CLL κ en LCR <0,73 mg/L

La edad media de ambos subgrupos fue similar, 35,2 y 35,4 respectivamente ($p=0,928$), con un porcentaje de mujeres mayor respecto al de hombres en cada subgrupo. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los

subgrupos 1 y 2 (Tabla 19). Todos los pacientes del subgrupo 1 presentaron BOCG positivas e índice IgG>0,56. En cuanto a la clínica, un 70,3% de los pacientes cumplía ≥ 3 criterios de BTC. Al combinar los criterios de RM con BOCG, este porcentaje se mantuvo (un 70,3% cumplía ambos criterios). Sin embargo, en el subgrupo 2, la mayoría de pacientes mostraban BOCG negativas (74,4%), presentaban un índice de IgG<0,56 (71,8%), y no cumplían con ≥ 3 criterios de BTC (65,5%). Al combinar criterios de RM y BOCG, un 79,3% no cumplía los mismos. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre los subgrupos en la presencia de contraste con Gd.

Además, un 78,9% de los pacientes que presentaron CLL κ en LCR>0,73 mg/L convirtieron a EM, frente a un 20,5% de los pacientes del subgrupo 2.

CLL κ en LCR (0,73 mg/L)	Subgrupo 1	Subgrupo 2	Valor p
Pacientes (N)	38	39	-
Mujeres (%)	32 (84,2)	28 (71,8)	-
Edad media (IC del 95%)	35,2 (32,2-38,1)	35,4 (31,6-39,2)	0,928
BOCG (+/-)	38/0	10/29	<0,0001
BOC IgM (+/-)	28/35	8/26	0,042
Índice IgG (>0,56/<0,56)	38/0	11/28	<0,0001
≥ 3 criterios de BTC (%)	26 (70,3)	10 (34,5)	0,004
Contraste con Gd positivo (%)	10 (16,9)	5 (10,9)	0,415
Cumple criterios de RM y BOCG (si/no)	26/11	6/23	<0,0001
Conversión a EM (%)	30 (78,9)	8 (20,5)	<0,0001

Tabla 19. Datos de laboratorio y clínicos para pacientes con síndrome neurológicamente aislado (SNA) empleando un punto de corte para las CLL κ en LCR de 0,73 mg/L. Subgrupo 1: pacientes con CLL κ en LCR>0,73 mg/L; subgrupo 2: pacientes con CLL κ en LCR<0,73 mg/L. IC: intervalo de confianza. BOCG: bandas oligoclonales IgG, BTC: criterios de Barkhof-Tintoré; Gd: gadolinio; RM: resonancia magnética.

TERCERA BÚSQUEDA DE UN PUNTO DE CORTE DE CONVERSIÓN DE SNA A EM

En una tercera y última aproximación analizamos el índice kappa y el índice lambda empleando un método orientado a resultados: las curvas ROC. De acuerdo con estudios previos, el índice kappa es el que muestra la mayor sensibilidad y especificidad en la detección de EM. Es probable que el índice lambda mejore los resultados obtenidos anteriormente respecto al análisis de las CLL λ en LCR.

Desarrollamos curvas ROC para los índices kappa y lambda (Figura 42), analizando los valores del grupo control (n=70) frente a los valores del grupo EMRR (n=29).

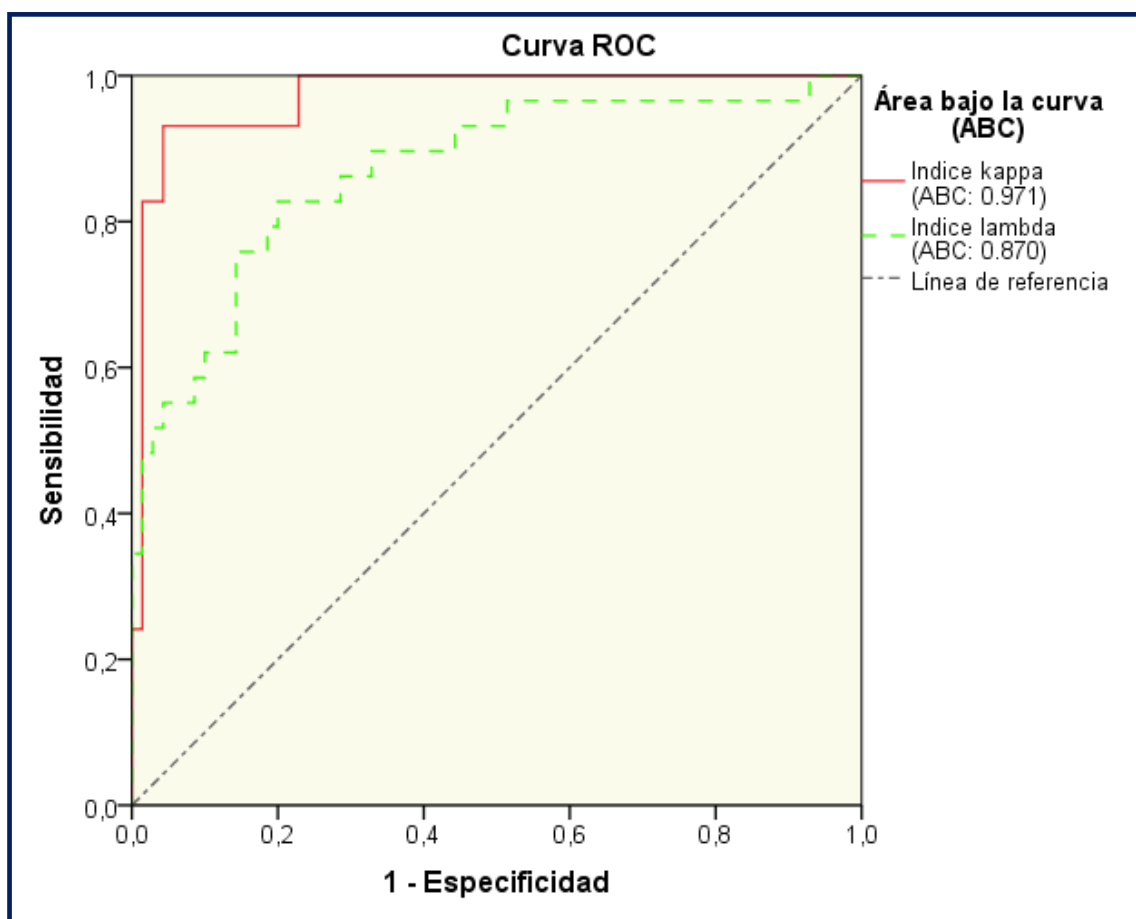


Figura 42. Comparación de curvas ROC (Receiver Operating Characteristic) para el índice kappa (línea continua roja), y para el índice lambda (línea discontinua verde). Cada punto de la curva ROC corresponde a un posible punto de corte del test diagnóstico, y nos informa de su sensibilidad (eje Y), y de 1-especificidad (eje x). Ambos ejes incluyen valores entre 0 y 1 (0%-100%). La línea trazada desde el punto 0,0 al punto 1,0 recibe el nombre de línea de referencia.

El mayor ABC encontrada fue para el **índice kappa**: 0,971, siendo mayor que la mostrada para las CLL κ en LCR, con una sensibilidad del 93,1% (intervalo de confianza (IC) del 95%: 77,2-99,2) y una especificidad del 95,7% (IC del 95%: 88,0-99,1), para un **punto de corte de 10,62**. Estos resultados mejoran los obtenidos para las CLL κ en LCR y para el índice IgG (Figura 41). Para el índice lambda, se obtuvo un ABC=0,870, con una sensibilidad del 82,8% (IC del 95%: 64,2-94,2) y una especificidad del 80% (IC del 95%: 68,7-88,6), para un punto de corte de 1,77 (Tabla 20). Con estos resultados se confirma que el índice lambda mejora las características globales respecto a las CLL λ en LCR, mostrando en este caso un valor aceptable de ABC.

	<i>índice kappa</i>	<i>índice lambda</i>
<i>Sensibilidad (IC del 95%)</i>	93,1 (77,2-99,2)	82,8 (64,2-94,2)
<i>Especificidad (IC del 95%)</i>	95,7 (88,0-99,1)	80 (68,7-88,6)
<i>VPP (IC del 95%)</i>	90,0 (73,1-98,0)	63,2 (45,7-78,4)
<i>VPN (IC del 95%)</i>	97,1 (89,9-99,6)	91,8 (81,9-97,3)
<i>ABC (valor p)</i>	0,971 (<0,0001)	0,870 (<0,0001)
<i>Punto de corte</i>	10,62	1,77

Tabla 20. Datos extraídos del análisis de las curva ROC para los índices kappa y lambda. [IC: intervalo de confianza. VPP: valor predictivo positivo. VPN: valor predictivo negativo. ABC: área bajo la curva].

Con los datos obtenidos del análisis de las curvas ROC obtuvimos un punto de corte para el índice kappa con unas buenas características de sensibilidad y especificidad. Con este punto de corte de 10,62, dividimos a los pacientes con SNA en 2 subgrupos:

- Subgrupo 1: pacientes con índice kappa >10,62
- Subgrupo 2: pacientes con índice kappa <10,62

Se obtuvo una edad media sin diferencias significativas entre ambos grupos ($p=0,186$), con un porcentaje de mujeres mayor respecto al de hombres en cada subgrupo. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos subgrupos de estudio (Tabla 21). Los pacientes con un índice kappa $>10,62$, presentaron en su mayoría BOCG positivas (89,8%), índice IgG $>0,56$ (93,9%), y un 61,2% presentó ≥ 3 criterios de BTC.

En el subgrupo 2, con un índice kappa $<10,62$, la mayoría de los pacientes presentaron BOCG negativas (85,7%), índice IgG $<0,56$ (89,3%) y un 78,6% no cumplían ≥ 3 criterios de BTC. Al combinar los criterios de RM y BOCG, 29 pacientes del subgrupo 1 cumplieron ambos criterios, mientras que en el subgrupo 2 tan sólo 3 pacientes cumplieron dichos criterios. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre los subgrupos en la presencia de contraste con Gd.

En lo referente a la conversión de SNA a EM, un 71,4% de los pacientes del subgrupo 1 convirtieron a EM, frente al 10,7% del subgrupo 2.

ÍNDICE KAPPA (10,62)	Subgrupo 1	Subgrupo 2	Valor p
Pacientes (N)	49	28	-
Mujeres (%)	41 (83,7)	19 (67,9)	-
Edad media (IC del 95%)	34,1 (31,3-36,9)	37,4 (32,9-41,8)	0,186
BOCG (+/-)	44/5	4/24	<0,0001
BOC IgM (+/-)	34/40	2/21	0,001
Índice IgG (>0,56/<0,56)	46/3	3/25	<0,0001
≥3 criterios de BTC (%)	30 (61,2)	6 (21,4)	0,008
Contraste con Gd positivo (%)	13 (18,1)	2 (6,1)	0,137
Cumple criterios de RM y BOCG (si/no)	29/17	3/17	<0,0001
Conversión a EM (%)	35 (71,4)	3 (10,7)	<0,0001

Tabla 21. Datos de laboratorio y clínicos para pacientes con síndrome neurológicamente aislado (SNA) empleando un punto de corte para el índice kappa de 10,62. Subgrupo 1: pacientes con un índice kappa >10,62; subgrupo 2: pacientes con un índice kappa <10,62. IC: intervalo de confianza. BOCG: bandas oligoclonales IgG, BTC: criterios de Barkhof-Tintoré; Gd: gadolinio; RM: resonancia magnética.

También se analizaron los datos para el índice lambda. A pesar de mejorarse respecto a las CLL λ en LCR, como se ha visto en la bibliografía, los resultados son menos informativos que los mostrados para el índice kappa. Se muestran las correlaciones con las variables de laboratorio y clínicas en la tabla 22.

ÍNDICE LAMBDA (1,77)	Subgrupo 1	Subgrupo 2	Valor p
Pacientes (N)	51	26	-
Mujeres (%)	41 (80,4)	19 (73,1)	-
Edad media (IC del 95%)	33,1 (30,6-35,6)	39,5 (34,6-44,3)	0,022
BOCG (+/-)	44/7	4/22	<0,0001
BOC IgM (+/-)	32/41	4/20	0,027
Índice IgG (>0,56/<0,56)	44/7	5/21	<0,0001
≥3 criterios de BTC (%)	30 (61,2)	6 (35,3)	0,064
Contraste con Gd positivo (%)	12 (16,4)	3 (9,4)	0,545
Cumple criterios de RM y BOCG (si/no)	29/20	3/14	0,004
Conversión a EM (%)	35 (68,6)	3 (11,5)	<0,0001

Tabla 22. Datos de laboratorio y clínicos para pacientes con síndrome neurológicamente aislado (SNA) empleando un punto de corte para el índice lambda de 1,77. Subgrupo 1: pacientes con un índice lambda >1,77; subgrupo 2: pacientes con un índice lambda <1,77. IC: intervalo de confianza. BOCG: bandas oligoclonales IgG, BTC: criterios de Barkhof-Tintoré; Gd: gadolinio; RM: resonancia magnética.

Para analizar la precisión de las variables cualitativas, empleamos tablas de contingencia para las variables BOCG y criterios de BTC (Tabla 22). La mayor sensibilidad y especificidad (96,5% y 98,6% respectivamente) para detectar pacientes con EM fue la mostrada por las BOCG, aunque la sensibilidad y especificidad mostrada por el índice kappa es similar (93,1% y 95,7% respectivamente).

Para completar el estudio realizamos el análisis multivariante combinando criterios de RM con criterios de laboratorio: BTC + BOCG, y BTC + índice kappa. El análisis de BTC + índice kappa mejoró la especificidad y el VPP, respecto al análisis del índice kappa sólo. Sin embargo, la sensibilidad y el VPN disminuyeron (Tabla 20 y 23). Lo mismo se observa cuando se analizan BTC + BOCG, en comparación con BOCG sólo (Tabla 23). Estos resultados son consistentes con estudios previos, en los que también

se combinó BTC con el resultado de BOCG y de CLL κ en LCR, mostrándose un incremento en la especificidad desde un punto de vista clínico (Villar LM, 2012).

	BOCG	BTC	BTC + BOCG	BTC + índice kappa
Sensibilidad (IC del 95%)	96,5 (82,2-99,9)	72,4 (52,8-87,3)	72,4 (52,8-87,3)	69,0 (49,2-84,7)
Especificidad (IC del 95%)	98,6 (92,3-99,9)	100 (94,9-100)	100 (94,9-100)	100 (94,9-100)
VPP (IC del 95%)	96,6 (82,2-99,9)	100 (83,9-100)	100 (83,9-100)	100 (83,2-100)
VPN (IC del 95%)	98,6 (92,3-99,9)	89,7 (80,8-95,5)	89,7 (80,8-95,9)	88,6 (79,5-94,7)

Tabla 23. Análisis de las tablas de contingencia para BOCG y BTC; y análisis multivariante combinando BTC con BOCG, y BTC con el índice kappa. IC: intervalo de confianza. VPP: valor predictivo positivo. VPN: valor predictivo negativo.

Para estudiar la probabilidad de conversión a EM de pacientes con SNA, empleamos el análisis de Kaplan-Meier de acuerdo al punto de corte del índice kappa de 10,62 ($p < 0,0001$) (Figura 43). La mediana de conversión del subgrupo 1, índice kappa $> 10,62$, fue de 19 meses con un error estándar de 0,0741 [HR de 7,34 (IC del 95%: 3,82-14,11)].

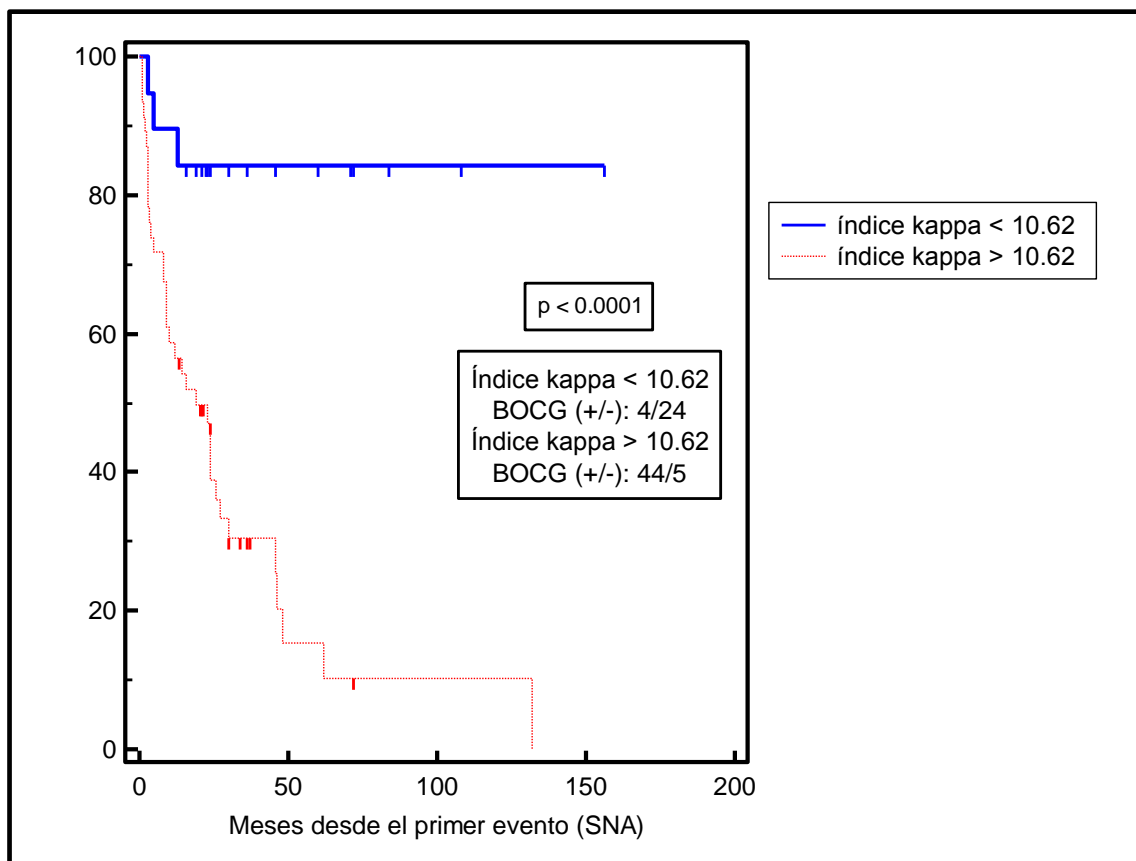


Figura 43. Representación de la curva de supervivencia mediante el análisis Kaplan-Meier de los pacientes con Síndrome Neurológicamente Aislado (SNA), en la que se muestra la probabilidad de permanecer como SNA de acuerdo al punto de corte para el **índice kappa: valores por encima de 10,62 (línea discontinua roja), valores inferiores a 10,62 (línea continua azul). Se representa el tiempo en meses desde el primer evento clínico o SNA. BOCG: bandas oligoclonales IgG.**

En el análisis multivariante mediante la regresión Cox, estudiamos el índice kappa junto con las variables edad, sexo y criterios de BTC. Observamos que la edad y el sexo no influyen en las curvas de supervivencia ($p > 0,05$). El HR ajustado para criterios de BTC fue de 5,30 (IC del 95%: 1,59-17,63).

Realizamos el análisis de Kaplan-Meier de acuerdo al punto de corte del índice lambda de 1,77 (Figura 44) ($p = 0,0015$). La mediana de conversión del subgrupo 1, índice lambda $> 1,77$, fue de 23 meses con un error estándar de 0,0728 [hazard ratio (HR) de 5,33 (IC del 95%: 2,68-10,57)]. Como ya hemos visto, el índice lambda es menos informativo que el índice kappa. A pesar de ello, si se observa una diferencia

estadísticamente significativa entre ambos subgrupos de pacientes con SNA de acuerdo al punto de corte establecido para el índice lambda.

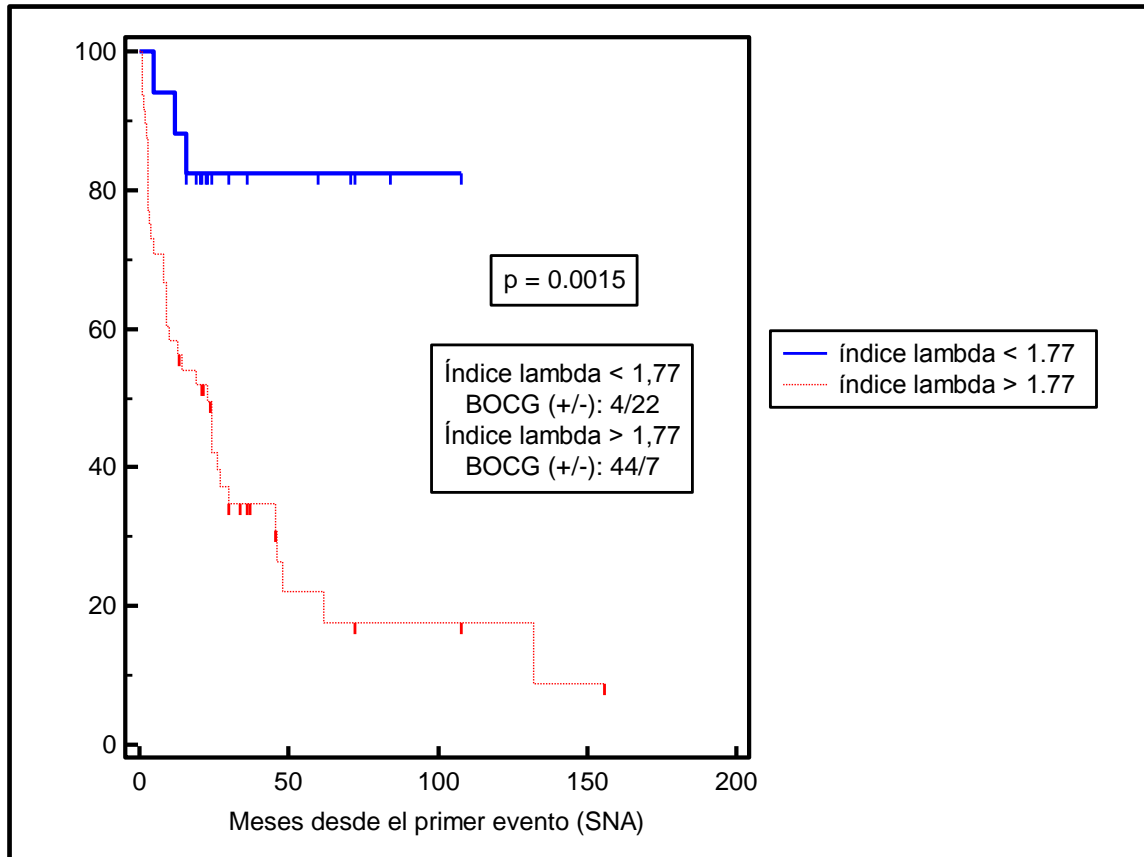


Figura 44. Representación de la curva de supervivencia mediante el análisis Kaplan-Meier de los pacientes con Síndrome Neurológicamente Aislado (SNA), en la que se muestra la probabilidad de permanecer como SNA de acuerdo al punto de corte para el **índice lambda: valores por encima de 1,77 (línea discontinua roja), valores inferiores a 1,77 (línea continua azul). Se representa el tiempo en meses desde el primer evento clínico o SNA. BOCG: bandas oligoclonales IgG.**

2. CORRELACIÓN DEL ÍNDICE KAPPA CON EL ESTADÍO EDSS

En primer lugar analizamos la escala EDSS cuantitativa frente al índice kappa, obteniendo un coeficiente de correlación $r=0,133$ con una $p=0,166$.

Posteriormente, agrupamos a los pacientes en 4 grupos según el valor presentado en la escala EDSS en su primera visita al neurólogo:

- Grupo 1: pacientes con EDSS < 2, sin patología
- Grupo 2: pacientes con EDSS 2-2.5, discapacidad mínima
- Grupo 3: pacientes con EDSS 3-3.5, discapacidad leve-moderada
- Grupo 4: pacientes con EDSS ≥ 4, limitación para caminar

Calculamos las medianas de los índices kappa y lambda en cada grupo de discapacidad agrupado en base a la escala EDSS (Tabla 24). Encontramos diferencias estadísticamente significativas entre ellos aplicando el test de Jonckheere-Terpstra ($p=0,031$) para la variable índice kappa, pero no así para la variable índice lambda ($p=0,151$).

<i>EDSS</i>	<i>N</i>	<i>Índice kappa</i>	<i>Índice lambda</i>
<i>Grupo 1: sin patología</i>	49	17,09 (4,00-153,35)	2,80 (1,34-11,06)
<i>Grupo 2: discapacidad mínima</i>	45	56,65 (21,12-293,03)	9,66 (2,01-18,58)
<i>Grupo 3: discapacidad leve-moderada</i>	9	62,33 (16,64-214,74)	17,47 (1,66-33,24)
<i>Grupo 4: limitación para caminar</i>	6	83,62 (25,46-247,68)	1,70 (1,43-2,88)

Tabla 24. Pacientes del estudio piloto agrupados de acuerdo al nivel de discapacidad según la escala EDSS.

Si agrupamos a los pacientes según el punto de corte de 10,62 para el índice kappa, se pueden observar gráficamente las diferencias para cada grupo de discapacidad en las figura 45 y 46. Debemos considerar que un número mayor de pacientes presentan valores más bajos en la escala EDSS, y sólo un pequeño porcentaje de pacientes presentan valores de EDSS por encima de 3 en su primera consulta con el neurólogo (13,76%).

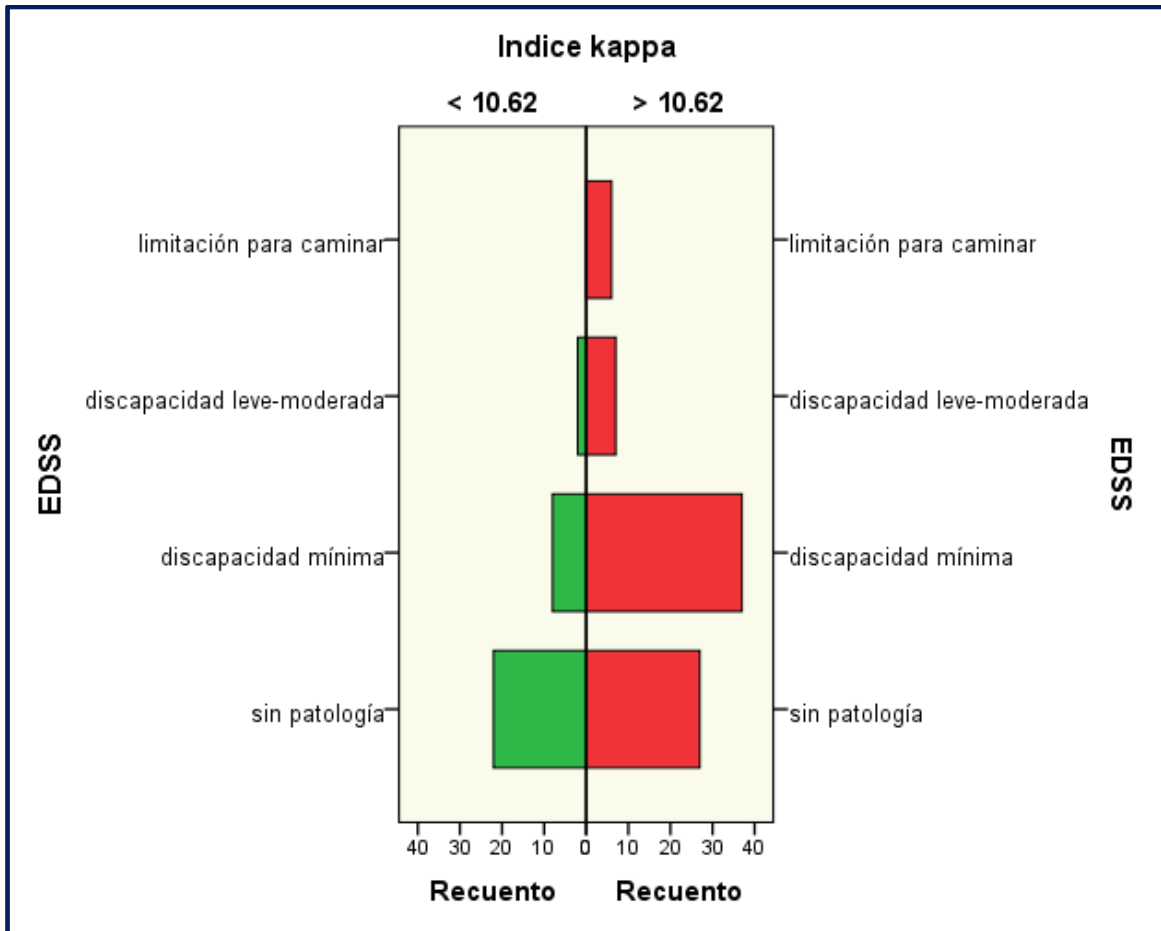


Figura 45. Representación gráfica de los pacientes según el punto de corte del índice kappa de 10,62 frente a la escala de discapacidad EDSS.

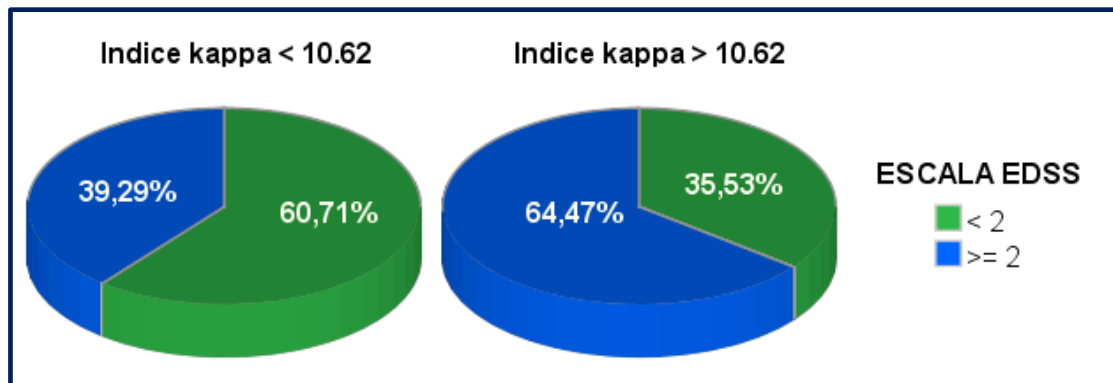


Figura 46. Diagrama de sectores de los pacientes según el punto de corte del índice kappa de 10,62 frente a la escala de discapacidad EDSS (divididos en dos grupos según presenten <2 o ≥2 en la escala).

3. CORRELACIÓN DEL ÍNDICE KAPPA CON OTROS PARÁMETROS ESTUDIADOS

Los pacientes que presentaron un brote en el momento de la punción lumbar, tenían un valor más elevado de la mediana del índice kappa como se observa en la figura 47. Esta diferencia fue estadísticamente significativa aplicando la U de Mann-Whitney ($p=0,005$). Además, se ha observado dentro del grupo de pacientes que no presentaban ningún brote en el momentos de la punción lumbar, que los 4 outliers (asteriscos azules en la figura 47), son pacientes que han convertido a EM, así como los otros 3 puntos situados fuera del rango intercuartílico (Figuras 47 y 48).

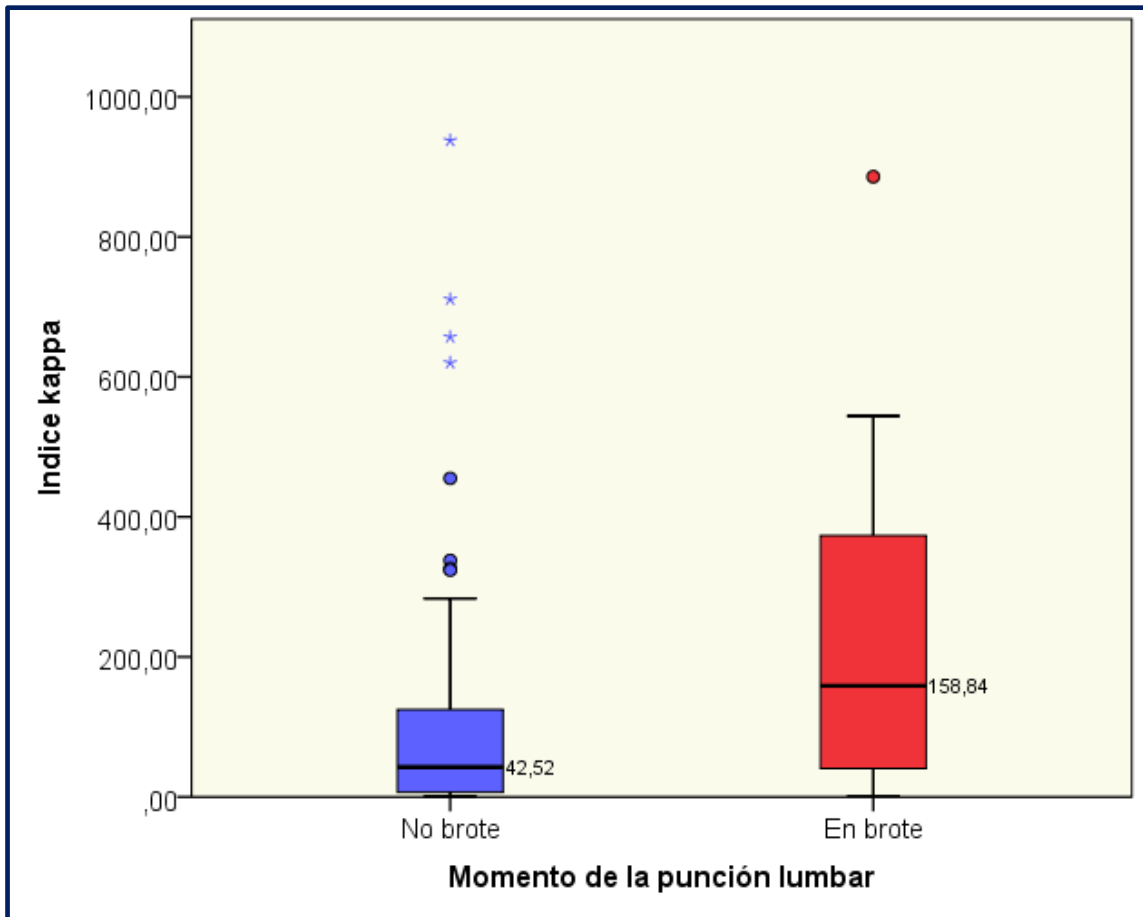


Figura 47. Diagrama de cajas para el índice kappa según el momento de la punción lumbar. Pacientes que no se encontraban en brote (azul), pacientes en brote (rojo); se representan la mediana y los percentiles 25 y 75 (cajas coloreadas); el mínimo y máximo (barras de error); y los outliers (*).

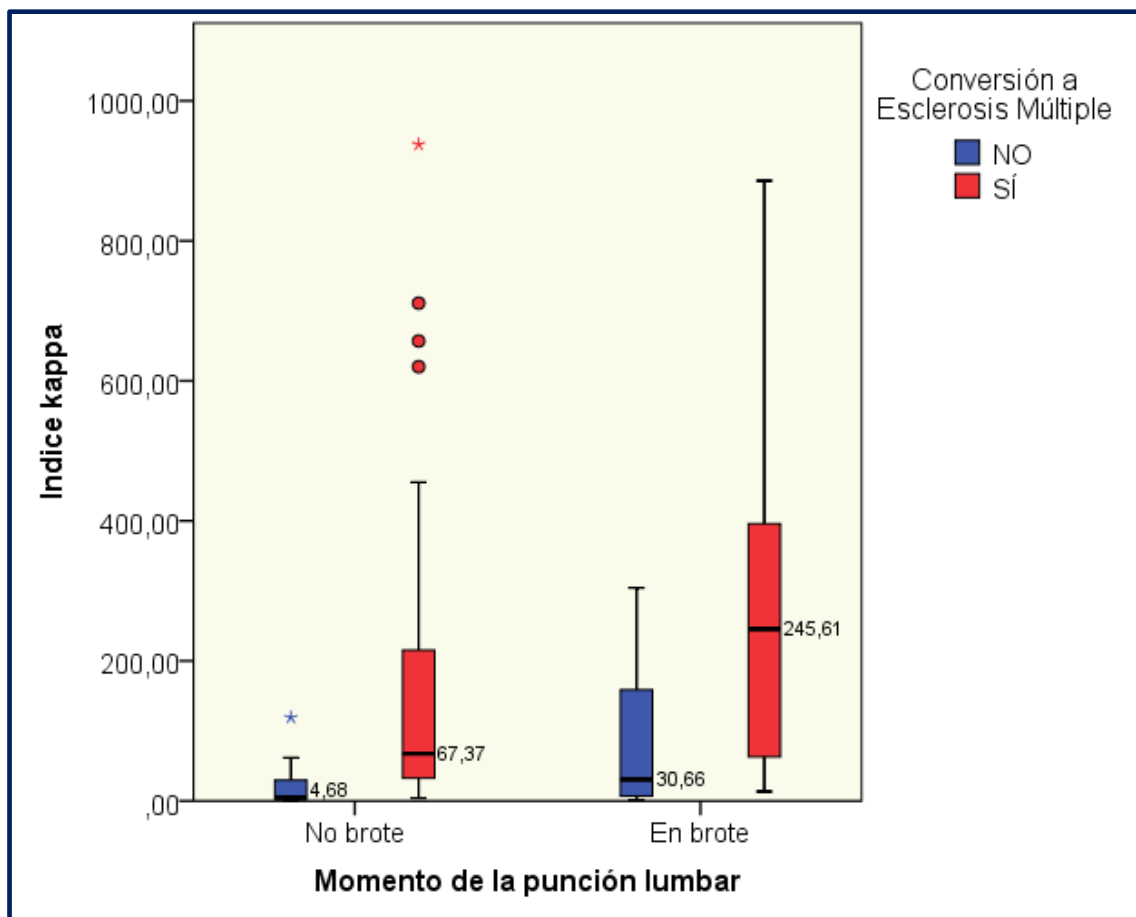


Figura 48. Diagrama de cajas para el índice kappa según el momento de la punción lumbar y la conversión a EM. Se representan los pacientes que no se encontraban en brote, y los pacientes en brote, divididos según la conversión a EM; se muestran la mediana y los percentiles 25 y 75 (cajas coloreadas); el mínimo y máximo (barras de error); y los outliers (*). Se representa la conversión a EM en rojo, y en azul los pacientes que no han convertido a EM.

Analizamos el sistema funcional afectado en el brote. Para ello dividimos a los sistemas funcionales en: cerebelo, funciones sensoriales, vejiga, funciones visuales, funciones neuropsicológicas; y tracto piramidal, tronco cerebral. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el valor del índice kappa y el sistema funcional afectado en el brote ($p=0,145$).

Por otro lado, estudiamos el motivo de la conversión a EM: ya sea por presentar un brote, o por presentar criterios de EM (RM + BOCG). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el valor del índice kappa y el modo de conversión a EM ($p=0,634$).

4. CORRELACIÓN DEL ÍNDICE KAPPA CON EL TRATAMIENTO DEL PACIENTE

En el momento de la punción lumbar tan sólo 4 pacientes se encontraban en tratamiento. De los pacientes que habían recibido un primer tratamiento, 6 (7,2%) presentaban un índice kappa $<10,62$, y 57 (68,7%) un índice kappa $>10,62$, de los cuales, un 94,7% terminó convirtiendo a EM.

En cuanto al mecanismo de acción, no se observan diferencias estadísticamente significativas con el resultado del índice kappa. De los pacientes en tratamiento con interferón, 35 presentaban un índice kappa $>10,62$, y 6 un índice kappa $<10,62$. El resto de pacientes en tratamiento presentaban un índice kappa $>10,62$, y fueron tratados con acetato de glatiramer (10), natalizumab (7), y fingolimod (5).

No se observaron diferencias significativas entre mantener el tratamiento o cambiarlo a uno de segunda línea en relación con el valor del índice kappa. Un total de 34 pacientes con índice kappa $>10,62$ mantuvieron el tratamiento en primera línea, y 10 en segunda línea, frente a 12 que cambiaron. De los 6 pacientes con índice kappa $<10,62$, los 6 mantuvieron el tratamiento: 4 convirtieron a EM y 2 permanecieron como SNA.

De los pacientes a los que se les cambió el tratamiento, todos presentaban un índice kappa $>10,62$: de los pacientes en tratamiento con interferón, cambiaron a terapia de segunda línea, 4 a natalizumab, 2 a fingolimod y 1 a betaferon; 1 paciente en tratamiento con acetato de glatiramer fue cambiado a fingolimod, y de los pacientes en tratamiento con terapia de segunda línea (natalizumab), 2 fueron cambiados a fingolimod.

Al analizar los diversos fármacos con el valor del índice kappa, no encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p=0,168$). Pero si agrupamos los fármacos en terapia de primera línea (interferón y acetato de glatimer), y en terapia de segunda línea (natalizumab y fingolimod), si se observan diferencias estadísticamente significativas ($p=0,026$). Los pacientes que reciben una terapia de segunda línea ($n=19$), ya sea como primer tratamiento o como segunda opción, presentan valores superiores de índice kappa, con una mediana de 143; mientras que los pacientes en tratamiento

con terapia de primera línea (n=42) presentan una mediana del índice kappa de 59 (Figura 49).

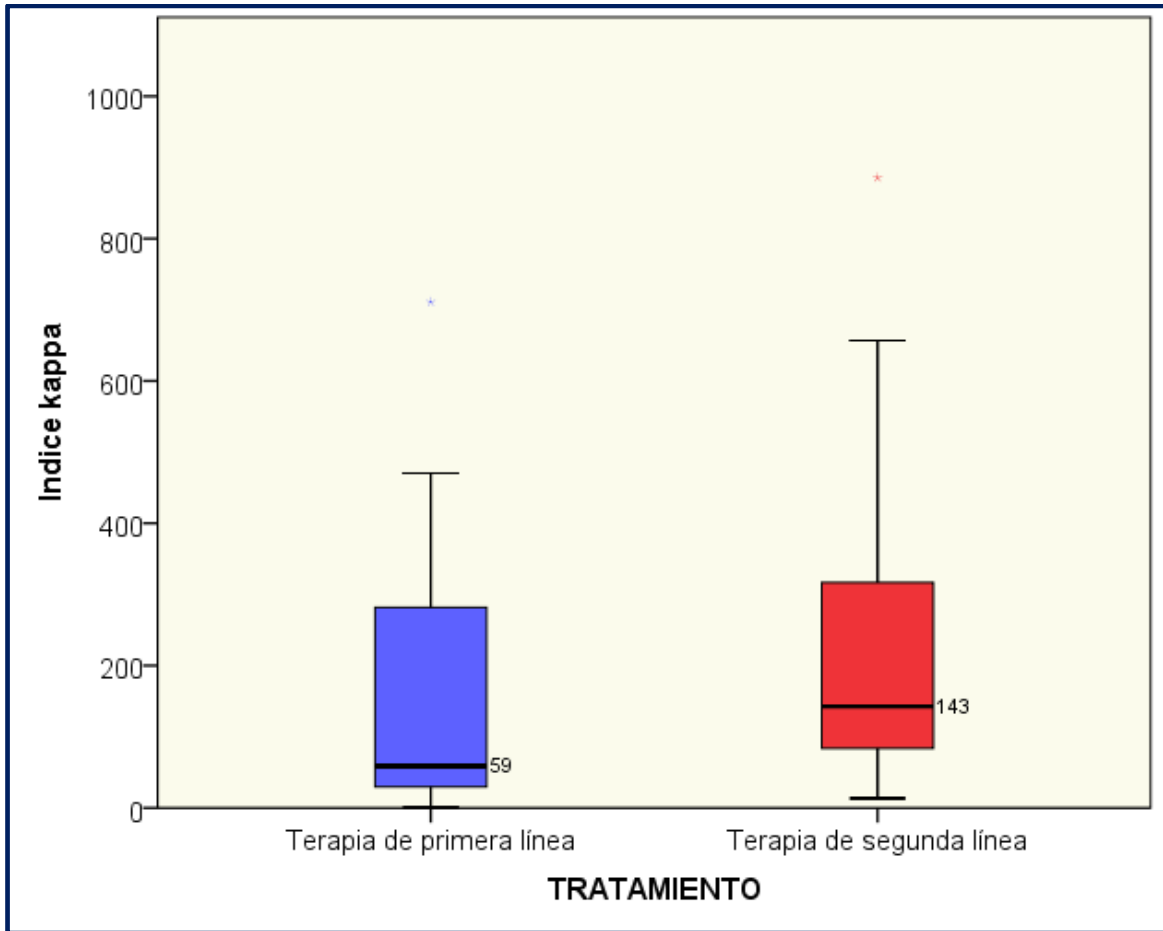


Figura 49. Diagrama de cajas para el índice kappa según el tratamiento del paciente. Terapia de primera línea (interferón o acetato de glatimer) [azul] con una mediana del índice kappa de 59, o terapia de segunda línea (natalizumab o fingolimod) [rojo] con una mediana de 143.

5. ESTUDIO DE VALIDACIÓN

Con el punto de corte de 10,62 obtenido para el índice kappa en el estudio piloto, se incorpora este parámetro en la clínica de rutina del hospital. En ese momento, se establece que los pacientes que presenten un índice kappa superior 10,62, tienen una probabilidad de conversión a EM 7,34 veces mayor que los pacientes con valores del índice kappa inferiores a 10,62. Para validar este resultado, se hace un seguimiento de los pacientes a los que se les realiza una punción lumbar con sospecha de SNA durante un periodo de un año.

En esta ampliación del estudio, y por motivos ajenos al mismo referentes a cambios en la gestión del laboratorio de inmunología, se modificó el equipo de medición, por lo que las muestras fueron analizadas en el equipo de turbidimetría SpaPlus® (The Binding Site Group Ltd., Birmingham, UK). Se empleó el kit para kappa libre humana Freelite® (The Binding Site Group Ltd., Birmingham, UK) adaptado a cada equipo. Se ha determinado en estudios previos que a pesar de las diferencias encontradas entre ambos equipos (BNII™ y SpaPlus®), no existen diferencias en lo referente a la predicción de un resultado positivo del test (Zeman D, 2016). Lo más adecuado sería establecer un punto de corte adaptado a cada equipo de medición, al igual que se establece para otros parámetros bioquímicos cuando se produce un cambio de metodología.

Para establecer un punto de corte para el índice kappa en el SpaPlus®, realizamos una nueva curva ROC (Figura 50), en la que analizamos los valores del grupo que no convertía a EM (n=127), frente a los valores del grupo de pacientes que convirtieron a EM (n=26). Para ello descartamos los pacientes que presentaban un SNA, por ser casos en los que es posible una conversión a EM.

Empleando estos datos para obtener un punto de corte para el índice IgG, obtuvimos un punto de corte de 0,58, similar al obtenido previamente.

	<i>índice kappa</i>	<i>Índice IgG</i>
Sensibilidad (IC del 95%)	84,62 (65,1-95,6)	73,08 (52,2-88,4)
Especificidad (IC del 95%)	96,06 (91,1-98,7)	92,13 (86,0-96,2)
VPP (IC del 95%)	81,5 (61,9-93,7)	65,5 (45,3-82,3)
VPN (IC del 95%)	96,8 (92,0-99,1)	94,4 (88,7-97,7)
ABC (valor p)	0,941 (<0,0001)	0,871 (<0,0001)
Punto de corte	12,33	0,58

Tabla 25. Datos extraídos del análisis de las curva ROC para la variable índice kappa en el equipo SpaPlus® y para el índice IgG. VPP: valor predictivo positivo. VPN: valor predictivo negativo. ABC: área bajo la curva.

El punto de corte para el índice kappa de 12,33 es ligeramente superior al calculado en el estudio piloto de 10,62. Sin embargo, no existen diferencias entre ambos puntos de corte calculados en cuanto a la positividad del test. En el estudio piloto se había definido un grupo control lo más homogéneo posible tanto en edad como en diagnóstico. Esto supone un sesgo muestral en el estudio debido a la selección de las muestras. A pesar de la pérdida de sensibilidad y VPP en el estudio de validación, lo más correcto sería emplear el nuevo punto de corte obtenido de 12,33. En este estudio de validación se recoge una muestra más representativa de nuestra población real respecto al estudio piloto. Dentro del rango de 10,62-12,33 para el índice kappa, nos encontramos con 3 pacientes, 1 perteneciente al estudio piloto (conversión a EM), y 2 pertenecientes al estudio de validación (sin conversión a EM).

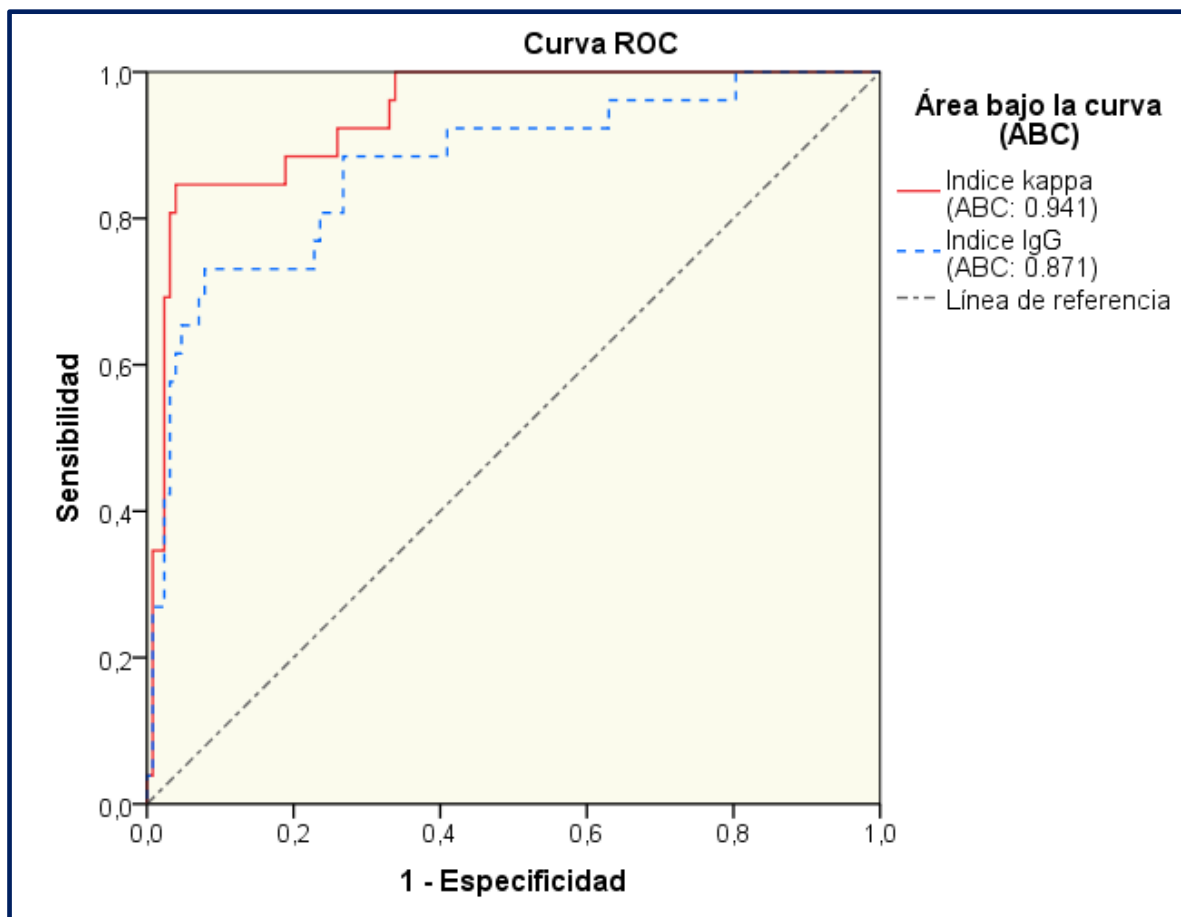


Figura 50. Curva ROC (Receiver Operating Characteristic) para el índice kappa (línea continua roja) en el equipo SpaPlus® (The Binding Site Group Ltd., Birmingham, UK), y para el índice IgG (línea discontinua azul). Cada punto de la curva ROC corresponde a un posible punto de corte del test diagnóstico, y nos informa de su sensibilidad (eje Y), y de 1-especificidad (eje x). Ambos ejes incluyen valores entre 0 y 1 (0%-100%). La línea trazada desde el punto 0,0 al punto 1,0 recibe el nombre de línea de referencia.

Dividimos a los pacientes en dos grupos de acuerdo al valor del índice kappa, estableciendo como punto de corte 12,33: grupo 1 con índice kappa > 12,33, y grupo 2 con índice kappa < 12,33 (Tabla 26).

En la tabla 26 se puede observar como en el grupo 1 (índice kappa > 12,33) un mayor número de pacientes presentan BOCG positivas e índice IgG > 0,58. Además, un 75% cumplen criterios de BTC, frente al 3,2% del grupo 2 (índice kappa < 12,33). En el grupo 2 la gran mayoría de los pacientes presentan BOCG negativos y un índice IgG < 0,58.

En lo referente a cumplir criterios tanto de RM como presentar BOCG positivas, 20 pacientes del grupo 1 cumplían ambas condiciones, frente a 1 sólo paciente del grupo 2. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre los subgrupos en la presencia de contraste con Gd. También se observaron diferencias entre ambos grupos en la conversión a EM. Mientras que en el grupo con índice kappa > 12,33 un 68,8% de pacientes convertía a EM, un 96,8% del grupo con índice kappa < 12,33 no convirtió a EM.

ÍNDICE KAPPA (12,33)	Grupo 1	Grupo 2	Valor p
Pacientes (N)	32	126	-
Mujeres (%)	21 (65,6)	68 (54)	-
Edad media (IC del 95%)	39,66 (35,48-43,85)	50,66 (47,70-53,62)	0,463
BOCG (+/-)	29/3	8/118	< 0,0001
Índice IgG (>0,58/<0,58)	24/8	10/116	<0,0001
≥3 criterios de BTC (%)	24 (75)	4 (3,2)	<0,0001
Contraste con Gd positivo (%)	15 (57,7)	1 (25)	0,315
Cumple criterios de RM y BOCG (si/no)	20/12	1/125	<0,0001
Conversión a EM (%)	22 (68,8)	4 (3,2)	<0,0001

Tabla 26. Datos de laboratorio y clínicos para pacientes con sospecha de síndrome neurológicamente aislado (SNA) empleando un punto de corte para el índice kappa de 12,33. Grupo 1: pacientes con un índice kappa >12,33; grupo 2: pacientes con un índice kappa <12,33. IC: intervalo de confianza. BOCG: bandas oligoclonales IgG, BTC: criterios de Barkhof-Tintoré; RM: resonancia magnética.

6. UTILIDAD CLÍNICA DEL ÍNDICE KAPPA

Dados los resultados obtenidos tanto en el estudio piloto, como en el estudio de validación, vamos a analizar globalmente la utilidad clínica que muestra el biomarcador “índice kappa” incluido en la rutina de nuestro hospital para predecir la conversión a EM.

Para el análisis global, empleamos todos los datos obtenidos tanto en el estudio piloto como en el estudio de ampliación para la validación del primero. Con una muestra de 334 pacientes, con una edad media de 47 años (15-89), donde el 58,7% son mujeres, un 34,8% (92) convierten a EM. Encontramos BOCG positivas en el 43,9% (111 pacientes) de los pacientes, índice IgG>0,58 en el 31,1% (104 pacientes), e índice kappa>12,33 en el 32,9% (110 pacientes). Al analizar los resultados obtenidos de acuerdo al valor de este último parámetro, clasificamos a los pacientes en dos subgrupos de acuerdo al punto de corte de 12,33 para el índice kappa. En el subgrupo 1 se recogen los datos de los pacientes con un índice kappa elevado, >12,33; y en el subgrupo 2 los datos de pacientes con un índice kappa por debajo del punto de corte, <12,33 (Tabla 27).

Como cabe esperar de acuerdo a estudios previos, el porcentaje de mujeres respecto al de hombres es superior en el subgrupo 1, que es el grupo que presenta mayor probabilidad de conversión a EM, con una edad media de 35,69 años (33,69-37,70). Dentro de este grupo, un 94,2% de los pacientes presentan BOCG positivas, y un 65,4% cumple criterios de RM, además de presentar BOCG positivas. En lo referente a los criterios de RM, 74 de los pacientes del subgrupo 1 cumplen ≥ 3 criterios de BTC. Además, un 81,8% presenta un índice IgG>0,58. También cabe destacar que un 77,6% (83) de los pacientes clasificados en este subgrupo han convertido a EM en el transcurso del presente estudio, frente al 5,7% (9) de los pacientes del subgrupo 2. En este otro subgrupo, con índice kappa < 12,33, la mayoría de pacientes presentan BOCG negativas en un 91,3%, el 93,8% muestra un índice IgG<0,58, y el 94,9% no cumple criterios de BTC. Un 96,6% presenta BOCG negativas y no cumple criterios de BTC.

Si nos centramos en la RM, en lo relativo al contraste con Gd, se observan diferencias estadísticamente significativas entre ambos subgrupos. En el subgrupo 2, el

92,1% presenta contraste negativo, lo que indica enfermedad no activa. Mientras que en el subgrupo 1, un 28,9% presenta contraste con Gd positivo.

ÍNDICE KAPPA (12,33)	Subgrupo 1	Subgrupo 2	Valor p
Pacientes (N)	110	224	-
Mujeres (%)	79 (77,8)	117 (52,2)	-
Edad media (IC del 95%)	35,69 (33,69-37,70)	52,54 (50,08-55,00)	0,518
BOCG (+/-)	98/6	13/136	< 0,0001
Índice IgG (>0,58/<0,58)	90/20	14/210	<0,0001
≥3 criterios de BTC (%)	74 (69,2)	11 (5,1)	< 0,0001
Contraste con Gd positivo (%)	28 (28,9)	3 (7,9)	0,011
Cumple criterios de RM y BOCG (si/no)	68/36	5/144	< 0,0001
Conversión a EM (%)	83 (77,6)	9 (5,7)	<0,0001

Tabla 27. Datos de laboratorio y clínicos para todos los pacientes estudiados empleando el punto de corte para el índice kappa de 12,33. Subgrupo 1: pacientes con un índice kappa >12,33; subgrupo 2: pacientes con un índice kappa <12,33. IC: intervalo de confianza. BOCG: bandas oligoclonales IgG, BTC: criterios de Barkhof-Tintoré; Gd: gadolinio; RM: resonancia magnética.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

La EM es una enfermedad desmielinizante autoinmune que afecta a población adulta joven que se encuentra en la tercera década de vida y a mujeres [en una proporción mujeres-hombres 3:1]. La incidencia anual en nuestro área geográfica es de 4,6 casos por cada 100.000 habitantes con una prevalencia del 0,09% (Izquierdo G, 2015). Multitud de factores están implicados en esta patología crónica de etiología aún desconocida. Como principal causante de discapacidad neurológica no traumática en adultos jóvenes, la EM presenta un elevado impacto socioeconómico en nuestra sociedad, que se ve incrementado con la progresión de la discapacidad. Además, es la segunda causa de discapacidad en adultos jóvenes en España, después de los accidentes de tráfico según la Sociedad Española de Neurología (SEN).

A pesar de que la esperanza de vida no parece estar afectada en la EM, sí lo está su morbilidad. Aproximadamente, un 50% de los pacientes necesitarán ayuda para caminar durante los 10 años posteriores a su diagnóstico (Weinshenker BG, 1989). Sin embargo, en estudios más recientes se ha demostrado un transcurso más benigno de la enfermedad (Pittock SJ, 2004). Los tratamientos inmunomoduladores, han permitido reducir significativamente el número de recaídas, y en cierta medida, la progresión de la discapacidad. En estudios previos se ha observado como los costes socio-sanitarios se incrementan según aumenta el estadio EDSS. La mayoría de pacientes con un EDSS ≥ 6 muestran incapacidad laboral, con las consecuentes pérdidas de productividad (Casado V, 2006).

Durante los últimos años, se ha demostrado la importancia que presenta un diagnóstico temprano de EM. Los avances en tecnología han permitido desarrollar nuevas metodologías, que han ayudado a la búsqueda de un biomarcador óptimo. La necesidad de establecer un diagnóstico correcto y temprano en los pacientes con EM es de vital importancia, puesto que podría ayudar a frenar, o al menos disminuir la progresión de la enfermedad. Con este propósito, las pruebas de laboratorio, junto con la clínica del paciente y el resultado de la RM, son claves.

Por un lado, las pruebas de RM poseen una baja sensibilidad para predecir la conversión de los pacientes que han presentado un primer evento clínico o SNA. Por otro lado, respecto a las pruebas de laboratorio que se emplean actualmente en los laboratorios de referencia: las BOCG, a pesar de ser una herramienta excelente para ayudar al diagnóstico de la EM, poseen una precisión entre laboratorios dispar, es decir, existe una falta de estandarización; y el índice IgG presenta una baja sensibilidad. Todo ello, refuerza la necesidad de la búsqueda de un nuevo biomarcador. Los niveles elevados de CLL κ en LCR han sido propuestos como una buena herramienta diagnóstica, de gran utilidad para establecer la conversión a EM.

A pesar de que la asociación entre CLL y EM es conocida desde hace más de 30 años, ha sido en la última década, con la aparición de métodos automatizados y altamente reproducibles, cuando se han realizado multitud de estudios haciendo referencia al valor pronóstico del incremento de CLL κ en LCR en pacientes con EM o con SNA con una elevada probabilidad de conversión a EM (Villar LM, 2012; Hassan Smith G, 2014). Pueden medirse mediante la cuantificación directa de CLL κ en LCR o calculando el índice kappa, que relaciona la concentración de CLL κ en suero y LCR con la de albúmina. Ambos biomarcadores han mostrado una alta sensibilidad diagnóstica. No obstante, el índice kappa, ha mostrado una mayor sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de la EM (Desplat-Jego S, 2005; Presslauer S, 2008; Duranti F, 2013).

Características de los pacientes

En el estudio piloto analizamos 176 pacientes, de los que un 60,8% eran mujeres. Los pacientes fueron seleccionados y clasificados en 5 grupos de estudio: HN, ENNI, ENI, SNA y EMRR.

Los pacientes con EMRR representan un grupo de pacientes con características clínicas y serológicas típicas de esta patología: una mayor frecuencia de mujeres (58,60%), con una edad media de 34,81 años [mediana de edad: 34,70 años; rango de edad: 17-57 años], alto porcentaje de pacientes con BOCG positivas (96,6%), con índice

IgG mayor de 0,56 (75,9%), y que cumplen ≥ 3 criterios de BTC (72,4%). Estos datos son similares a los recogidos en la literatura científica en nuestro área geográfica (Villar LM, 2009; Villar LM, 2012; Izquierdo G, 2015; Candelieri-Merlicco A, 2016). En algunos de los estudios publicados más recientemente, en los que se recogen las características de los pacientes con EM, éstos muestran una edad media y una proporción de mujeres característicos de esta patología (Tabla 28).

<i>Referencias</i>	<i>EM</i>	<i>Edad media (EM)</i>	<i>% mujeres (EM)</i>
<i>Passerini G et al.</i>	34/100	37,4 (27,8-46,3)	21 (61,8)
<i>Menéndez-Valladares P et al.</i>	29/176	34,81 (17-57)	17 (58,6)
<i>Makshakov G et al.</i>	98/198	32 ($\pm 9,6$)	67 (68)
<i>Duranti F et al.</i>	23/80	39 (21-58)	14 (60,9)
<i>Desplat-Jégo S et al.</i>	33/89	33 (21-41)	12 (80)

Tabla 28. Edad y sexo de los pacientes con EM en aquellos artículos en los que se hace referencia al índice kappa; en comparación con lo recogido en nuestro estudio (resaltado en verde).

En los grupos control, los pacientes con HN suponen un grupo homogéneo, con mayor frecuencia de hombres (73,2), y una edad media de 75,72 años [rango de edad: 40-87 años], mucho mayor que la presentada en los pacientes con EMRR. Todos presentan BOCG negativas, índice IgG $< 0,56$ salvo un paciente (0,89), y ninguno cumple ≥ 3 criterios de BTC. El porcentaje de mujeres en los grupos con ENNI y ENI es superior al de hombres, 66,7% y 64,3% respectivamente, con una edad media de 39,11 y 44,77 años respectivamente [rango de edad: 15-71 años; 30-75 años]. Todos presentan BOCG negativas, ninguno cumple ≥ 3 criterios de BTC, y la mayoría presentan un índice IgG $< 0,56$, salvo un paciente del grupo ENNI (0,58) y dos pacientes del grupo ENI (0,60 y 0,74). Como ya se describió en los resultados, los tres grupos control: HN, ENNI y ENI, fueron considerados como un único grupo dadas las características observadas en estos pacientes, y los resultados obtenidos en el análisis de las CLL κ en LCR.

El grupo con SNA es un grupo más dispar, en el que se recogen pacientes con baja y alta probabilidad de conversión a EM. El porcentaje de mujeres es mayor que el de hombres (77,9%), con una edad media de 35,26 años [rango de edad: 15-62 años].

En el estudio de validación analizamos 158 pacientes, de los que el 56,3% eran mujeres. Estos pacientes fueron clasificados en dos grupos según el punto de corte obtenido para el índice kappa en el estudio piloto de 10,62. En el caso del grupo con índice kappa patológico, la edad media de 39,25 años [rango de edad: 22-73] está en concordancia con la presentada por los pacientes con EMRR del estudio piloto [34,81 años]; mientras que en el grupo con índice kappa < 10,62, la edad media fue superior, 50,09 años [rango de edad: 15-89 años].

Evaluación de las CLL κ y λ en LCR, y sus respectivos índices

Las diferencias encontradas en el valor de las CLL κ en LCR entre los controles y los grupos SNA y EMRR [mediana controles: 0,16, 0,12, 0,14 respectivamente, frente a 0,73 (SNA) y 1,45 (EMRR)], demuestran la presencia de una mayor concentración de CLL κ en el LCR de pacientes que presentan EM o en pacientes con SNA con una elevada probabilidad de conversión a EM. Sin embargo, en el caso de las CLL λ en LCR estas diferencias no fueron notables. El grupo control HN presentó una mediana (0,15) con un valor similar a la presentada por los SNA (0,18) y los EMRR (0,22), aunque el rango intercuartílico de estos dos últimos grupos fue más amplio respecto a los controles, lo que demuestra un elevado valor pronóstico negativo de las CLL λ en LCR.

En cuanto a los índices, se encontraron diferencias para el índice kappa entre los 3 grupos control (mediana: 1,62, 3,37, 2,87 respectivamente), frente a los SNA (mediana: 35,61) y EMRR (mediana: 88,00). Respecto al índice lambda, se encontraron diferencias más notables entre los diferentes grupos, que las observadas para las CLL λ en LCR. Las medianas para los controles (HN, ENNI, ENI) fueron muy similares entre sí, 1,28, 1,35 y 1,10 respectivamente, mostrando diferencias estadísticamente significativas con los grupos SNA (3,81) y EMRR (5,43).

Obtuvimos un punto de corte inicial de **0,38 mg/L para las CLL κ en LCR**, algo inferior al expuesto en publicaciones previas en las que se empleó la misma metodología que la empleada en nuestro laboratorio, como es el caso del estudio publicado por Villar LM, en el que el punto de corte fue de 0,53 mg/L (Villar LM, 2012); similar al publicado por Fischer C et al., de 0,50 mg/L (Fischer C, 2004).

A partir del punto de corte de 0,38 mg/L para las CLL κ en LCR, dividimos a los pacientes con SNA en 2 grupos. En el grupo con valores altos de CLL κ en LCR, todos los pacientes presentaron BOCG positivas e índice IgG > 0,56, y un elevado porcentaje cumplía criterios de RM (BTC), parámetros que se encuentran asociados con el riesgo de conversión a EM. Después de realizar un seguimiento a estos pacientes, un elevado porcentaje dentro de este grupo finalmente convirtió a EM (77,8%), frente sólo un 9,4% de pacientes con un valor de CLL κ en LCR inferior a 0,38 mg/L. Estos datos están en línea por los presentados por Villar LM et al., a pesar de la diferencia obtenida en el punto de corte. En este estudio, un 71,4% de los pacientes con CLL κ en LCR > 0,53 mg/L convirtió a EM, frente sólo el 10,34% del grupo con CLL κ en LCR < 0,53 mg/L (Villar LM, 2012).

Valores elevados de CLL κ en LCR, se asocian con una mayor actividad de desmielinización del SNC, y en consecuencia, con la progresión de la enfermedad (Rinker JR 2nd, 2006). Después del seguimiento de los pacientes con SNA, se observó que los pacientes con un valor de CLL κ en LCR > 0,38 mg/L, presentaban un riesgo de conversión a EM 9,66 veces superior (IC del 95%: 5,10-18,30) respecto a los pacientes con un valor de CLL κ en LCR inferior a 0,38 mg/L. La mediana de conversión para los pacientes con valores elevados de CLL κ en LCR fue de 14 meses. En el estudio de Villar LM et al., el HR fue similar (9,13) con un IC más amplio (IC del 95%: 2,8-29,78). Asimismo, en el estudio de Nazarov VD et al. obtuvieron un HR de 9,718. Como se puede concluir en estos 3 estudios, el riesgo de conversión a EM cuando el paciente presenta un elevado valor de CLL κ en LCR se multiplica por más de 9 veces respecto a aquellos pacientes que presentan valores bajos de CLL κ en LCR (Villar LM, 2012; Nazarov VD, 2017).

Según estudios previos, el índice kappa es el que ha mostrado una mayor sensibilidad y especificidad clínica para detectar EM, en comparación con las CLL κ en LCR. En nuestro estudio piloto, como ya se ha descrito, se obtuvieron las mismas conclusiones.

Mediante el empleo de las curvas ROC obtuvimos un nuevo punto de corte de **0,73 mg/L para las CLL κ en LCR**, 0,41 mg/L para las CLL λ en LCR, 0,56 para el índice IgG, **10,62 para el índice kappa**, y 1,77 para el índice lambda. Las CLL λ en LCR no presentaron valores aceptables (sensibilidad=44,83; especificidad=97,14). Aunque la sensibilidad y especificidad para las CLL κ en LCR fue buena, 75,86 (56,5-89,7) y 97,14 (90,1-99,7) respectivamente, el índice kappa presentó mejores características diagnósticas [sensibilidad = 93,1 (77,2-99,2), especificidad = 95,7 (88,0-99,1)].

En las tablas 29-32 se comparan los resultados obtenidos en nuestro estudio, con los de otros trabajos de similares características, además de la realización de un metaanálisis (Figuras 51-54).

Si comparamos el punto de corte obtenido para las CLL κ en LCR en nuestra cohorte de pacientes (**CLL κ en LCR= 0,73 mg/L**) con otros estudios en los que se ha empleado el mismo equipo de medición, así como el mismo kit de medición de las CLL κ en LCR, observamos que en la mayoría de los casos el punto de corte es ligeramente inferior. Tal es el caso de lo recogido en los artículos de Fischer C et al. en 2004 (CLL κ en LCR 0,50 mg/L), que muestra una elevada sensibilidad (93,8%), sin embargo, no hace alusión a la especificidad; Arneth B et al. en 2009 (CLL κ en LCR 0,41 mg/L), con valores de sensibilidad y especificidad elevados (95% y 100%, respectivamente); Villar LM et al. en 2012 (CLL κ en LCR 0,53 mg/L), con una alta sensibilidad (90%) y una buena especificidad (82,1%). Por el contrario, el estudio publicado por Hassan-Smith G et al. en 2015, muestra un punto de corte de 0,9 mg/L para las CLL κ en LCR, con una sensibilidad y especificidad elevadas (95,7% y 98,1%, respectivamente), valor ligeramente superior al obtenido en nuestro estudio. En otro estudio publicado en 2016 por Passerini G et al., el cut-off de 4,1 mg/L para las CLL κ en LCR fue muy superior al obtenido hasta la fecha en los trabajos publicados, además no presenta

valores aceptables de sensibilidad y especificidad, 66,1% y 77,3% respectivamente. El cut-off publicado por Makshakov G et al., también es muy diferente al resto, lo que es debido a que en este estudio no se emplearon técnicas nefelométricas para la determinación de las CLL κ en LCR como en la mayoría de trabajos publicados, sino que se emplearon técnicas de ELISA (Tabla 29). La comparabilidad del punto de corte para las CLL κ en LCR empleadas en diversos estudios es baja, lo que es debido principalmente a diferencias en el diseño del estudio, en la población y en los métodos de selección del punto de corte.

<i>Referencias</i>	<i>Año</i>	<i>Punto de corte CLL κ en LCR (mg/L)</i>	<i>Sensibilidad (%)</i>	<i>Especificidad (%)</i>	<i>Tipo de Ac</i>	<i>Equipo medición de CLL (reactivo)</i>
<i>Passerini G et al.</i>	2016	4,1	66,1	77,3	M	BN II (N Latex FLC)
<i>Menéndez-Valladares P et al. (datos no publicados)</i>	2015	0,73	75,9	97,1	P	BN II (Freelite)
<i>Makshakov G et al.</i>	2015	0,1030	92,9	88,8	M	Ensayo mediante ELISA
<i>Hassan-Smith G et al.</i>	2014	0,9	95,7	98,1	P	BN II (Freelite)
<i>Bernardi G et al.</i>	2013	0,56	-	-	M	Delta (Freelite)
		0,22	-	-	M	BN II (N latex FLC)
<i>Villar LM et al.</i>	2012	0,53	90	82,1	P	BN II (Freelite)
<i>Arneth B et al.</i>	2009	0,41	95	100	P	BN II (Freelite)
<i>Fischer C et al.</i>	2004	0,50	93,8	-	P	BN II (Freelite)

Tabla 29. Punto de corte para las CLL κ en LCR, sensibilidad y especificidad que predice conversión a Esclerosis Múltiple en los diferentes estudios publicados hasta la fecha en comparación con lo recogido en nuestro estudio (resaltado en verde) [Anticuerpos (Ac) empleados en el análisis: monoclonal (M), policlonal (P); equipos de medición: nefelómetro BNII™ (Siemens Healthcare Diagnostics Inc.), nefelómetro Delta (RADIM); kits para la determinación de CLL: Freelite® (The Binding Site Group Ltd., Birmingham, UK), N Latex FLC (Siemens Healthcare Diagnostics Inc.); Ensayo mediante ELISA (Polignost Ltd., St. Petersburg, Russia)].

Dadas las mejores características que presenta el índice kappa, nos centramos ahora en el análisis del índice kappa. La mediana del índice kappa del grupo de pacientes con SNA con un índice kappa superior a 10,62 [82,09 (39,73-290,40)], fue del orden de la obtenida para los pacientes con EMRR [88 (33,96-295,13)]. Estos hallazgos apoyan el punto de corte obtenido para el índice kappa de 10,62 mediante al análisis de la curva ROC, como biomarcador de gran valor en la conversión a EM de pacientes con SNA.

El empleo del índice kappa para detectar la síntesis intratecal de inmunoglobulinas ha sido publicado por otros grupos (Desplat-Jégo S, 2005; Presslauer S, 2008; Duranti F, 2013; Bernardi G, 2013; Passerini G, 2016; Pieri M, 2017) [ver características clínicas de los pacientes en tabla 28 y 30].

<i>Referencias</i>	<i>EM</i>	<i>SNA</i>	<i>Controles</i>	<i>ENNI</i>	<i>ENI</i>	
<i>Pieri M et al. (176)</i>	Índice kappa	41,67	-	-	2,56	3,04
	BOCG (+/Total)	65/71	-	-	2/72	4/33
<i>Passerini G et al. (100)</i>	Índice kappa	22,4	17,4	-	1,9	1,8
	BOCG (+/Total)	27/34	13/22	-	2/21	4/23
<i>Menéndez-Valladares P et al. (176)</i>	Índice kappa	88,00	35,61	1,96	3,37	2,87
	BOCG (+/Total)	28/29	48/77	1/70	1/15	0/14
<i>Makshakov G et al. (198)</i>	Índice kappa	-	-	-	-	-
	BOCG (+/Total)	(98)	(41)	-	(43)	(16)
<i>Bernardi G et al. (Centro 1: 75)</i>	Índice kappa	52,3	-	2,9	-	-
	BOCG (+/Total)	24/24	-	2/51	-	-
<i>Bernardi G et al. (Centro 2: 21)</i>	Índice kappa	19,4	-	1,7	-	-
	BOCG (+/Total)	15/16	-	0/5	-	-
<i>Duranti F et al. (80)</i>	Índice kappa	41,07	-	-	2	3,48
	BOCG (+/Total)	18/23	-	-	1/33	4/24
<i>Presslauer S et al. (438)</i>	Índice kappa	65,74	63,03	-	(3,01;2,33;3,3;1,34)	1,35
	BOCG (+/Total)	64/70	25/29	(368)	(234)	(78)
<i>Desplat-Jégo S et al. (89)</i>	Índice kappa	41	34	-	9	18,5
	BOCG (+/Total)	31/33	13/15	-	0/33	4/8

Tabla 30. Descripción de las características clínicas de los pacientes en aquellos artículos en los que se hace referencia al índice kappa en pacientes con sospecha de Esclerosis Múltiple; en comparación con lo recogido en nuestro estudio (resaltado en verde).

En el grupo de pacientes con EM se observa un valor del índice kappa muy superior respecto al resto de grupos en todos los estudios analizados (Tabla 29). Asimismo, el valor del índice kappa también es superior en el grupo de pacientes con SNA respecto a los grupos controles. En el grupo de pacientes con SNA se recogen en todos los estudios pacientes con mayor o menor probabilidad de conversión a EM, de ahí el mayor valor del índice kappa medio respecto a los controles, pero inferior al grupo de EM definida. Además, la mayoría de pacientes con EM presentan un resultado de BOCG positivo, mientras que en los grupos de controles, el número de pacientes con BOCG positivas es mínimo.

En nuestra cohorte de pacientes, un índice kappa elevado $>10,62$ incrementa el riesgo de conversión a EM. La misma metodología, mismo equipo (BNII™) y mismo kit para determinar las CLL kappa (Freelite®), tan sólo fue empleado por el grupo de Desplat-Jégo S et al., obteniendo un punto de corte que es el doble que el nuestro (índice kappa=20). Por otro lado, si tenemos en cuenta aquellos trabajos en los que se ha empleado el mismo kit de reactivos, en este caso Freelite®, utilizando diferentes nefelómetros, nuestro índice kappa es mayor que lo publicado hasta la fecha: en el artículo publicado por Presslauer S et al. en 2008 obtuvieron un punto de corte para el índice kappa de 5,9 (sensibilidad del 96%; especificidad del 86%), presentando una especificidad mayor (95,7%), y una sensibilidad menor (93,1%) que las nuestras; y en el artículo publicado por Bernardi G et al. en 2013, el punto de corte obtenido para el índice kappa fue de 7,82 con una sensibilidad del 95%. En un estudio publicado recientemente por Pieri M et al. (mayo 2017), se obtiene un punto de corte para el índice kappa ligeramente superior al obtenido en nuestro estudio, 12,3, con una sensibilidad y especificidad excelentes (93% y 100% respectivamente). En los estudios en los que se emplea el analizador BNII™ y el kit N Latex FLC se obtienen unos valores para el índice kappa similares, pero muy inferiores a los obtenidos empleando otros equipos de medición u otro kit de reactivos, tal es el caso del estudio de Bernardi G et al. publicado en 2013, en el que se obtiene un valor de 2,72; y el estudio de Passerini G et al. publicado en 2016, con un valor de 2,43. Sería interesante estudiar las diferencias obtenidas entre los diferentes estudios y analizar la causa de las mismas para poder garantizar una buena reproducibilidad de las muestras (Tabla 31).

<i>Referencias</i>	<i>Año</i>	<i>Punto de corte índice kappa</i>	<i>Sensibilidad (%)</i>	<i>Especificidad (%)</i>	<i>Tipo de Ac</i>	<i>Equipo medición de CLL (reactivo)</i>
<i>Pieri M et al.</i>	2017	12,3	93	100	M	BN Prospec (N Latex FLC)
<i>Passerini G et al.</i>	2016	2,43	89,3	77,3	M	BN II (N Latex FLC)
<i>Menéndez-Valladares P et al.</i>	2015	10,62	93,1	95,7	P	BN II (Freelite)
<i>Makshakov G et al.</i>	2015	0,0032	40	92,3	M	Ensayo mediante ELISA
<i>Bernardi G et al.</i>	2013	7,82	95	98	M	Delta (Freelite)
		2,72	100	98	M	BN II (N latex FLC)
<i>Duranti F et al.</i>	2013	12	95	91	M	BN Prospec (N Latex FLC)
<i>Presslauer S et al.</i>	2008	5,9	96	86	M	BN Prospec (Freelite)
<i>Desplat-Jégo S et al.</i>	2005	20	69,7	81,8	P	BN II (Freelite)

Tabla 31. Punto de corte para el índice kappa, sensibilidad y especificidad que predice conversión a Esclerosis Múltiple en los diferentes estudios publicados hasta la fecha en comparación con lo recogido en nuestro estudio (resaltado en verde) [Anticuerpos (Ac) empleados en el análisis: monoclonal (M), policlonal (P); equipos de medición: nefelómetro BNII™ (Siemens Healthcare Diagnostics Inc.), nefelómetro BN Prospec® (Siemens Healthcare Diagnostics Inc.), nefelómetro Delta (RADIM); kits para la determinación de CLL: Freelite® (The Binding Site Group Ltd., Birmingham, UK), N Latex FLC (Siemens Healthcare Diagnostics Inc.); Ensayo mediante ELISA (Polignost Ltd., St. Petersburg, Russia)].

A pesar de los valores de sensibilidad y especificidad mostrados por el índice kappa, las BOCG presentan una mejor precisión, con una sensibilidad del 96,5% y una especificidad del 98,6%, lo que apoya estudios previos en los que se emplea la misma metodología para la determinación de las BOCG (Villar LM, 2012).

Sin embargo, mediante la determinación del índice kappa, las desventajas que presentan las BOCG, como son la necesidad de técnicos expertos para desarrollar el análisis y con amplia experiencia en la interpretación de los geles, junto con la falta de

estandarización (baja reproducibilidad entre laboratorios), pueden ser evitadas. En definitiva, hasta la fecha el índice kappa es la mejor alternativa a las BOCG para el cribado de la EM.

En lo referente al índice lambda, como ya se ha descrito, además de que el número de estudios recogidos en la bibliografía es escaso, presentan peores características de sensibilidad y especificidad respecto al índice kappa (Tabla 32). El punto de corte obtenido en nuestro estudio fue de 1,77 con una sensibilidad y especificidad de 82,8% y 80% respectivamente. Los puntos de corte obtenidos en los estudios en los que se ha analizado este parámetro son muy diversos y resultaría complejo realizar comparaciones. Cabe destacar que tanto los valores de sensibilidad como de especificidad son aceptables en la mayoría de estudios, situándose en valores alrededor del 80%.

<i>Referencias</i>	<i>Año</i>	<i>Punto de corte índice lambda</i>	<i>Sensibilidad (%)</i>	<i>Especificidad (%)</i>	<i>Tipo de Ac</i>	<i>Equipo medición de CLL (reactivo)</i>
<i>Pieri M et al.</i>	2017	6,56	83	82	M	BN Prospec (N Latex FLC)
<i>Passerini G et al.</i>	2016	3,04	82,1	75	M	BN II (N Latex FLC)
<i>Menéndez-Valladares P et al. (datos no publicados)</i>	2015	1,77	82,8	80	P	BN II (Freelite)
<i>Makshakov G et al.</i>	2015	0,00029	4	92,3	M	Ensayo mediante
<i>Bernardi G et al.</i>	2013	4,36	83	-	M	Delta (Freelite)
		2,07	93	-	M	BN II (N latex FLC)

Tabla 32. Punto de corte para el índice lambda, sensibilidad y especificidad que predice conversión a Esclerosis Múltiple en los diferentes estudios publicados hasta la fecha en comparación con lo recogido en nuestro estudio (resaltado en verde) [Anticuerpos (Ac) empleados en el análisis: monoclonal (M), policlonal (P); equipos de medición: nefelómetro BNII™ (Siemens Healthcare Diagnostics Inc.), nefelómetro BN Prospec® (Siemens Healthcare Diagnostics Inc.), nefelómetro Delta (RADIM); kits para la determinación de CLL: Freelite® (The Binding Site Group Ltd., Birmingham, UK), N Latex FLC (Siemens Healthcare Diagnostics Inc.); Ensayo mediante ELISA (Polignost Ltd., St. Petersburg, Russia)].

Los datos de cada estudio en el que se hace referencia al empleo del índice kappa para el diagnóstico de la EM mostrados en la tabla 31, se organizaron de manera sistemática y fueron depurados para realizar el metaanálisis mediante el programa MetaDisc (ES)[®]. Se incluyeron aquellos estudios en los que se empleó el índice kappa para el diagnóstico de la EM, y en los que se emplearon técnicas nefelométricas para la determinación de las CLL. A partir de estos datos valoramos la heterogeneidad de los estudios y la posible existencia de efecto umbral, uno de los principales sesgos en los metaanálisis.

Mediante el modelo de efectos aleatorios de DerSimonian y Laird, con un nivel de confianza del 95%, se determinó que no había evidencia estadística de heterogeneidad [$r=-0,405$, $p=0,320$]. Estos resultados se confirman con la curva ROC resumen (SROC), constituida mediante la combinación de las estimaciones de sensibilidad y especificidad de los estudios incluidos en el metaanálisis (Figura 51). Se obtuvo un área bajo la curva de 0,9760, que representa el rendimiento diagnóstico del índice kappa, con un índice Q=0,9300, que indica el punto de mayor sensibilidad y especificidad (medida global de eficacia de la prueba en estudio, índice kappa).

Por medio de la realización del metaanálisis, el resultado de sensibilidad global fue de 0,92 (IC al 95%: 0,88 – 0,95) (Figura 52), y la especificidad global de 0,91 (IC al 95%: 0,88 – 0,93) (Figura 53). Además, se determinó una odds ratio diagnóstica global de 176,59 (IC al 95%: 40,186–776,03) mediante el modelo de efectos aleatorios, que indica que el índice kappa posee una buena capacidad discriminatoria (Figura 54; Tabla 33). No existen grandes diferencias en el porcentaje de contribución de cada estudio en el cálculo de la odds ratio media como se refleja en la tabla 33, en la que se recogen los pesos en % de cada estudio, junto con los valores de la odds ratio diagnóstica. En concreto, nuestro estudio contribuye en un 11,85%.

Existió heterogeneidad de los estudios en relación a la sensibilidad (chi cuadrado=29,93; $p<0,0001$), y especificidad (chi cuadrado = 33,72; $p<0,00001$). De manera general, la sensibilidad de los estudios para obtener un punto de corte para el índice kappa, estuvo comprendida entre 0,70 y 1,00; y la especificidad entre 0,77 y 1,00. Los resultados se recogen en las gráficas forest plot (Figuras 52-54). En lo

referente a nuestro estudio, la sensibilidad se encuentra dentro del rango medio global calculado, mientras que la especificidad es ligeramente superior a la media global. Uno de los estudios presenta una especificidad muy inferior al resto, que hace que la media global de especificidad sea menor a la esperada. En cuanto a la odds ratio diagnóstica, el valor calculado en nuestro estudio se encuentra dentro del rango global medio, lo que apoya la buena capacidad discriminatoria del punto de corte calculado en nuestro estudio para el índice kappa.

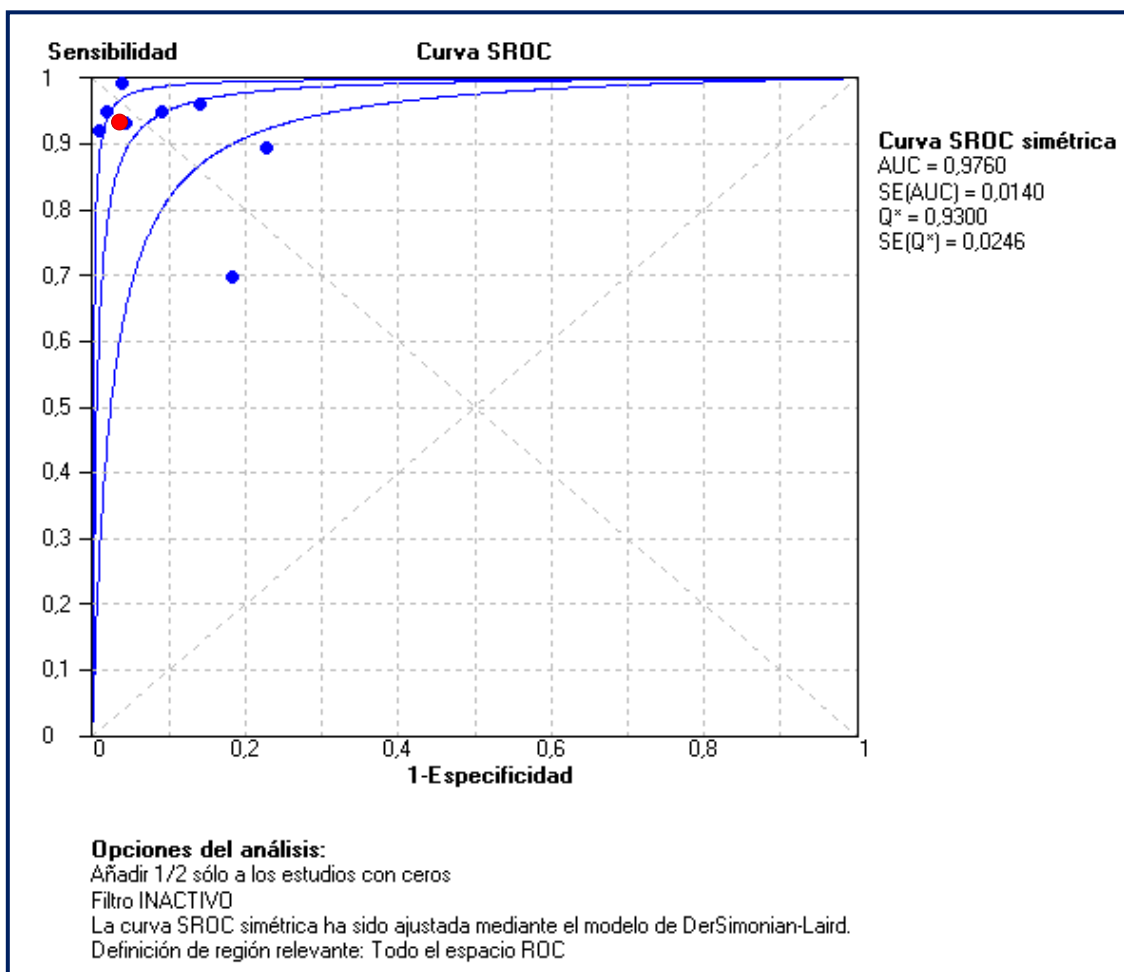


Figura 51. Curva SROC. Revela la distribución de los estudios que hacen referencia al índice kappa y que emplean técnicas nefelométricas para la determinación de las CLL (cada estudio es un punto del gráfico de dispersión; el punto rojo se corresponde con nuestro estudio publicado). Se mantiene la relación de interdependencia entre sensibilidad (eje de ordenadas) y especificidad (eje de abscisas, representado por 1-especificidad), que varía conforme el umbral de corte (línea central azul). Se muestran los intervalos de confianza del umbral de corte (líneas azules superior e inferior).

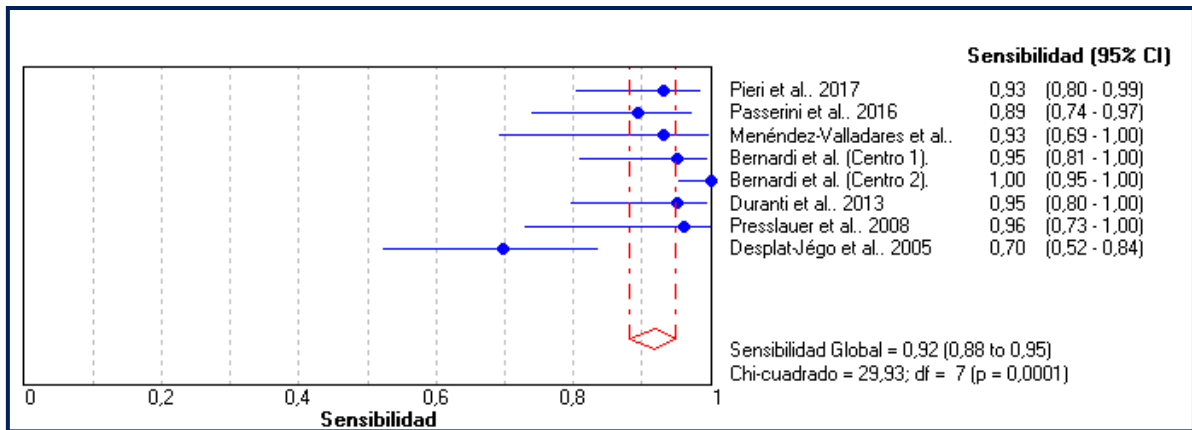


Figura 52. Representación forest plot de la sensibilidad.

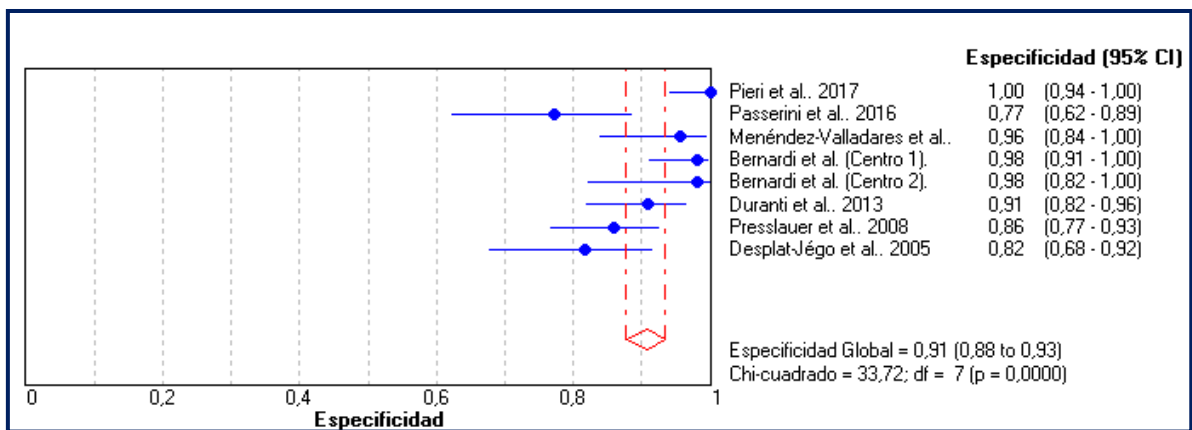


Figura 53. Representación forest plot de la especificidad.

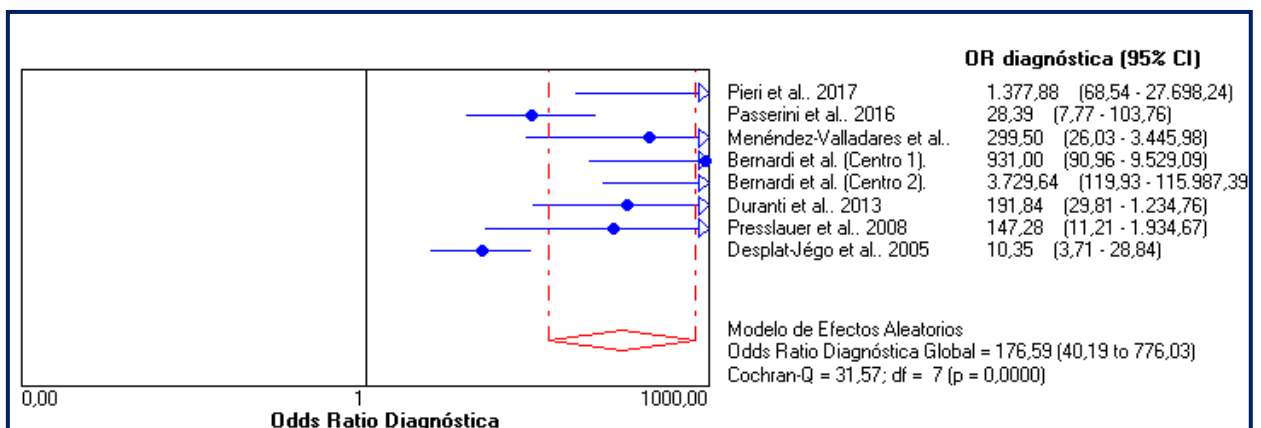


Figura 54. Representación forest plot de la odds ratio diagnóstica (empleando el modelo de efectos aleatorios de DerSimonian y Laird).

<i>Referencias</i>	<i>Punto de corte</i>	<i>OR (IC al 95%)</i>	<i>% peso</i>
<i>Pieri M et al. (2017)</i>	12,3	1377,9 (68,5-27698,2)	10,18
<i>Passerini G et al. (2016)</i>	2,43	28,39 (7,7-103,8)	15,43
<i>Menéndez-Valladares P et al. (2015)</i>	10,62	299,5 (26,0-3446,0)	11,85
<i>Bernardi G et al. (2013)</i>	7,82	931,0 (90,9-9529,1)	12,22
	2,72	3729,6 (119,9-115987,4)	9,01
<i>Duranti F et al. (2013)</i>	12	191,8 (29,8-1234,8)	13,71
<i>Presslauer S et al. (2008)</i>	5,9	147,3 (11,2-1934,7)	11,44
<i>Desplat-Jégo S et al. (2005)</i>	20	10,3 (3,7-28,8)	16,15
GLOBAL		176,6 (40,2-776,0)	

Tabla 33. Datos de la odds ratio diagnóstica. Recoge el intervalo de confianza al 95% de cada estudio incluido en el metaanálisis, así como el peso de cada estudio en %.

Los pacientes con SNA con un valor del índice kappa elevado, por encima de 10,62 presentan un riesgo de conversión a EM elevado (HR=7,34), respecto a los pacientes con valores del índice kappa <10,62 ($p < 0,0001$). Si empleamos la regresión de Cox combinando el índice kappa con los criterios de BTC, obtenemos un HR inferior (HR=5,30) al obtenido en el análisis univariante con el índice kappa, lo que es consistente con estudios previos (Villar LM, 2012).

El valor predictivo del índice kappa de 10,62 para la conversión a EM está afianzado por el hecho de que ambos subgrupos con SNA divididos por dicho punto de corte, presentan diferencias estadísticamente significativas comparando los criterios de BTC para la diseminación de lesiones en el espacio y en el tiempo, y los criterios de RM junto con BOCG. El índice kappa es un fuerte predictor de la síntesis intratecal de IgG (BOCG positivas, índice IgG >0,56), lo que respalda las observaciones obtenidas en otros estudios (Arneth B, 2009; Senel M, 2014).

El hecho de que el 71,4% de los pacientes con un índice kappa por encima del punto de corte convierta a EM, mientras que el 28,6% permanece como SNA, está en línea con publicaciones previas en las que se correlaciona un elevado valor del índice kappa con la conversión a EM (Rinker JR 2nd, 2006; Villar LM, 2012).

Correlación del índice kappa con el estadio EDSS

En la bibliografía nos encontramos con una ligera discrepancia referente a la correlación entre el índice kappa, y la Expanded Disability Status Scale (EDSS) de Kurtzke para cuantificar la discapacidad de los pacientes con EM.

Desplat-Jego S et al. en 2005, no observaron ninguna correlación entre el índice kappa y la escala EDSS, con una $r=0,17$. La misma conclusión fue descrita por Presslauer S et al. en el artículo publicado en 2008 (datos no mostrados). Por el contrario, Makshakov G et al. en un estudio publicado en 2015, mostraron una correlación entre el índice kappa y la escala EDSS, con una $r=0,4184$ y una $p=0,0072$. Aunque no se trata de una gran correlación, si es significativa. En 2017, Pieri M et al. también concluyeron que existía una correlación positiva entre ambos parámetros.

En nuestro estudio, no encontramos correlación entre el índice kappa y la escala EDSS al analizarla como escala cuantitativa discreta ($r=0,133$, $p=0,166$), además de presentar un mal coeficiente de correlación, éste no es significativo. Sin embargo, al agrupar a los pacientes en 4 grupos según el grado de discapacidad al inicio (EDSS < 2; EDSS entre 2.0-2.5; EDSS entre 3-3.5; y EDSS ≥ 4), si encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p=0,031$) para el índice kappa. Si además, agrupamos a los pacientes en dos grupos según el punto de corte del índice kappa de 10,62, que predice una alta probabilidad de conversión a EM, observamos que la mayoría de pacientes que presentan un mayor grado de discapacidad se encuentran en el grupo con un índice kappa > 10,62. Una escala EDSS ≥ 2 , que implica una leve discapacidad fue encontrada en un 64,47% de los pacientes con un índice kappa > 10,62, frente a un 39,29% de los pacientes con un índice kappa < 10,62.

Correlación del índice kappa con otros parámetros estudiados

Comparamos el valor del índice kappa considerando el punto de corte de 10,62, con la presencia de brote en el momento de la punción lumbar, y nos encontramos con que presentaban diferencias estadísticamente significativas ($p=0,005$). El grupo con un valor elevado, índice kappa $>10,62$, mostró una mediana de 158,84, frente al grupo con un índice kappa $<10,62$, con una mediana de 42,52. Además, los pacientes con valores elevados del índice kappa, con un valor >323 , que no se encontraban en brote en el momento de la punción lumbar, convirtieron a EM. Todo ello, refuerza el valor diagnóstico del índice kappa como biomarcador de conversión a EM.

De igual modo, estudiamos si había alguna relación entre el índice kappa y el sistema funcional afectado en el brote (cerebelo, funciones sensoriales, vejiga, funciones visuales, funciones neuropsicológicas; y tracto piramidal, tronco cerebral), y no observamos ninguna correlación ($p=0,145$).

Asimismo, estudiamos el motivo de la conversión a EM, debida a un brote o por presentar criterios de EM (EM + BOCG), y no encontramos ninguna correlación ($p=0,634$).

Correlación del índice kappa con el tratamiento del paciente

No se observaron diferencias entre el índice kappa y el tratamiento del paciente, así como entre el hecho de que el tratamiento del paciente fuera modificado durante el transcurso de la enfermedad. Sin embargo, cuando se agruparon los pacientes de acuerdo a la terapia recibida: primera, y segunda línea, se observaron diferencias significativas. Los pacientes que recibieron una terapia de segunda línea, ya sea como primer tratamiento o como segunda opción terapéutica, presentaron valores de índice kappa superiores a los presentados por los pacientes que recibían una terapia de primera línea (medianas=143 y 59, respectivamente). Estos resultados ponen de manifiesto el elevado valor pronóstico que posee el biomarcador índice

kappa, dado el mayor valor que presentan los pacientes que son sometidos a una terapia de segunda línea.

Para evaluar la utilidad del biomarcador índice kappa como marcador pronóstico o de monitorización de la terapia, sería necesario realizar al menos una segunda punción lumbar transcurrido un tiempo determinado desde el inicio de la terapia para determinar si existen cambios en el índice kappa. Por motivos de bioética sería complicado realizar ese seguimiento del paciente, dadas las características invasivas y no exentas de riesgos que presenta la realización de las punciones lumbares, así como el requisito de contar con el consentimiento informado de los pacientes.

Validación del índice kappa

Con el índice kappa incluido en la cartera de servicios de nuestro hospital, analizamos las muestras recibidas procedentes de nuestro área. Estudiamos un total de 158 pacientes, a los que se les realizó un seguimiento de un año para validar el punto de corte de 10,62 obtenido en el estudio piloto. Debido a un cambio de metodología ajeno a nosotros, el equipo de medición para la determinación de las CLL κ , fue modificado (SpaPlus® por BNII™) aunque sí se mantuvo el kit de reactivo (Freelite®). Como ya se ha descrito, existen ligeras diferencias en el valor del índice kappa al emplear distintos equipos de medición, así como diferentes kits de reactivos de CLL (Tabla 31). Consideramos necesario, volver a calcular un nuevo punto de corte adaptado al nuevo equipo de medición. Como ya se ha mencionado, a pesar de las diferencias encontradas entre los equipos de medición, BNII™ y SpaPlus®, no se encontraron diferencias relativas a la positividad del test (datos no mostrados), lo que se ha determinado en otros estudios (Zeman D, 2016).

El nuevo punto de corte para el índice kappa, de 12,33 (sensibilidad=84,62; especificidad=96,06), no implicó cambios en cuanto a la predicción de resultados positivos del test, respecto al punto de corte de 10,62 obtenido previamente. Como

punto a favor, decir que para el cálculo de este nuevo punto de corte, se empleó una muestra más representativa de nuestra población, respecto al estudio piloto, en el que se había realizado una selección previa de los pacientes. Este punto de corte para el índice kappa es idéntico al publicado recientemente por Pieri M et al. (mayo 2017).

Al dividir a los pacientes de acuerdo al punto de corte de 12,33, se llegó a las mismas conclusiones que en el estudio piloto como era previsible. Los pacientes con un elevado valor del índice kappa presentaban una media de edad en la década de los 30 años, con un porcentaje de mujeres 3:1 respecto al de hombres, datos característicos de la EM. La mayoría presentaban BOCG e índice IgG positivos, y cumplían ≥ 3 criterios de BTC. A pesar de que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, 15 pacientes de 32 con índice kappa $> 12,33$, mostraron contraste con Gd positivo, lo que indica actividad de la enfermedad, frente a sólo 1 paciente de 126 del grupo con índice kappa $< 12,33$. Además, un porcentaje elevado de pacientes con valor de índice kappa elevado cumplía criterios de RM y presentaba BOCG positivas. En lo referente a la conversión a EM, un 68,8% de los pacientes del grupo con un índice kappa elevado convirtió a EM, frente a sólo el 3,2% del otro grupo.

Utilidad clínica del índice kappa

Con el fin de evaluar la utilidad clínica que presenta el índice kappa, recogimos los datos del estudio piloto y del estudio de validación, y los analizamos globalmente para conseguir un mayor tamaño muestral. Un total de 334 pacientes se incluyeron en el estudio, de los cuales 92 convirtieron a EM. Se analizaron los pacientes según el punto de corte para el índice kappa de 12,33 obtenido en el estudio de validación, y al compararlos con diferentes parámetros clínicos y de laboratorio, se llegó a los mismos resultados obtenidos en estudios previos: la presencia de BOCG positivas e índice IgG $> 0,58$ fue mayor en el grupo de pacientes con índice kappa $> 12,33$. En este grupo se sitúan la mayoría de pacientes que cumplen ≥ 3 criterios de BTC, y también aquellos que cumplen criterios de RM con BOCG positivas. Finalmente, el porcentaje de

pacientes que convirtieron a EM fue muy superior en el grupo de pacientes con índice kappa >12.33 (77,6 %) frente al grupo de pacientes con índice kappa <12.33 (5,7 %). Cabe destacar, que al aumentar el tamaño muestral, a diferencia de lo encontrado en los estudios piloto y de validación por separado, sí se obtuvieron diferencias significativas entre los pacientes según el punto de corte del índice kappa respecto al contraste con Gd en las pruebas de RM. El porcentaje de pacientes con contraste con Gd positivo fue mayor en el grupo de pacientes con un valor del índice kappa > 12,33, lo que nos indica una posible asociación entre el índice kappa y la actividad de la enfermedad.

Consideraciones finales y perspectivas futuras

Los resultados obtenidos en el presente estudio, permiten demostrar que el riesgo de conversión a EM de pacientes con SNA se incrementa notablemente para valores elevados del índice kappa. El gran valor que aporta este estudio respecto a lo recogido en la bibliografía hasta la fecha, es el elevado número de pacientes seleccionados junto con los rigurosos criterios de inclusión. Esto nos ha permitido confirmar los hallazgos encontrados en estudios previos. La comparación entre los diversos estudios es compleja debido a la diversidad de metodologías empleadas y a las diferencias existentes en el diseño de los estudios. La disposición del ensayo para la determinación de las CLL en determinados dispositivos limita el uso en los laboratorios. Son necesarios estudios multicéntricos futuros que permitan validar los resultados encontrados hasta la fecha.

Además del valor diagnóstico que presenta el índice kappa, sería de gran interés evaluar el valor pronóstico o de monitorización de la terapia del biomarcador mediante el seguimiento de los pacientes. Asimismo, sería interesante analizar la posible asociación entre el índice kappa y la actividad de la enfermedad.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- La búsqueda de un biomarcador adecuado capaz de predecir la conversión de SNA a EM es vital para proporcionar un tratamiento temprano a los pacientes, mejorando su calidad de vida. En nuestra experiencia, la incorporación del índice kappa a la rutina clínica del hospital ha permitido obtener resultados en menos de 24 horas. Esto conduce a una decisión más temprana ante diagnósticos de EM dudosos.
- Un valor del índice kappa elevado puede predecir la capacidad de conversión a EM con una buena precisión. En nuestra cohorte hemos obtenido un punto de corte con el equipo BNII™ para el índice kappa de 10,62 (sensibilidad 93,1%, especificidad 95,7%), y con el SpaPlus® de 12,33 (sensibilidad 84,6%, especificidad 96,1%). A pesar de las diferencias encontradas entre los equipos de medición, no existen diferencias entre ambos puntos de corte calculados en cuanto a la positividad del test.
- Se establece que los pacientes que presenten un índice kappa superior 10,62, tienen una probabilidad de conversión a EM 7,34 veces mayor que los pacientes con valores del índice kappa inferiores a 10,62.
- El índice kappa es un biomarcador apropiado para ayudar en el diagnóstico de EM en nuestra población, lo que puede ser extrapolado a otras áreas geográficas.
- El elevado valor pronóstico negativo del índice kappa, descarta la posibilidad de que el paciente presente EM con una probabilidad del 97,1%. Asimismo, se ha estudiado la posible asociación entre el índice kappa y la actividad de la enfermedad.
- Debido a los avances en tecnología, el índice kappa puede ser medido con rapidez empleando un analizador automático; las características del equipo permiten que pueda ser fácilmente incorporado en la rutina diaria de los laboratorios de inmunología.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

A

Alvarez-Cermeno JC, Villar LM. Multiple sclerosis: Oligoclonal bands--a useful tool to avoid MS misdiagnosis. *Nat Rev Neurol* 2013;9 (6):303-4.

Arnold D, Traboulsee A, Coles A, et al. Durable effect of alemtuzumab on MRI activity in treatment-naïve active relapsing-remitting multiple sclerosis patients: 4- year follow-up of CARE-MS I (P7.246). *Neurology*. 2015; 84; 14 Supplement P7.246.

B

Barkhof F, Filippi M, Miller DH, Scheltens P, Campi A, Polman CH, et al. Comparison of MRI criteria at first presentation to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. *Brain*. 1997;120 (Pt 11):2059-69.

Bernardi G, Cataldo I. La determinazione delle catene leggere libere nel liquido cefalorachidiano: l'esperienza di due laboratori Italiani. *Biochim Clin* 2013; 37: 389–394.

Bielekova B, Martin R. Development of biomarkers in multiple sclerosis. *Brain* 2004 Jul; 127 (7): 1463-1478.

Birnbaum G. Stress proteins: their role in the normal central nervous system and in disease states, especially multiple sclerosis. *Springer Semin Immunopathol*. 1995;17(1):107-18.

Burgoon MP, Gildea DH, Owens GP. B cells in multiple sclerosis. *Front Biosci* 2004 Jan 1;9:786-796.

Bradwell AR. Serum free light chain analysis (plus Hevylite). 5th edition. 2008. 312 p.

C

Candelieri-Merlicco A, Valero-Delgado F, Martinez-Vidal S, Lastres-Arias Mdel C, Aparicio-Castro E, Toledo-Romero F, et al. Prevalence of multiple sclerosis in Health District III, Murcia, Spain. *Mult Scler Relat Disord*. 2016;9:31-5.

Casado V, Martinez-Yelamos S, Martinez-Yelamos A, Carmona O, Alonso L, Romero L, et al. Direct and indirect costs of Multiple Sclerosis in Baix Llobregat (Catalonia, Spain), according to disability. *BMC Health Serv Res*. 2006;6:143.

Cepok S, Rosche B, Grummel V, Vogel F, Zhou D, Sayn J, et al. Short-lived plasma blasts are the main B cell effector subset during the course of multiple sclerosis. *Brain*. 2005;128:1667-76.

Charcot JM, Bourneville DM, Babinsky J, et al. *Oeuvres completes de J.M. Charcot*. Bureaux de Progrès médical, Paris, 1888, 9v.

Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet* 2002;359(9313):1221-31.

Cordero M, Vinuela F, Angulo S, Martinez-Parra C, Izquierdo G. Sensitivity and efficiency of intrathecal IgG secretion in multiple sclerosis. Comparison of several indices and formulas using pre-established values of specificity. *Neurologia (Barcelona, Spain)*. 1997 Aug-Sep;12(7):277-80.

D

D'Alessandro R, Vignatelli L, Lugaresi A, Baldin E, Granella F, Tola MR, et al. Risk of multiple sclerosis following clinically isolated syndrome: a 4-year prospective study. *J Neurol*. 2013;260(6):1583-93.

Dalton CM, Brex PA, Miszkiel KA, Hickman SJ, MacManus DG, Plant GT, et al. Application of the new McDonald criteria to patients with clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2002;52(1):47-53.

Delpech B, Lichtblau E. [Immunochemical estimation of IgG and albumin in cerebrospinal fluid]. *Clin Chim Acta*. 1972;37:15-23.

Desplat-Jego S, Feuillet L, Pelletier J, Bernard D, Cherif AA, Boucraut J. Quantification of immunoglobulin free light chains in cerebrospinal fluid by nephelometry. *J Clin Immunol* 2005 Jul;25(4):338-345.

Dominguez-Mozo MI, Garcia-Montojo M, Arias-Leal A, Garcia-Martinez A, Santiago JL, Casanova I, et al. Monitoring the John Cunningham virus throughout natalizumab treatment in multiple sclerosis patients. *Eur J Neurol*. 2016;23(1):182-9.

Dorta-Contreras AJ, Reiber H. Molecular diffusion/cerebrospinal fluid flow theory. *Rev Neurol* 2004 Sep 16-30;39(6):564-569.

Duranti F, Pieri M, Centonze D, Buttari F, Bernardini S, Dessi M. Determination of kappaFLC and kappa Index in cerebrospinal fluid: a valid alternative to assess intrathecal immunoglobulin synthesis. *J Neuroimmunol* 2013 Oct 15;263(1-2):116-120.

E

Engell T. A clinico-pathoanatomical study of multiple sclerosis diagnosis. *Acta Neurol Scand*. 1988;78(1):39-44.

F

Fagnart OC, Sindic CJ, 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(1-2):119-32.

Farina C, Aloisi F, Meinl E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol*. 2007;28(3):138-45.

Fernández-Fernández O. Clinical features of relapsing remitting-multiple sclerosis. Prognostic factors. *Rev Neurol* 2002 Dec 1-15; 35 (11): 1067-1073.

Fernandez O, Garcia-Merino JA, Arroyo R, Alvarez-Cermeno JC, Izquierdo G, Saiz A, et al. Spanish consensus on the use of natalizumab (Tysabri(R))-2013. *Neurologia*. 2015;30(5):302-14.

Frohman EM, Racke MK, Raine CS. Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med*. 2006;354(9):942-55.

Fryden A, Link H, Norrby E. Cerebrospinal fluid and serum immunoglobulins and antibody titers in mumps meningitis and aseptic meningitis of other etiology. *Infect Immun*. 1978;21(3):852-61.

G

Goldschmidt T, Antel J, König FB, Brück W, Kuhlmann T. Remyelination capacity of the MS brain decreases with disease chronicity. *Neurology*. 2009;72(22):1914-21.

Gomez-Moreno M, Diaz-Sanchez M, Ramos-Gonzalez A. Application of the 2010 McDonald criteria for the diagnosis of multiple sclerosis in a Spanish cohort of patients with clinically isolated syndromes. *Mult Scler*. 2012;18(1):39-44.

H

Hassan-Smith G, Durant L, Tsentemeidou 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 Nov 15;276(1-2):175-179.

Harrer A, Tumani H, Niendorf S, Lauda F, Geis C, Weishaupt A, et al. Cerebrospinal fluid parameters of B cell-related activity in patients with active disease during natalizumab therapy. *Mult Scler*. 2013;19(9):1209-12.

Harris VK, Sadiq SA. Stem cell therapy in multiple sclerosis: a future perspective. *Neurodegener Dis Manag*. 2015;5(3):167-70.

Hauser SL, Chan JR, Oksenberg JR. Multiple sclerosis: Prospects and promise. *Ann Neurol*. 2013;74(3):317-27.

Hellings N, Raus J, Stinissen P. Insights into the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Immunol Res*. 2002;25(1):27-51.

Henderson AP, Barnett MH, Parratt JD, Prineas JW. Multiple sclerosis: distribution of inflammatory cells in newly forming lesions. *Ann Neurol*. 2009;66(6):739-53.

Horga A, Tintore M. Natalizumab for relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurologia*. 2011;26(6):357-68.

Huss AM, Halbgebauer S, Ockl P, Trebst C, Spreer A, Borisow N, et al. Importance of cerebrospinal fluid analysis in the era of McDonald 2010 criteria: a German-Austrian retrospective multicenter study in patients with a clinically isolated syndrome. *J Neurol*. 2016;263(12):2499-504.

I

Izquierdo G, Hauw JJ, Lyon-Caen O, Marteau R, Escourolle R, Buge A, et al. Value of multiple sclerosis diagnostic criteria. 70 autopsy-confirmed cases. *Arch Neurol*. 1985;42(9):848-50.

Izquierdo G, Venegas A, Sanabria C, Navarro G. Long-term epidemiology of multiple sclerosis in the Northern Seville District. *Acta Neurol Scand*. 2015;132(2):111-7.

K

Kabat EA, Moore DH, Landow H. An Electrophoretic Study of the Protein Components in Cerebrospinal Fluid and their Relationship to the Serum Proteins. *J Clin Invest* 1942 Sep;21(5):571-577.

Kaplan B, Livneh A and Sela BA. Immunoglobulin free light chain dimers in human diseases. *Scientific World Journal* 2011; 11: 726-735.

Katzmann JA, Clark RJ, Abraham RS, Bryant S, Lymp JF, Bradwell AR, 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):1437-44.

Kingwell E, Marriott JJ, Jette N, Pringsheim T, Makhani N, Morrow SA, et al. Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Europe: a systematic review. *BMC Neurol*. 2013;13:128.

Kuhle J, Malmstrom C, Axelsson M, Plattner K, Yaldizli O, Derfuss T, et al. Neurofilament light and heavy subunits compared as therapeutic biomarkers in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand*. 2013;128(6):e33-6.

Kuhle J, Disanto G, Dobson R, Adiutori R, Bianchi L, Topping J, et al. Conversion from clinically isolated syndrome to multiple sclerosis: A large multicentre study. *Mult Scler*. 2015;21(8):1013-24.

Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*. 1983;33(11):1444-52.

L

Larochelle C, Alvarez JI, Prat A. How do immune cells overcome the blood-brain barrier in multiple sclerosis? *FEBS Lett*. 2011;585(23):3770-80.

Legroux L, Arbour N. Multiple Sclerosis and T Lymphocytes: An Entangled Story. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2015;10(4):528-46.

Lennon VA, Wingerchuk DM, Kryzer TJ, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Fujihara K, et al. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet*. 2004;364(9451):2106-12.

Link H, Tibbling G. Principles of albumin and IgG analyses in neurological disorders. II. Relation of the concentration of the proteins in serum and cerebrospinal fluid. *Scand J Clin Lab Invest*. 1977;37(5):391-6.

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 Nov;102(5):322-325.

M

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;10(11):e0143375.

Mandrekar JN, Mandrekar SJ , Cha SS . Cutpoint determination methods in survival analysis using SAS®. *Proceedings of the 28th SAS Users Group International Conference (SUGI)*. 2003:261-28.

Martinez-Altarriba MC, Ramos-Campoy O, Luna-Calcano IM, Arrieta-Anton E. [A review of multiple sclerosis (1). Presentation of a case]. *Semergen*. 2015;41(5):261-5.

McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001 Jul;50(1):121-127.

McFarland HF, Martin R. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat Immunol* 2007 Sep;8(9):913-919.

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. A comparison and diagnostic applications. *Brain*. 1990;113 (Pt 5):1269-89.

Menéndez-Valladares P, García-Sánchez MI, Cuadri Benítez P, et al. Free kappa light chains in cerebrospinal fluid as a biomarker to assess risk conversion to multiple sclerosis. *Mult Scler J Exp Transl Clin* 2015; 1: 1-9.

Meyer-Moock S, Feng YS, Maeurer M, Dippel FW, Kohlmann T. Systematic literature review and validity evaluation of the Expanded Disability Status Scale (EDSS) and the Multiple Sclerosis Functional Composite (MSFC) in patients with multiple sclerosis. *BMC Neurol*. 2014;14:58.

Miller D, Weinshenker B, Filippi M, et al. Differential diagnosis of suspected multiple sclerosis: a consensus approach. *Mult Scler*. 2008;14 (9), 1157–1174.

Milo R, Miller A. Revised diagnostic criteria of multiple sclerosis. *Autoimmun Rev* 2014 Apr-May;13(4-5):518-524.

Moreira MA, Tilbery CP, Lana-Peixoto MA, Mendes MF, Kaimen-Maciel DR, Callegaro D. [Historical aspects of multiple sclerosis]. *Rev Neurol*. 2002;34(4):379-83.

N

Nazarov VD, Makshakov GS, Mazing AV, Surkova EA, Krasnov VS, Shumilina MV, et al. [Diagnostic value of immunoglobulin free light chains at the debut of multiple sclerosis]. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova*. 2017;117(2. Vyp. 2):60-5.

Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2000;343(13):938-52.

O

Ohguro H, Chiba S, Igarashi Y, Matsumoto H, Akino T, Palczewski K. Beta-arrestin and arrestin are recognized by autoantibodies in sera from multiple sclerosis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(8):3241-5.

Ohman S, Forsberg P, Nelson N, Vrethem M. An improved formula for the judgement of intrathecally produced IgG in the presence of blood brain barrier damage. *Clin Chim Acta*. 1989;181(3):265-72.

P

Passerini G, Dalla Costa G, Sangalli F, Moiola L, Colombo B, Locatelli M, et al. Free Light Chains and Intrathecal B Cells Activity in Multiple Sclerosis: A Prospective Study and Meta-Analysis. *Mult Scler Int.* 2016;2016:2303857.

Petzold A. Intrathecal oligoclonal IgG synthesis in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2013 Sep 15;262(1-2):1-10.

Pieri M, Storto M, Pignalosa S, Zenobi R, Buttari F, Bernardini S, et al. KFLC Index utility in multiple sclerosis diagnosis: Further confirmation. *J Neuroimmunol.* 2017;309:31-3.

Pittock SJ, Mayr WT, McClelland RL, Jorgensen NW, Weigand SD, Noseworthy JH, Weinshenker BG, Rodriguez M. Change in MS-related disability in a population-based cohort, a 10-year follow-up study. *Neurology.* 2004;62:51–59.

Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol* 2005 Dec;58(6):840-846.

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 Feb;69(2):292-302.

Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, McDonald WI, Davis FA, Ebers GC, et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol.* 1983;13(3):227-31.

Presslauer S, Milosavljevic D, Brucke T, Bayer P, Hubl W. Elevated levels of kappa free light chains in CSF support the diagnosis of multiple sclerosis. *J Neurol* 2008 Oct;255(10):1508-1514.

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 Feb 25;9(2):e89945.

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* 2015

Przybek J, Gniatkowska I, Mirowska-Guzel D, Czlonkowska A. Evolution of diagnostic criteria for multiple sclerosis. *Neurol Neurochir Pol.* 2015;49(5):313-21.

R

Ramsden DB. Multiple sclerosis: assay of free immunoglobulin light chains. *Ann Clin Biochem.* 2017;54(1):5-13.

Reiber H. The discrimination between different blood-CSF barrier dysfunctions and inflammatory reactions of the CNS by a recent evaluation graph for the protein profile of cerebrospinal fluid. *J Neurol.* 1980;224(2):89-99.

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.

Reitsma JB, Glas AS, Rutjes AW, Scholten RJ, Bossuyt PM, Zwinderman AH. Bivariate analysis of sensitivity and specificity produces informative summary measures in diagnostic reviews. *J Clin Epidemiol.* 2005;58(10):982-90.

Rinker JR 2nd, Trinkaus K, Cross AH. Elevated CSF free kappa light chains correlate with disability prognosis in multiple sclerosis. *Neurology.* 2006;67(7):1288-90.

Rudick RA, Pallant A, Bidlack JM, Herndon RM. Free kappa light chains in multiple sclerosis spinal fluid. *Ann Neurol* 1986 Jul;20(1):63-69.

S

Schapiro RT. Managing symptoms of multiple sclerosis. *Neurol Clin*. 2005;23(1):177-87, vii.

Shimizu F, Kanda T. [Disruption of the blood-brain barrier in inflammatory neurological diseases]. *Brain Nerve*. 2013;65(2):165-76.

Schroeder HW, Jr., Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(2 Suppl 2):S41-52.

Schuller E, Sagar HJ. Central nervous system IgG synthesis in multiple sclerosis. Application of a new formula. *Acta Neurol Scand*. 1983;67(6):365-71.

Schumacher GA, Beebe G, Kibler RF, Kurland LT, Kurtzke JF, McDowell F, et al. Problems of experimental trials of therapy in multiple sclerosis: report by the panel of the evaluation of experimental trials of therapy in multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci*. 1965;122:552-68.

Schwenkenbecher P, Sarikidi A, Wurster U, Bronzlik P, Suhs KW, Raab P, et al. McDonald Criteria 2010 and 2005 Compared: Persistence of High Oligoclonal Band Prevalence Despite Almost Doubled Diagnostic Sensitivity. *Int J Mol Sci*. 2016;17(9).

Simpson S, Jr., Blizzard L, Otahal P, Van der Mei I, Taylor B. Latitude is significantly associated with the prevalence of multiple sclerosis: a meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2011;82(10):1132-41.

Sindic CJ, Cambiaso CL, Depre A, Laterre EC, Masson PL. The concentration of IgM in the cerebrospinal fluid of neurological patients. *J Neurol Sci*. 1982;55(3):339-50.

Sindic CJ, Magnusson CG, Laterre EC, Masson PL. IgE in the cerebrospinal fluid. *J Neuroimmunol*. 1984;6(5):319-24.

Stangel M, Fredrikson S, Meinl E, et al. The utility of cerebrospinal fluid analysis in patients with multiple sclerosis. *Nat Rev* 2013; 9: 267-276.

Swanton JK, Fernando K, Dalton CM, Miszkiel KA, Thompson AJ, Plant GT, et al. Modification of MRI criteria for multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2006;77(7):830-3.

T

Tallantyre EC, Bo L, Al-Rawashdeh O, Owens T, Polman CH, Lowe J, et al. Greater loss of axons in primary progressive multiple sclerosis plaques compared to secondary progressive disease. *Brain*. 2009;132(Pt 5):1190-9.

Tintoré M, Rovira A, Martínez MJ, Río J, Díaz-Villoslada P, Brieva L, et al. Isolated demyelinating syndromes: comparison of different MR imaging criteria to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2000;21(4):702-6.

Tintoré M, Rovira A, Río J, Tur C, Pelayo R, Nos C, et al. Do oligoclonal bands add information to MRI in first attacks of multiple sclerosis? *Neurology*. 2008;70(13 Pt 2):1079-83.

Toledano M, Weinshenker BG, Solomon AJ. A Clinical Approach to the Differential Diagnosis of Multiple Sclerosis. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2015;15(8):57.

Torkildsen O, Myhr KM, Bo L. Disease-modifying treatments for multiple sclerosis - a review of approved medications. *Eur J Neurol*. 2016;23 Suppl 1:18-27.

Tourtellotte WW, Parker JA. Multiple sclerosis: brain immunoglobulin-G and albumin. *Nature* 1967 May 13;214(5089):683-686.

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.

Tourtellotte WW, Potvin AR, Fleming JO, Murthy KN, Levy J, Syndulko K, et al. Multiple sclerosis: measurement and validation of central nervous system IgG synthesis rate. *Neurology.* 1980;30(3):240-4.

V

Villar LM, Masjuan J, Gonzalez-Porque P, Plaza J, Sadaba MC, Roldan E, et al. Intrathecal IgM synthesis is a prognostic factor in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2003;53(2):222-6.

Villar LM, Sadaba MC, Roldan E, Masjuan J, Gonzalez-Porque P, Villarrubia N, et al. Intrathecal synthesis of oligoclonal IgM against myelin lipids predicts an aggressive disease course in MS. *J Clin Invest* 2005 Jan;115(1):187-194.

Villar LM, Masterman T, Casanova B, Gomez-Rial J, Espino M, Sadaba MC, et al. CSF oligoclonal band patterns reveal disease heterogeneity in multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology.* 2009;211(1-2):101-4.

Villar LM, Espino M, Costa-Frossard L, Muriel A, Jimenez J, Alvarez-Cermeno JC. High levels of cerebrospinal fluid free kappa chains predict conversion to multiple sclerosis. *Clin Chim Acta* 2012 Nov 20;413(23-24):1813-1816.

Villoslada P. *Esclerosis Multiple.* Barcelona. Marge Medica Books; 2010. 373 p.

Voortman MM, Stojakovic T, Pirpamer L, Jehna M, Langkammer C, Scharnagl H, et al. Prognostic value of free light chains lambda and kappa in early multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2016;1352458516681503.

W

Weinshenker BG, Bass B, Rice GP, Noseworthy J, Carriere W, Baskerville J, Ebers GC. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. *Brain*. 1989;112:133–46.

Z

Zeman D, Kusnierova P, Svagera Z, Vsiansky F, Byrtusova M, Hradilek P, 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.

ANEXOS

ANEXO 1

FORMULARIO DE INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO INFORMADO ESCRITO

Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía

NODO: Biobanco Hospital Universitario Virgen Macarena

DOCUMENTO DE INFORMACIÓN PARA DONACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS AL BIOBANCO PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

Este documento sirve para que usted otorgue su consentimiento para donar sus muestras biológicas, o las del sujeto al que representa, al Biobanco indicado, establecimiento público, sin ánimo de lucro, dependiente de la Consejería de Salud/del Servicio Andaluz de Salud, que acoge colecciones de muestras biológicas concebidas con fines diagnósticos o de investigación biomédica y organizadas como una unidad técnica con criterios de calidad, orden y destino, donde serán conservadas hasta que se agoten por su uso, salvo que usted solicitara su eliminación. Las muestras biológicas son un excelente elemento para la investigación de enfermedades. A través de dichas investigaciones se podrán obtener datos que permitirán mejorar el conocimiento sobre la aparición, desarrollo y tratamiento de multitud de enfermedades.

Esta hoja de información puede contener palabras que usted no entienda. Por favor, pídale al profesional sanitario que le explique la información que no comprenda. Tómese el tiempo necesario para decidir si quiere o no donar su muestra biológica y consulte a personas de su confianza si lo desea. Para consultas que desee plantear posteriormente, podrá dirigirse al Biobanco o a la dirección de correo electrónico: biobanco.hvm.sspa@juntadeandalucia.es

Las muestras biológicas donadas y sus datos clínicos asociados se utilizarán de conformidad con lo establecido en la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica (en adelante Ley de Investigación biomédica).

Es posible que la información obtenida de las investigaciones en las que se utilicen sus muestras no le genere un beneficio directo, pero habrá contribuido al avance de la medicina y del conocimiento de diversas enfermedades, lo que supondrá, sin duda, un beneficio para la sociedad.

La donación es voluntaria y altruista, por lo que usted no tendrá derecho alguno sobre los resultados que pudieran derivarse de las investigaciones que se lleven a cabo con dichas muestras, de conformidad con la normativa vigente. Su decisión de donar o no, no afectará negativamente a su asistencia sanitaria.

En el apartado dedicado al consentimiento (2.3), podrá decidir si quiere que sus muestras se conserven de forma codificada (en cuyo caso se identifican con un código que protege su identidad) o anonimizada (eliminándose de forma irreversible toda vinculación con su identidad).

Sus muestras y los datos asociados a las mismas sólo se cederán a terceros que las utilicen en investigación biomédica de manera anónima o disociada. Si, por la naturaleza del proyecto de investigación en el que se utilizara su muestra se necesitaran datos clínicos adicionales, el Biobanco coordinaría la obtención de los mismos, siempre que la muestra no hubiera sido anonimizada.

1. LO QUE USTED DEBE SABER:

1.1. Obtención de las muestras

Las muestras serán obtenidas durante el procedimiento médico-quirúrgico al que va a someterse o se ha sometido durante su proceso asistencial, o a través de un procedimiento expreso para obtenerla, según lo indicado en el apartado sobre consentimiento (2.3).

En el caso de que usted done las muestras obtenidas durante un procedimiento médico-quirúrgico asistencial, no existe ningún inconveniente adicional derivado de la donación de las mismas.

Si, por el contrario, las muestras fueran extraídas expresamente para la donación para investigación biomédica podrían existir inconvenientes vinculados con la obtención de las mismas, de las que será convenientemente informado en la hoja de información del procedimiento correspondiente.

1.2. Utilización de las muestras

Usted autoriza a que las muestras donadas sean utilizadas en investigación biomédica, pudiendo establecer restricciones a su utilización.

Las muestras sólo podrán ser utilizadas en proyectos de investigación científicamente avalados, que cumplan las exigencias legales y los principios éticos que rigen la investigación en salud y que sean autorizados por los órganos competentes, de conformidad con lo establecido en la normativa vigente.

Cuando, por razones de salud, usted o su familia lo necesiten, podrán hacer uso de las muestras, siempre que no se hayan agotado o eliminado y no se encuentren anonimizadas.

1.3. Información relacionada con las muestras

Si lo solicita, el Biobanco le facilitará la información sobre los proyectos de investigación en los que se utilicen las muestras donadas, si éstas no hubieran sido anonimizadas.

Al donar sus muestras al Biobanco, en este momento puede no saberse el lugar de realización de los análisis. El Biobanco mantiene un registro detallado del lugar de realización de los análisis realizados.

La información que se obtenga puede tener implicaciones para sus familiares, por lo que debe transmitirles dicha información.

1.4. Posibilidad de ponerse nuevamente en contacto

Puede que sea necesario ponerse en contacto nuevamente con usted, con el fin de recabar datos o muestras adicionales, o proporcionarle la información relevante para su salud, salvo que haya solicitado que las muestras sean anonimizadas.

1.5. Protección de datos y confidencialidad de la información

La información proporcionada en este apartado será aplicable siempre que sus muestras no se encuentren anonimizadas.

Los datos personales recabados serán confidenciales y tratados de acuerdo con la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal, y su normativa de desarrollo, y la Ley de Investigación biomédica.

Sus datos de carácter personal serán incorporados a un fichero automatizado, debidamente inscrito en la Agencia Española de Protección de Datos, cuya titularidad corresponde al Servicio Andaluz de Salud. Sólo los responsables del Biobanco podrán identificar a quién corresponde cada muestra o dato, si no está anonimizada.

Podrá ejercer los derechos de acceso, rectificación, oposición y cancelación de sus datos personales, reconocidos en la citada Ley Orgánica 15/1999, con las limitaciones establecidas en dicha Ley. Para ello, deberá dirigirse a la Dirección General de Asistencia Sanitaria del Servicio Andaluz de Salud, Avenida de la Constitución, núm. 18, de Sevilla.

1.6. Derecho de revocación del consentimiento

Salvo que sus muestras se encuentren anonimizadas, podrá revocar o retirar, en cualquier momento, el consentimiento prestado. Para ello, deberá dirigirse al Biobanco, pudiendo solicitar la eliminación o la anonimización de las muestras.

Los efectos de la revocación no se extenderán a los resultados de las investigaciones llevadas a cabo con anterioridad.

1.7. Información relativa a análisis genéticos

Salvo que usted manifieste lo contrario en el apartado dedicado al consentimiento, se podrán realizar análisis genéticos.

Excepto si sus muestras son anonimizadas, tiene derecho a conocer los datos genéticos que se obtengan a partir del análisis de las muestras donadas, así como de la información relativa a su salud derivada de dichos análisis, según los términos en que exprese su voluntad en el apartado 2.3.

Si no desea recibir dicha información y ésta fuera necesaria para evitar un grave perjuicio para su salud o la de sus familiares biológicos, se informará a un familiar o a un representante. La comunicación se limitará exclusivamente a los datos necesarios para evitar tal perjuicio.

1.8. Otras consideraciones

Una vez informado/a de los aspectos relacionados anteriormente en este documento, si decide donar dichas muestras deberá firmar el consentimiento informado para la donación.

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA DONACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS AL BIOBANCO

Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía. Nodo del Hospital Universitario Virgen Macarena

DATOS DEL/DE LA DONANTE Y DE SU REPRESENTANTE (éste último sólo en caso de incapacidad del/de la donante):

Apellidos y nombre del/de la Donante:

DNI / NIE: **NUSHA:**

Apellidos y nombre del/de la representante legal:

DNI / NIE:

PROFESIONALES QUE INTERVIENEN EN EL PROCESO DE INFORMACIÓN Y/O CONSENTIMIENTO:

Los siguientes profesionales declaran que se ha explicado la información relativa a la donación de muestras biológicas al Biobanco:

Apellidos y nombre	Fecha	Firma
.....

CONSENTIMIENTO:

Yo, D./Dña. declaro bajo mi responsabilidad que **he leído y comprendido el Formulario de Información**, del que se me ha entregado un ejemplar.

He **recibido suficiente información** sobre la donación de muestras biológicas de.....
.....al Biobanco y sobre la posible realización de análisis genéticos sobre las mismas. He podido hacer preguntas sobre la información recibida y hablar con el profesional indicado, quien me ha resuelto todas las dudas que le he planteado.

Dichas muestras son:

- Excedentes del procedimiento médico-quirúrgico asistencia al que va a someterse o se ha sometido
- Tomadas mediante el procedimiento expreso

Asimismo, consiento el **tratamiento de los datos clínicos asociados** a las muestras.

Deseo que dichas muestras y los datos clínicos asociados sean tratados de forma:

- Codificada** (serán identificadas con un código que protege mi identidad, siendo posible volver a ligarlas conmigo) o
- Anonimizada** (no se podrán asociar las muestras conmigo, por haberse eliminado de forma irreversible la vinculación entre las mismas y mi identidad).

Deseo **establecer restricciones** respecto al uso de la muestra, para que no sea utilizada en:

.....
.....



Autorizo que se pueda **contactar conmigo posteriormente**: SI NO

En caso afirmativo, por favor, indique el medio de hacerlo:.....

Autorizo **recibir información** sobre datos genéticos y datos relevantes para mi salud (Si solicita que las muestras sean anonimizadas, no podrá recibir esta información)

Marque lo que proceda: SI NO

Sé que puedo **revocar**, en cualquier momento, el consentimiento otorgado en este documento.

En _____, a _____ de _____ de _____

EL/LA DONANTE

EL/LA REPRESENTANTE LEGAL

(sólo en caso de incapacidad del/de la donante)

Fdo.:

Fdo.:

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA DONACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS AL BIOBANCO

Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía. Nodo del Hospital Universitario Virgen Macarena

DATOS DEL/DE LA DONANTE Y DE SU REPRESENTANTE (éste último sólo en caso de incapacidad del/de la donante):

Apellidos y nombre del/de la Donante:

DNI / NIE: **NUSHA:**

Apellidos y nombre del/de la representante legal:

DNI / NIE:

PROFESIONALES QUE INTERVIENEN EN EL PROCESO DE INFORMACIÓN Y/O CONSENTIMIENTO:

Los siguientes profesionales declaran que se ha explicado la información relativa a la donación de muestras biológicas al Biobanco:

Apellidos y nombre	Fecha	Firma
.....

CONSENTIMIENTO:

Yo, D./Dña. declaro bajo mi responsabilidad que **he leído y comprendido el Formulario de Información**, del que se me ha entregado un ejemplar.

He **recibido suficiente información** sobre la donación de muestras biológicas de.....
.....al Biobanco y sobre la posible realización de análisis genéticos sobre las mismas. He podido hacer preguntas sobre la información recibida y hablar con el profesional indicado, quien me ha resuelto todas las dudas que le he planteado.

Dichas muestras son:

- Excedentes del procedimiento médico-quirúrgico asistencia al que va a someterse o se ha sometido
- Tomadas mediante el procedimiento expreso

Asimismo, consiento el **tratamiento de los datos clínicos asociados** a las muestras.

Deseo que dichas muestras y los datos clínicos asociados sean tratados de forma:

- Codificada** (serán identificadas con un código que protege mi identidad, siendo posible volver a ligarlas conmigo) o
- Anonimizada** (no se podrán asociar las muestras conmigo, por haberse eliminado de forma irreversible la vinculación entre las mismas y mi identidad).

Deseo **establecer restricciones** respecto al uso de la muestra, para que no sea utilizada en:

.....
.....



Autorizo que se pueda **contactar conmigo posteriormente**: SI NO

En caso afirmativo, por favor, indique el medio de hacerlo:.....

Autorizo **recibir información** sobre datos genéticos y datos relevantes para mi salud (Si solicita que las muestras sean anonimizadas, no podrá recibir esta información)

Marque lo que proceda: SI NO

Sé que puedo **revocar**, en cualquier momento, el consentimiento otorgado en este documento.

En _____, a _____ de _____ de _____

EL/LA DONANTE

EL/LA REPRESENTANTE LEGAL

(sólo en caso de incapacidad del/de la donante)

Fdo.:

Fdo.:

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA DONACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS AL BIOBANCO

Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía. Nodo del Hospital Universitario Virgen Macarena

DATOS DEL/DE LA DONANTE Y DE SU REPRESENTANTE (éste último sólo en caso de incapacidad del/de la donante):

Apellidos y nombre del/de la Donante:

DNI / NIE: **NUSHA:**

Apellidos y nombre del/de la representante legal:

DNI / NIE:

PROFESIONALES QUE INTERVIENEN EN EL PROCESO DE INFORMACIÓN Y/O CONSENTIMIENTO:

Los siguientes profesionales declaran que se ha explicado la información relativa a la donación de muestras biológicas al Biobanco:

Apellidos y nombre	Fecha	Firma
.....

CONSENTIMIENTO:

Yo, D./Dña. declaro bajo mi responsabilidad que **he leído y comprendido el Formulario de Información**, del que se me ha entregado un ejemplar.

He **recibido suficiente información** sobre la donación de muestras biológicas de.....
.....al Biobanco y sobre la posible realización de análisis genéticos sobre las mismas. He podido hacer preguntas sobre la información recibida y hablar con el profesional indicado, quien me ha resuelto todas las dudas que le he planteado.

Dichas muestras son:

- Excedentes del procedimiento médico-quirúrgico asistencia al que va a someterse o se ha sometido
- Tomadas mediante el procedimiento expreso

Asimismo, consiento el **tratamiento de los datos clínicos asociados** a las muestras.

Deseo que dichas muestras y los datos clínicos asociados sean tratados de forma:

- Codificada** (serán identificadas con un código que protege mi identidad, siendo posible volver a ligarlas conmigo) o
- Anonimizada** (no se podrán asociar las muestras conmigo, por haberse eliminado de forma irreversible la vinculación entre las mismas y mi identidad).

Deseo **establecer restricciones** respecto al uso de la muestra, para que no sea utilizada en:

.....
.....



Autorizo que se pueda **contactar conmigo posteriormente**: SI NO

En caso afirmativo, por favor, indique el medio de hacerlo:.....

Autorizo **recibir información** sobre datos genéticos y datos relevantes para mi salud (Si solicita que las muestras sean anonimizadas, no podrá recibir esta información)

Marque lo que proceda: SI NO

Sé que puedo **revocar**, en cualquier momento, el consentimiento otorgado en este documento.

En _____, a _____ de _____ de _____

EL/LA DONANTE

EL/LA REPRESENTANTE LEGAL

(sólo en caso de incapacidad del/de la donante)

Fdo.:

Fdo.:



REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO PARA USO DE MUESTRAS DONADAS:

Yo, D./Dña.

revoco el consentimiento informado otorgado en el documento

.....

(especificar fecha aproximada y/o procedimiento).

Solicito:

- La eliminación de las muestras donadas
- La anonimización de las mismas

Otras consideraciones:

.....
.....

En , a de de

EL/LA DONANTE

EL/LA REPRESENTANTE LEGAL

(sólo en caso de incapacidad del/de la donante)

Fdo.:

Fdo.:

ANEXO 2



COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE CENTRO HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN MACARENA

Dr. Víctor Sánchez Margalet, Secretario del Comité de Ética de la Investigación de Centro H.U. Virgen Macarena

CERTIFICA

Que el Comité de Ética de la Investigación de Centro H.U. Virgen Macarena en su reunión del día 29/04/2013, ha evaluado la propuesta del promotor referida al estudio:

Título: UTILIDAD DE LAS CADENAS LIGERAS LIBRES EN LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO COMO BIOMARCADOR DE CONVERSIÓN A ESCLEROSIS MÚLTIPLE CLÍNICAMENTE DEFINIDA

Código Interno: 2083

Promotor: Investigador

1º. Considera que

- El estudio se plantea siguiendo los requisitos de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y su realización es pertinente.
- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Son adecuados tanto el procedimiento para obtener el consentimiento informado como la compensación prevista para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el estudio.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.
- La capacidad de los Investigadores y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

2º. Por lo que este Comité de Ética de la Investigación de Centro H.U. Virgen Macarena emite un **DICTAMEN FAVORABLE**.

3º. Este Comité de Ética de la Investigación de Centro H.U. Virgen Macarena acepta que dicho estudio sea realizado en los siguientes CEI/Centros por los Investigadores:

CEIC Hospital Universitario Virgen Macarena

Carmen Bermudo Guitarte
(Bioquímica Clínica) Hospital Virgen Macarena

Lo que firmo en Sevilla, a 03 de mayo de 2013

Fdo:

Dr. Víctor Sánchez Margalet
Secretario del CEIC Hospital Universitario Virgen Macarena



CEI de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena y Virgen del Rocío

Dr. Víctor Sánchez Margalet
Presidente del CEI de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena y Virgen del Rocío

CERTIFICA

1º. Que el CEI de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena y Virgen del Rocío en su reunión del día 31/03/2016, acta 04/2016 ha evaluado la propuesta del promotor referida al estudio:

Título: UTILIDAD CLÍNICA DEL INDICE KAPPA COMO BIOMARCADOR DE CONVERSIÓN A ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Código Promotor: PALOMA16 **Código Interno:** 0452-N-16

Promotor: Investigador

1º. Considera que

- El estudio se plantea siguiendo los requisitos de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y su realización es pertinente.
- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Son adecuados tanto el procedimiento para obtener el consentimiento informado como la compensación prevista para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el estudio.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.
- La capacidad de los Investigadores y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

2º. Por lo que este CEI emite un **DICTAMEN FAVORABLE**.

3º. Este CEI acepta que dicho estudio sea realizado en los siguientes CEI/Centros por los Investigadores:

CEI de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena y
Virgen del Rocío

Paloma Menendez Valladares
*(Bioquímica Clínica) Hospital Universitario Virgen
Macarena*

Lo que firmo en Sevilla, a 28 de abril de 2016

Fdo:

Dr. Víctor Sánchez Margalet
Presidente del CEI de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena y Virgen del Rocío



CEI de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena y Virgen del Rocío

ARTÍCULOS PUBLICADOS

Jose Luis Garcia De Veas Silva, Carmen Bermudo Guitarte, Paloma Menéndez Valladares, Johanna-Carolina Rojas Novoa, Krysta Kestler, Rafael Duro Millán. *Prognostic Value of Serum Free Light Chains Measurements in Multiple Myeloma Patients*. PLoS ONE, 2016. 11(11):e0166841. ISSN 1932-6203.

Jose María Maesa Márquez, Patricia Fernández Riejos, Catalina Sánchez Mora, María de Toro, Paloma Menéndez Valladares, Concepción González Rodríguez. *Evaluation of Bio-Rad d-100 HbA1c analyzer against Tosoh G8 and Menarini HA-8180V*. Practical Laboratory Medicine, 2016. 5, pp.57-64.

Paloma Menéndez Valladares, Teresa Arrobas Velilla, Jose Antonio Bermúdez de la Vega, María del Mar Romero Pérez, Fernando Fabiani Romero, Concepción González Rodríguez. *Incremento de Lipoproteína(a) en paciente pediátrico asociado a síndrome nefrótico*. Clínica e Investigación en Arteriosclerosis, 2016. 258-5, pp.227-229. ISSN 0214-9168.

Paloma Menéndez Valladares, María Isabel García-Sánchez, Pastora Cuadri Benítez, Miguel Lucas, Myriam Adorna Martínez, Verónica Carranco Galán, Jose Luis García De Veas Silva, Carmen Bermudo Guitarte, and Guillermo Izquierdo Ayuso. ***Free Kappa Light Chains in cerebrospinal fluid as a Biomarker to assess Risk Conversion to Multiple Sclerosis***. Multiple Sclerosis Journal— Experimental, Translational and Clinical. December 2015. Vol.1. ISSN 2055-2173.

Paloma Menéndez Valladares, Patricia Fernández-Riejos, Catalina Sánchez-Mora, Antonio Pérez-Pérez, Víctor Sánchez-Margalet, Concepción González-Rodríguez. *Evaluation of a HbA1c point-of-care analyzer*. Clinical Biochemistry, 2015 Jul;48-(10-11), pp.686-689. ISSN 1873-2933.

Jose Luis García De Veas Silva, Carmen Bermudo Guitarte, Paloma Menéndez Valladares, Rafael Duro Millán, Johanna-Carolina Rojas Noboa. *A Challenging Case of IgD Kappa Multiple Myeloma Associated With Primary Amyloidosis: Importance of Serum Free Light Chains in Monitoring Treatment Response and Disease Relapse*. *Journal of Leukemia*. 2014;2(5):164, pp.1-4. ISBN: 2923-6917.

COMUNICACIONES A CONGRESOS

María Isabel García Sánchez¹, Paloma Menéndez Valladares², Miguel Ángel Gamero García³, Carmen Bermudo Guitarte², Pastora Cuadri Benítez³, Myriam Adorna Martínez³, Macarena Rus Hidalgo⁴, Guillermo Izquierdo Ayuso³; 1 Biobanco Hospital Virgen Macarena BBSSPA. Hospital Virgen Macarena; 2 Servicio: Inmunología. Hospital Virgen Macarena; 3 Servicio: Neurociencias. Hospital Virgen Macarena; 4 Unidad de Esclerosis Múltiple. Hospital Virgen Macarena. **Valor predictivo de las cadenas ligeras kappa en líquido cefalorraquídeo en la conversión desde síndrome neurológico aislado a esclerosis múltiple.** LXVII Reunión Anual de la Sociedad Española de Neurología, Valencia, noviembre 2015.

Paloma Menéndez Valladares¹, María Isabel García Sánchez², Jose Luis Garc; 1 Clinical Biochemistry Department, 2 Department of Neurology. Virgen Macarena University Hospital, Seville, Spain. **Cerebrospinal fluid free kappa chains as a possible biomarker to assay risk conversion to multiple sclerosis.** Clinical Chemistry, Vol. 61, No. 10, Supplement, 2015. Presented at AACC annual meeting & clinical lab expo, Atlanta-Georgia-USA, Julio 2015.

Carmen Bermudo-Guitarte¹, Paloma Menéndez-Valladares¹, María Isabel García-Sánchez², Pastora Cuadri-Benítez², Myriam Adorna-Martínez², Guillermo Izquierdo-Ayuso²; 1 Clinical Biochemistry Department, 2 Department of Neurology, Virgen Macarena University Hospital, Seville, Spain. **Predictive value of free kappa chains in cerebrospinal fluid in the conversion from clinically isolated syndrome to multiple sclerosis.** 7th International Symposium: Clinical applications of Free Light Chain and Heavy/Light Chain analysis, Edinburgh, Scotland – UK, abril 2015.

Jose Luis García de Veas Silva, Paloma Menéndez Valladares, Concepción González Rodríguez, Carmen Bermudo Guitarte. **Free kappa index in cerebrospinal fluid as a biomarker of intratecal synthesis of immunoglobulins in multiple sclerosis.** 9th International Congress on Autoimmunity, Nice (France), marzo 2014.

Jose Luis García de Veas Silva, Carmen Bermudo Guitarte, María Victoria Perna Rodríguez, Paloma Menéndez Valladares. ***Estudio de la concordancia entre la determinación de bandas oligoclonales en LCR, índice kappa libre y síntesis intratecal en pacientes con inflamación del sistema nervioso central.*** XX Reunión científica de la SANAC, Osuna, marzo 2013.

OTROS MÉRITOS

Beca de Investigación Post-residencia concedida por la Fundación Jose Luis Castaño y Sociedad Española de Medicina de Laboratorio (SEQC) (junio 2016-mayo 2017), para el desarrollo del proyecto de investigación consistente en ***“Utilidad clínica del Índice Kappa como Biomarcador de Conversión a Esclerosis Múltiple”***.

Beca SEQC inscripción a las XIII Jornadas del Comité Científico, Valencia, 2015.

Beca inscripción I Foro Traslacional de Inmunoterapia del Cáncer (GÉTICA) Sevilla 2015.

EFLM bursary to the 14th EFLM Continuing Postgraduate Course in Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Dubrovnik (Croacia), octubre 2014 [Paloma Menéndez-Valladares, Patricia Fernández-Riejos, Catalina Sánchez-Mora, Antonio Pérez-Pérez, Víctor Sánchez-Margalet, Concepción González-Rodríguez . *Evaluation of the analytical quality of BAnalyst as a POCT analyzer for HbA1c determination*. ISBN: 1330-0962. Biochemia Medica 2014;24 (suppl 1):S67].

Premio Roche Diagnostics 2014 al mejor póster sobre biomarcadores tumorales presentado en el VIII Congreso Nacional del Laboratorio Clínico, Sevilla, octubre 2014 [Antonio Barco Sánchez, Jose Francisco Tejón Blanco, Francisco Márquez Maraver, Isabel Rodríguez Jiménez, Paloma Menéndez Valladares, Flora Sánchez Jiménez. *Aportación del marcador HE4 al diagnóstico del cáncer de ovario*].

Premio Extraordinario fin de estudios de Máster Universitario: Máster en Investigación Médica: Clínica y Experimental 2012/2013, Universidad de Sevilla (septiembre 2014).

I Convocatoria Premios y Becas SEPD FERRER, por comunicación póster oral en la Semana de las Enfermedades Digestivas, Valencia, junio 2014 [Paloma Menéndez Valladares¹; Patricia Fernández Riejos¹; Vanessa Jaramillo²; Catalina Sánchez Mora¹; María de Gracia Ávila García¹; Jose Francisco Tejón Blanco¹; Víctor Sánchez Margalet¹; Jose Manuel Herreras²; Concepción González Rodríguez¹; 1 UGC Bioquímica Clínica, 2

UGC Digestivo, Hospital Universitario Virgen Macarena (Sevilla). *Evaluación de lactasa intestinal mediante un nuevo test no invasivo*].

Premio SANAC a la mejor comunicación tipo póster en la XX Reunión científica de la SANAC, Osuna, marzo 2013 [Jose Luis García de Veas Silva, Carmen Bermudo Guitarte, María Victoria Perna Rodríguez, Paloma Menéndez Valladares. ***Estudio de la concordancia entre la determinación de bandas oligoclonales en LCR, índice kappa libre y síntesis intratecal en pacientes con inflamación del sistema nervioso central***].

Free kappa light chains in cerebrospinal fluid as a biomarker to assess risk conversion to multiple sclerosis

P Menéndez-Valladares, MI García-Sánchez, P Cuadri Benítez, M Lucas, M Adorna Martínez, V Carranco Galán, JL García De Veas Silva, C Bermudo Guitarte and G Izquierdo Ayuso

Multiple Sclerosis Journal –
Experimental, Translational
and Clinical

1: 1–9

DOI: 10.1177/
2055217315620935

© The Author(s), 2015.
Reprints and permissions:
[http://www.sagepub.co.uk/
journalsPermissions.nav](http://www.sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav)

Abstract

Background: Multiple sclerosis (MS) initiates with a first attack or clinically isolated syndrome (CIS). The importance of an early treatment in MS leads to the search, as soon as possible, for novel biomarkers which can predict conversion from CIS to MS.

Objective: The purpose of this study was to assess the predictive value of the kappa index (κ index), using kappa free light chains (κ FLCs) in cerebrospinal fluid (CSF), for the conversion of CIS patients to MS, and compare its accuracy with other parameters used in clinical practice.

Methods: FLC levels were analysed in CSF from 176 patients: 70 as control group, 77 CIS, and 29 relapsing–remitting MS. FLC levels were quantified by nephelometry.

Results: κ Index sensitivity and specificity (93.1%; 95.7%) was higher than those from the immunoglobulin G (IgG) index (75.9%; 94.3%), and lower than those from oligoclonal IgG bands (OCGBs) (96.5%; 98.6%). The optimal cut-off for κ index was 10.62. Most of the CIS patients with κ index >10.62 presented OCGBs, IgG index >0.56 and fulfilled magnetic resonance imaging (MRI) criteria.

Conclusion: CIS patients above κ index cut-off of 10.62 present 7.34-fold risk of conversion to MS than CIS below this value. The κ index correlated with positive OCGBs, IgG index above 0.56 and MRI criteria.

Keywords: Multiple sclerosis, cerebrospinal fluid, immunoglobulin free light chains, immunoglobulin kappa free light-chains, demyelinating diseases, nephelometry, turbidimetry, clinically isolated syndrome

Date received: 5 October 2015; accepted: 13 November 2015

Introduction

Multiple sclerosis (MS) is the most common demyelinating disease of the central nervous system (CNS). In most patients, MS initiates with a first attack or a clinically isolated syndrome (CIS),¹ which is commonly presented as unilateral optic neuritis, a brainstem syndrome, hemispheric motor or sensitive symptoms or partial myelitis.² A certain number of CIS patients develop MS over time, while another group of patients never convert to MS. Studies vary widely in the proportion of CIS patients who develop MS. A recent observational study showed that the risk of developing MS was 57% after two years of follow-up, and 75% after four years of follow-up according to the 2001 McDonald criteria.³

The most common age of onset for MS is between 20–40 years, and is more frequent in women.^{4,5} A study developed over a 20-year period in the Northern Seville District of southern Spain showed that the prevalence of MS as of 31 December 2011 was 90.2 cases per 100,000 people. The incidence was 4.6 per 100,000 and increased in women, but not in men. Furthermore, patients are most likely to be diagnosed in their mid-30s and females are most likely to present relapsing–remitting MS (RRMS) with a sex ratio female/male of 2.5:1.⁶

As there is no single clinical feature or diagnostic test sufficient for the diagnosis of this disease, diagnostic criteria have been developed based on the

Correspondence to:
G Izquierdo Ayuso
Unidad de Gestión Clínica
Neurociencias, Hospital
Universitario Virgen
Macarena Avenida Dr
Fedriani, 3, 41009, Seville,
Spain.
gia@us.es

P Menéndez-Valladares
Unidad de Gestión Clínica
Bioquímica Clínica, Hospital
Universitario Virgen
Macarena, Spain

MI García-Sánchez
Virbanco Hospitalario
Virgen Macarena, Biobanco
del Sistema Sanitario Público
de Andalucía, Spain

P Cuadri Benítez
Virbanco Hospitalario
Virgen Macarena, Biobanco



del Sistema Sanitario
Público de Andalucía, Spain

M Lucas

Departamento de
Bioquímica Médica y
Biología Molecular,
Universidad de Sevilla,
Spain

M Adorna Martínez

Unidad de Gestión Clínica
Neurociencias, Hospital
Universitario Virgen
Macarena, Spain

V Carranco Galán

Departamento de
Bioquímica Médica y
Biología Molecular,
Universidad de Sevilla,
Spain

JL García De Veas Silva

Unidad de Gestión Clínica
Bioquímica Clínica, Hospital
Universitario Virgen
Macarena, Spain

C Bermudo Guitarte

Unidad de Gestión Clínica
Bioquímica Clínica, Hospital
Universitario Virgen
Macarena, Spain

G Izquierdo Ayuso

Unidad de Gestión Clínica
Neurociencias, Hospital
Universitario Virgen
Macarena, Spain

demonstration of lesions disseminated in space (DIS) and disseminated in time (DIT), and after exclusion of alternative causes. In recent years, criteria for the diagnosis of MS have changed, mainly due to the incorporation of new magnetic resonance imaging (MRI) criteria.² The 2001 McDonald diagnostic criteria defined DIS by the fulfilling of at least three of four Barkhof-Tintoré criteria (BTC) or by the demonstration of at least two MRI lesions^{7,8} and intrathecal immunoglobulin G (IgG) synthesis. The 2001 McDonald criteria showed high specificity for clinically definite MS (CDMS) but limited sensitivity, which was improved in the 2005 revised McDonald criteria. In these criteria, DIS continued to require the presence of at least three of four BTC, but spinal cord lesions had a greater role than in the previous criteria. MRI criteria for DIT were simplified.⁹

In 2010, the International Panel on Diagnosis of MS (the 'Panel') conducted a revision of the McDonald criteria in which it was reaffirmed that positive cerebrospinal fluid (CSF) findings (elevated IgG index or two or more oligoclonal bands (OCBs)) can be important to support the inflammatory demyelinating nature of the underlying condition, to evaluate alternative diagnoses, and to predict CDMS. However, when applying the simplified MRI criteria, the Panel believes that dispensing with MRI requirements in CSF-positive patients is not suitable, as CSF status was not evaluated for its contribution to the MRI criteria.¹ Accordingly, when using the 2010 revision of the McDonald criteria, CSF examination is not required for the diagnosis of RRMS, although CSF findings are still part of the criteria for diagnosis of primary progressive MS (PPMS). In some cases, routine CSF outcomes, together with MRI, can help to identify patients with a high probability of developing MS after a first clinical event.¹⁰ The study of CSF to analyse intrathecal synthesis, using the IgG Index and OCBs, is employed to support the diagnosis of MS.

Oligoclonal IgG bands (OCGBs) are a qualitative measure of intrathecal synthesis, present in more than 95% patients with MS,¹¹ and can be detected in the immunoglobulin region by isoelectrofocusing and immunoblotting techniques. Their presence in CSF but not in serum shows that synthesis of immunoglobulins has occurred within the CNS. Furthermore, oligoclonal IgM bands are associated with an aggressive disease course.¹² To quantify IgG intrathecal synthesis, almost 20 formulae have been described in the literature, and one of the most commonly analysed is IgG index or the Tibbling-Link

index.¹³ The main limitation of IgG from a CNS local source, is given by the lack of specificity, since intrathecal synthesis occurs in many neurological diseases not just MS, especially those with a central inflammatory involvement.¹⁴

So far, OCGBs are the most widely used biochemical marker used to predict MS, but due to the requirement of technicians with considerable methodological experience and the lack of standardisation,¹⁵ it is difficult to extend its use within a large number of clinical diagnostic laboratories. Different techniques for OCGB detection have appeared during the last years: two different semiautomated kits have been commercialised (using an anti-IgG antibody labelled with peroxidase) and a high-sensitivity method described (using an anti-IgG antibody labelled with alkaline phosphatase). A previous multicentre study developed in Spain, including Seville, assessed all these techniques. The best results are obtained with the high-sensitivity technique based on IgG detection with antibodies labelled with alkaline phosphatase, which was the one used in our study.¹⁶

Recent advances in understanding the aetiology and pathogenesis of MS have contributed to a better diagnosis and a plethora of therapies that substantially affect disease activity and may have a long-term impact on the course and prognosis of MS.¹⁷ Therefore, the search for novel biomarkers which can predict the conversion from CIS to MS is of major importance for early treatment in MS because, to date, there is no single diagnostic marker for MS which predicts conversion from CIS to MS.

Several studies indicated that high levels of kappa free light chains (κ FLCs) and lambda free light chains (λ FLCs) in CSF, using either ELISA or nephelometry, may support the diagnosis of MS.^{18–28} A limitation of these studies can be found in the low comparability of κ FLC levels due to differences in methods. We used nephelometry providing that it is a validated technique as it is described in the literature.²⁵ More recent studies suggest that high levels of κ FLC in CSF predict conversion to MS from CIS patients.^{25,28} In a healthy state, light chains are produced in excess over heavy chains, and the level of unbound light chains, or FLCs, in serum and in CSF is low. The production of FLCs might be abnormally enhanced under pathological conditions such as in certain inflammatory diseases like MS.²⁹

Table 1. Characteristics of patients.

	Patients (<i>n</i>)	Female (%)	Age (years)	κ FLCs in CSF	κ index	Lambda index
Control group						
Group 1: NPH	41	11 (26.8)	75.72 (40–87)	0.16 (0.10–0.22)	1.62 (0.99–2.27)	1.28 (0.93–1.68)
Group 2: NIND	15	10 (66.7)	39.11 (15–71)	0.12 (0.10–0.20)	3.37 (1.95–7.05)	1.35 (0.96–1.90)
Group 3: IND	14	9 (64.3)	44.77 (30–75)	0.13 (0.04–0.20)	2.86 (1.47–7.00)	1.10 (0.81–2.71)
Total	70	30 (42.9)	61.69 (15–87)	0.15 (0.10–0.20)	1.96 (1.13–3.56)	1.27 (0.93–1.69)
Case group						
Group 4: CIS	77	60 (77.9)	35.26 (15–62)	0.73 (0.13–3.2)	35.61 (4.48–132.73)	3.81 (1.49–16.95)
Group 5: RRMS	29	17 (58.6)	34.81 (17–57)	1.45 (0.52–6.67)	88 (33.96–295.13)	5.43 (2.01–19.40)
Total of patients	176	107 (60.8)	45.70 (15–87)			

The patients were divided in five groups: the control group was classified in three subgroups: normal pressure hydrocephalus (NPH), other non-inflammatory neurologic disease (NIND) different from NPH and other inflammatory neurologic disease (IND) different from multiple sclerosis (MS); case group: Clinically isolated syndrome (CIS) and relapsing–remitting multiple sclerosis (RRMS). Data are shown as the mean and the range for age; kappa free light chains (κ FLCs) in cerebrospinal fluid (CSF), κ index and lambda index were found to be non-parametric after applying the Shapiro-Wilk test, so we calculated the median level and the interquartile range (IQR).

It was the aim of the present investigation to assess the predictive value of the kappa index (κ index) for the conversion of CIS patients to MS, and to compare its accuracy with other parameters used in clinical practice: OCGBs, IgG index and MRI criteria.

Materials and methods

In this study samples provided by the Biobank of Virgen Macarena University Hospital, Seville, Spain were used and were stored frozen at -80°C until analysis. Informed consent was signed by all patients for the use of their specimen for research purposes. The study was approved by the Research Ethical Committee of the aforementioned hospital. CIS patients who had undergone a lumbar puncture for investigation of additional evidence of MS were included.

As a control group samples of patients with non-inflammatory neurologic diseases (NINDs) and with other inflammatory neurologic diseases (INDs) different from MS were used, preferably as homogeneous as possible both in age and diagnosis. Within this control group three subgroups were defined: a more homogeneous group in which all patients had normal pressure hydrocephalus (NPH), a second group in which patients had NINDs different from NPH (ELA (one), dizziness (two), epilepsy (four), facial pain (one), headache (four), miscellaneous (three)), and a third group with INDs different from MS (Sjögren syndrome (one), vasculitis (nine), DEVIC (one), miscellaneous (three)) (characteristics shown in Table 1).

As a case group those already diagnosed who had had a first clinical event as CIS and who had had a

study of OCGBs to support their diagnosis were included. Subjects who had had at least two years of follow-up after the first clinical presentation were selected. Patients under the age of 14 years were excluded from the study for being atypical cases of early MS. The case group was divided into two subgroups: CIS and RRMS (characteristics shown in Table 1). All diagnoses of patients with CDMS were performed by clinical evaluation and MRI of the patient, considering the McDonald criteria, and supported by laboratory tests (OCGBs).

During diagnosis of patients, levels of κ FLC and λ FLC in the CSF of patients were studied. The use of κ index was calculated as

$$\frac{(\text{CSF}\kappa\text{FLC}/\text{serum}\kappa\text{FLC})/(\text{CSF albumin}/\text{serum albumin})$$

that takes into account the blood-CSF barrier function, allows increasing the diagnostic accuracy of κ FLC analysis and avoids false positives.²⁶ OCGB, IgG index, MRI criteria, BTC, CDMS criteria and conversion to MS, were also registered.

The κ FLC level was quantified by endpoint nephelometry using the Human Kappa Freelite kit (The Binding Site Group Ltd) on the Siemens BN II analyzer. The measurement principle is based on the detection of the scattered light intensity. This method uses polyclonal antibodies coated onto polystyrene latex for κ FLC. According to the manufacturer, the lower detection limit is 0.06 mg/l. The sample volume needed for each analysis is 300 μl .

In this study OCGB data which had been determined by isoelectric focusing (IEF) followed by transfer and IgG immunodetection by an alkaline phosphatase-labeled anti-IgG antibody was used, following the protocol described by Villar et al.³⁰ OCGB results were reported as positive or negative.

The data used of IgG index had been provided by the free software Protein Statistic in CSF Analysis with Reibergrams, v.4.17. For these analyses IgG and albumin concentrations were measured in fresh CSF and serum samples by nephelometry on the Siemens BN II analyzer.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS software v.20.0 (IBM Corp., Armonk, New York, USA, 2011) and MedCalc v.11.4.2.0 (2010). We used the Chi square or Fisher test for categorical variables and *t* student test for quantitative variables for comparison between groups. Kruskal-Wallis was used to compare the medians between more than two independent groups and Kaplan-Meier analysis for survival curve comparison between defined groups (log-rank test). Hazard ratios (HRs) were calculated using univariate and multivariate Cox regression analysis.

Results

In total, 176 patients were included in the study, of whom 60.8% were females. In the control group ($n = 70$), 41 presented with NPH, 15 with NIND and 14 with IND. According to previous studies, κ index showed the highest clinical sensitivity and specificity to detect MS. The λ index calculated as

$$\frac{(\text{CSF}\lambda\text{FLC}/\text{serum}\lambda\text{FLC})}{\times (\text{CSF albumin}/\text{serum albumin})}$$

did not provide greater value for the conversion of CIS patients to MS. As stated in the literature, the results were less informative for λ index than for κ index.²¹ As shown in Table 1, κ index median of 1.96 (95% confidence interval (CI): 1.13–3.56) in the control group, was lower than in CIS ($n = 77$) and in RRMS ($n = 29$), whose medians were 35.61 (95% CI: 4.48–132.73) and 88.00 (95% CI: 33.96–295.13) groups respectively, highly increased with regard to control group. We also observed a slight increase in λ index in CIS and RRMS patients (Table 1).

The percentage of females compared to males is higher in RRMS and the mean age of RRMS is in the mid-30s, which is consistent with previous studies.⁶

When analysing groups according to the κ index medians we found statistically significant differences applying the Kruskal-Wallis test between groups ($p < 0.0001$). After applying post-hoc Bonferroni test, there were no significant differences between control groups: group 1, 2 and 3 ($p = 1.000$). Therefore, the control groups 1, 2 and 3 were analysed together to increase the sample size of the control group. Nevertheless, there were differences statistically significant between control groups and CIS ($p < 0.0001$; $p = 0.013$; $p < 0.0001$) and between control groups and RRMS ($p < 0.0001$; $p = 0.003$; $p < 0.0001$) as is shown in Figure 1.

For studying the sensitivity and specificity of κ index and comparing it with the IgG Index we performed receiver operating characteristic (ROC) curves (Figure 2), analysing values from the control group ($n = 70$) against the RRMS group ($n = 29$). The area under the curve (AUC) was higher for κ index: 0.971, with a sensitivity of 93.10 (95% CI: 77.2–99.2) and a specificity of 95.71 (95% CI: 88.0–99.1) (cut-off value = 10.62), clearly above the results obtained with IgG index, which showed an AUC of 0.869, a sensitivity of 75.9 (95% CI: 56.5–89.7) and a specificity of 94.3 (95% CI: 86–98.4) (cut-off value = 0.56).

The highest clinical sensitivity and specificity (96.5% and 98.6% respectively) to detect MS patients was shown by OCGBs, although the κ index shows similar sensitivity and specificity (93.1% and 95.7% respectively). The lowest sensitivity and specificity was obtained with the IgG index (75.9% and 94.3% respectively) in agreement with previous reports.^{26,31}

The use of BTC plus κ index improved specificity and PPV of κ index alone, however, there is a decrease in the sensitivity and NPV values (Table 2). The same happens using the combination of BTC plus OCGBs in comparison to OCGBs alone. These results are consistent with previous studies, in which the simultaneous use of BTC with either OCGBs or FLCs in CSF also improved the specificity from the clinical point of view.²⁵

The accuracy in predicting conversion from CIS to MS was assessed for high κ index (> 10.62) and high IgG index (> 0.56), as well as for OCGB positive, and $\text{BTC} \geq 3$, considered either independently or in combination (Table 2). Using the optimal cut-off value for κ index (10.62) obtained in the ROC curve analysis (Figure 2, Table 2), we classified CIS patients in two subgroups: subgroup 1 included

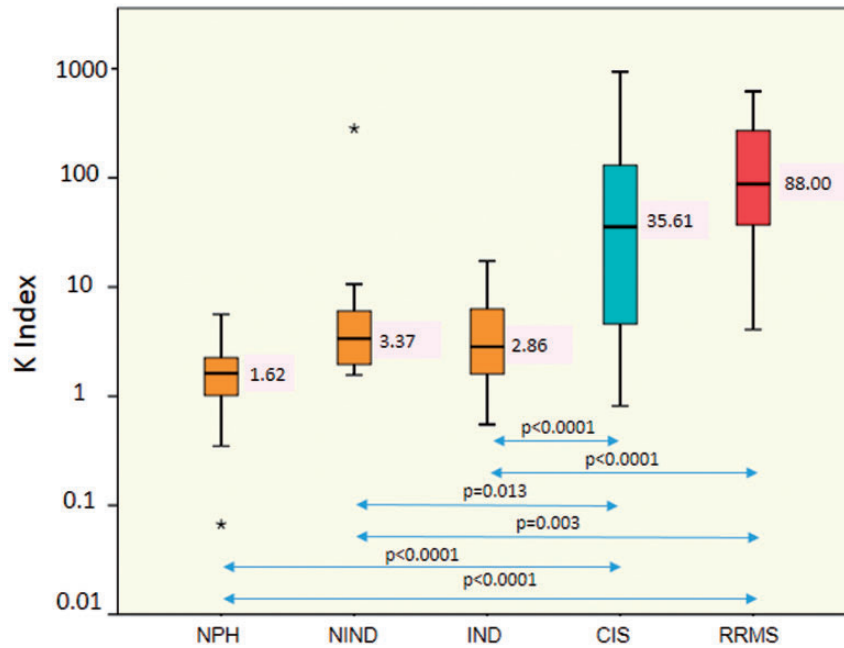


Figure 1. Box and whisker plot κ index: the median and 25th and 75th percentiles (coloured boxes), the minimum and maximum (error bars), and the outliers (*) are indicated. Patients are divided in five groups: control group classified in three subgroups: normal pressure hydrocephalus (NPH) median 1.62, non-inflammatory neurologic diseases (NINDs) different from NPH median 3.37, other inflammatory neurologic diseases (INDs) different from multiple sclerosis (MS) median 2.86; case group: clinically isolated syndrome (CIS) median: 35.61, and relapsing–remitting multiple sclerosis (RRMS) median: 88.00; significant p values are shown between groups (double-headed arrows).

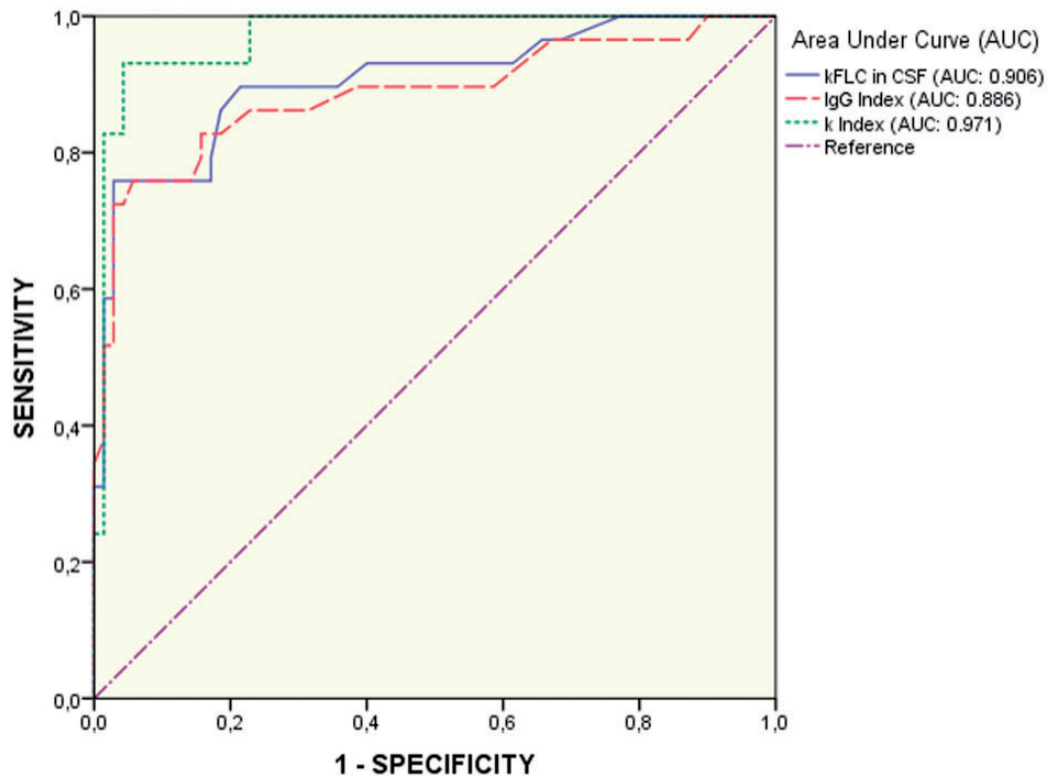


Figure 2. Comparison of receiver operating characteristic (ROC) curves for immunoglobulin G (IgG) index (dashed line), kappa free light chains (κ FLCs) in cerebrospinal fluid (CSF) (solid line) and κ index (dotted line).

Table 2. Accuracy analysis using receiver operating characteristic (ROC) curves for quantitative variables: immunoglobulin G (IgG) index, kappa (κ) index; and accuracy analysis with crosstabs for categorical variables (oligoclonal IgG bands (OCGBs) and Barkhof-Tintoré criteria (BTC)).

	κ index	OCGB	IgG index	BT \geq 3	BTC+ κ index	BTC+ OCGB
Sensitivity (95% CI)	93.1 (77.2–99.2)	96.5 (82.2–99.9)	75.9 (56.5–89.7)	72.4 (52.8–87.3)	69.0 (49.2–84.7)	72.4 (52.8–87.3)
Specificity (95% CI)	95.7 (88.0–99.1)	98.6 (92.3–99.9)	94.3 (86–98.4)	100 (94.9–100)	100 (94.9–100)	100 (94.9–100)
PPV (95% CI)	90.0 (73.1–98.0)	96.6 (82.2–99.9)	84.6 (65.1–95.6)	100 (83.9–100)	100 (83.2–100)	100 (83.9–100)
NPV (95% CI)	97.1 (89.9–99.6)	98.6 (92.3–99.9)	90.4 (81.2–96.1)	89.7 (80.8–95.5)	88.6 (79.5–94.7)	89.7 (80.8–95.5)
AUC	0.971	–	0.886	–	–	–
Cut-off	10.62	–	0.56	–	–	–

AUC: area under the curve; CI: confidence interval. Results for combined test using BTC plus OCGB, and BTC plus κ index are shown.

Table 3. Clinical and laboratory data of clinically isolated syndrome (CIS) patients using κ index cut-off of 10.62. Subgroup 1: patients with κ index > 10.62; subgroup 2: patients with κ index < 10.62.

	Subgroup 1	Subgroup 2	<i>p</i> Value
Patients (n)	49	28	–
Gender (females %)	41 (83.7)	19 (67.9)	–
Age (mean (95% CI))	34.1 (31.3–36.9)	37.4 (32.9–41.8)	0.186
OCGB (+/–)	44/5	4/24	<0.0001
IgG index (>0.56/<0.56)	46/3	3/25	<0.0001
\geq 3 BCT (%)	30 (61.2)	6 (21.4)	0.008
Fulfilled MRI and OCGB criteria (yes/no)	29/17	3/17	<0.0001
Conversion to MS (%)	35 (71.4)	3 (10.7)	<0.0001

BTC: Barkhof-Tintoré criteria; CI: confidence interval; IgG: immunoglobulin G; MRI: magnetic resonance imaging; MS: multiple sclerosis; OCGB: oligoclonal IgG band.

49 CIS patients with κ index >10.62 (κ index median (interquartile range (IQR)): 82.09 (39.73–290.40)), and subgroup 2, 28 patients with κ index <10.62 (κ index median (IQR): 3.68 (2.27–4.87)). Data of CIS patients' classified according to the cut-off value is shown in Table 3. The optimal IgG index cut-off was also established based on the ROC curve (Figure 2), resulting in 0.56 (Table 2), a cut-off similar to previous studies.¹⁴

The mean age for both CIS subgroups studied according κ index cut-off was quite similar, remaining in their mid-30s ($p = 0.186$). There were significant differences between subgroups 1 and 2 (Table 3). Most of the patients in subgroup 1

presented as OCGB positive (89.8%), IgG index >0.56 (93.9%) and fulfilled \geq 3 BTC (61.2%). However, in subgroup 2, most of them presented as OCGB negative (85.7%), IgG index <0.56 (89.3%) and not fulfilled \geq 3 BTC (78.6%). Only three patients of 28 from subgroup 2 fulfilled both, MRI and OCGB criteria whereas 29 patients of 49 from subgroup 1 fulfilled both criteria. Furthermore, in subgroup 1, 71.4% of patients converted to MS while 89.3% of patients of subgroup 2 remain as CIS.

κ Index is well correlated with IgG index, 93.9% of patients with κ index above 10.62 (subgroup 1) presented with IgG index >0.56 and in subgroup 2

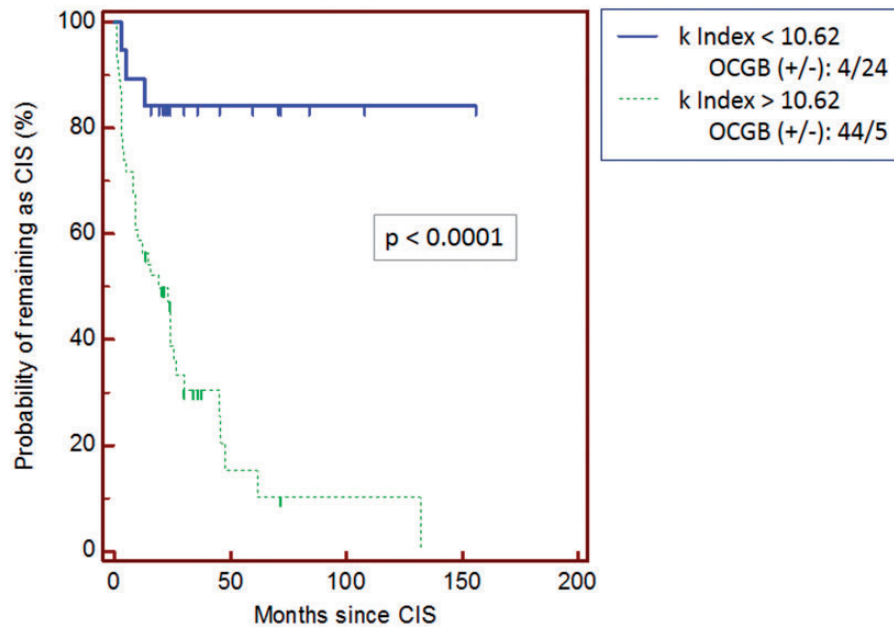


Figure 3. Kaplan-Meier analysis between clinically isolated syndrome (CIS) patients in which is shown the probability of remaining as CIS according to cut-off value for κ index: above 10.62 (dotted line) and below 10.62 (solid line). The time is represented in months since CIS. OCGB: oligoclonal immunoglobulin G band.

(κ index < 10.62) only 10.7% of them showed IgG index > 0.56 (Table 3). The same happens with OCGB, 89.8% of patients with κ index above 10.62 presented as OCGB positive, whereas only 14.3% of patients with κ index below 10.62 presented as OCGB positive.

To study the probability of conversion to MS, we performed a Kaplan-Meier analysis (Figure 3) in CIS patients ($p < 0.0001$) according to a κ index cut-off value of 10.62. The median time for conversion for subgroup 1 (κ index > 10.62) was 19 months with a standard error of 0.0741 (HR of 7.34 (95% CI: 3.82–14.11)).

As is shown in the Kaplan-Meier analysis (Figure 3), the probability of conversion to MS is higher in CIS patients with κ index above 10.62 than in those with low κ index (below 10.62).

In the multivariate Cox regression analysis we studied κ index together with age, sex and BTC. We observed that age and sex do not have an influence in survival curves ($p > 0.05$). The HR adjusted for BTC was 5.30 (95% CI: 1.59–17.63)

Discussion

According to previous studies, the κ index showed higher clinical sensitivity and specificity to detect

MS compared to κ FLC in CSF. In our pilot study we came to the same conclusions, so that, we have focused the present study on κ index. In our study, we found a median and IQR for CIS patients with κ index above the 10.62 cut-off (82.09 (39.73–290.40)) similar to that in RRMS patients (88 (33.96–295.13)). This finding further supports the cut-off of 10.62 obtained for κ index by ROC curve, as a valuable biomarker for conversion to MS in CIS patients.

The use of κ index to detect intrathecal immunoglobulin synthesis was widely reported previously by other groups.^{21,22,26,32} In our cohort, high κ index above 10.62 increased the risk of conversion to MS. This index is higher than the cut-off published by Presslauer *et al.* in 2008²² with a κ index cut-off of 5.9 (96% sensitivity; 86% specificity). Our cut-off (κ index = 10.62), showed higher specificity (95.7%) and lower sensitivity (93.1%). Despite κ index sensitivity and specificity, OCGBs had better accuracy (96.5% sensitivity; 98.6% specificity), which was consistent with previous studies in which the methodology employed for OCGB analysis was the same as the one used in our study.²⁵

However, by determining the κ index, the drawbacks involved in OCGB analysis, such as the requirement for skilled technicians to perform the technique as

well as the experience required to interpret the gels and the lack of standardisation (low interlaboratory reproducibility), can be avoided. Therefore, the κ index is the most interesting alternative to OCGB analysis in screening for MS.

Moreover, CIS patients with a κ index above 10.62 were found to be at greater risk of conversion to MS (HR = 7.34) than patients with κ index below this limit ($p < 0.0001$). When using Cox regression analysis corrected using BTC we found an HR of 5.30, slightly lower than in the univariate analysis, which is consistent with previous studies.²⁵

This predictive value of the κ index of 10.62 is further strengthened by the fact that both CIS subgroups show statistical significant differences when comparing BTC for dissemination of lesions in space, MRI and OCGB criteria. High κ index is also a strong predictor of intrathecal IgG synthesis (positive OCGB and IgG index > 0.56), which supports observations from other studies.^{23,27}

The fact that 71.4% of patients with κ index above 10.62 convert to MS, while 28.6% remained as CIS, and this is in line with previous publications correlating high κ index with conversion to MS.^{25,33}

Our data showed that the risk of conversion to MS in CIS patients is increased with high values of κ index. The importance of the study is highlighted by the fact that a high number of subjects were selected and by the strict inclusion criteria, which made it possible to confirm findings of previous studies. Our study supports the increased value of κ index as a possible biomarker to predict conversion to MS with good accuracy. This suggests that the κ index was appropriate to help in the diagnose of MS in our population, which could be extrapolated to other areas.

Due to advances in technology, the κ index can be measured quickly using an automated system so this test can be easily incorporated in the daily routine of immunology laboratories. The search for a suitable biomarker which predicts conversion from CIS to MS is vital for providing early treatment in these patients enhancing their quality of life.

Funding

This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Acknowledgments

The authors wish to thank the Nodo Biobanco Hospitalario Virgen Macarena (Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía) for its help and support in the donation of clinical samples used in this work. This Biobank is integrated in the Spanish Biobanks Network (www.redbiobancos.es) and supported by Instituto de Salud Carlos III-FEDER, Spanish Health Ministry (grant PT13/0010/0041) (“Plan estatal 2013-2016”).

Declaration of Conflicting Interests

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

Funding

The author(s) received no financial support for the research, authorship, and/or publication of this article.

References

1. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 2011; 69: 292–302.
2. Gomez-Moreno M, Diaz-Sanchez M and Ramos-Gonzalez A. Application of the 2010 McDonald criteria for the diagnosis of multiple sclerosis in a Spanish cohort of patients with clinically isolated syndromes. *Mult Scler* 2012; 18: 39–44.
3. D’Alessandro R, Vignatelli L, Lugaresi A, et al. Risk of multiple sclerosis following clinically isolated syndrome: A 4-year prospective study. *J Neurol* 2013; 260: 1583–1593.
4. Compston A and Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet* 2002; 359: 1221–1231.
5. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, et al. Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2000; 343: 938–952.
6. Izquierdo G, Venegas A, Sanabria C, et al. Long-term epidemiology of multiple sclerosis in the Northern Seville District. *Acta Neurol Scand* 2015; 132: 111–117.
7. Barkhof F, Filippi M, Miller DH, et al. Comparison of MRI criteria at first presentation to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. *Brain* 1997; 120: 2059–2069.
8. Tintore M, Rovira A, Martinez MJ, et al. Isolated demyelinating syndromes: Comparison of different MR imaging criteria to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. *AJNR Am J Neuroradiol* 2000; 21: 702–706.

9. Polman CH, Reingold SC, Edan G, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 Revisions to the 'McDonald Criteria'. *Ann Neurol* 2005; 58: 840–846.
10. Stangel M, Fredrikson S, Meinl E, et al. The utility of cerebrospinal fluid analysis in patients with multiple sclerosis. *Nat Rev* 2013; 9: 267–276.
11. Dobson R, Topping J, Davis A, et al. Cerebrospinal fluid and urinary biomarkers in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 2013; 128: 321–327.
12. Alvarez-Cermeno JC and Villar LM. Multiple sclerosis: Oligoclonal bands—a useful tool to avoid MS misdiagnosis. *Nat Rev* 2013; 9: 303–304.
13. Fitzner B, Hecker M and Zettl UK. Molecular biomarkers in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Autoimmun Rev* 2015; 14: 903–913.
14. Cordero M, Vinuela F, Angulo S, et al. Sensitivity and efficiency of intrathecal IgG secretion in multiple sclerosis. Comparison of several indices and formulas using pre-established values of specificity. *Neurologia* 1997; 12: 277–280.
15. Franciotta D and Lolli F. Interlaboratory reproducibility of isoelectric focusing in oligoclonal band detection. *Clin Chem* 2007; 53: 1557–1558.
16. Abraira V, Alvarez-Cermeno JC, Arroyo R, et al. Utility of oligoclonal IgG band detection for MS diagnosis in daily clinical practice. *J Immunol Methods* 2011; 371: 170–173.
17. Milo R and Miller A. Revised diagnostic criteria of multiple sclerosis. *Autoimmun Rev* 2014; 13: 518–524.
18. Rudick RA, Medendorp S V, Namey M, et al. Multiple sclerosis progression in a natural history study: Predictive value of cerebrospinal fluid free kappa light chains. *Mult Scler* 1995; 1: 150–155.
19. Krakauer M, Schaldemose Nielsen H, Jensen J, et al. Intrathecal synthesis of free immunoglobulin light chains in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 1998; 98: 161–165.
20. 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.
21. Desplat-Jego S, Feuillet L, Pelletier J, et al. Quantification of immunoglobulin free light chains in cerebrospinal fluid by nephelometry. *J Clin Immunol* 2005; 25: 338–345.
22. Presslauer S, Milosavljevic D, Brucke T, et al. Elevated levels of kappa free light chains in CSF support the diagnosis of multiple sclerosis. *J Neurol* 2008; 255: 1508–1514.
23. 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.
24. Kaplan B, Aizenbud BM, Golderman S, et al. Free light chain monomers in the diagnosis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2010; 229: 263–271.
25. Villar LM, Espino M, Costa-Frossard L, et al. High levels of cerebrospinal fluid free kappa chains predict conversion to multiple sclerosis. *Clin Chim Acta* 2012; 413: 1813–1816.
26. Duranti F, Pieri M, Centonze D, et al. Determination of kappa FLC and kappa index in cerebrospinal fluid: A valid alternative to assess intrathecal immunoglobulin synthesis. *J Neuroimmunol* 2013; 263: 116–120.
27. Senel M, Tumani H, Lauda F, et al. Cerebrospinal fluid immunoglobulin kappa light chain in clinically isolated syndrome and multiple sclerosis. *PLoS One* 2014; 9: e88680.
28. Hassan-Smith G, Durant L, Tsentemeidou A, et al. High sensitivity and specificity of elevated cerebrospinal fluid kappa free light chains in suspected multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2014; 276: 175–179.
29. Kaplan B, Livneh A and Sela BA. Immunoglobulin free light chain dimers in human diseases. *Scientific World Journal* 2011; 11: 726–735.
30. Villar LM, Masjuan J, Sadaba MC, et al. Early differential diagnosis of multiple sclerosis using a new oligoclonal band test. *Arch Neurol* 2005; 62: 574–577.
31. Mares J, Herzig R, Urbanek K, et al. Correlation of the IgG index and oligoclonal bands in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2008; 152: 247–249.
32. 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.
33. Rinker 2nd JR 2nd, Trinkaus K and Cross AH. Elevated CSF free kappa light chains correlate with disability prognosis in multiple sclerosis. *Neurology* 2006; 67: 1288–1290.