

SELÜLOZ ASETAT VE AGARÖZ JEL ELEKTROFOREZ YÖNTEMLERİ İLE SAPTANAN OLİGOKLONAL BANTIN (OKB) MULTİPL SKLEROZ TANISINDAKİ DEĞERİ

Muhittin A. SERDAR¹ Fatih ÖZDAĞ² Taner ÖZGÜRTAŞ¹ Bilge ÖZÇELİK¹ Ümit Hıdır ULAS²
Serkan TAPAN¹ Türker KUTLUAY¹

DIAGNOSTIC VALUE OF OLIGOCLONAL BAND IN MULTIPL SCLEROSIS USING CELLULOSE ACETATE AND AGAROSE GEL ELECTROPHORESIS

Summary: Multiple sclerosis (MS) is characterised by focal or multifocal areas of demyelination and perivascular lymphocyt infiltration with scarring in central nervous system. The finding of oligoclonal immunoglobulin band (OCB) in the cerebrospinal fluid (CSF) is considered a cornerstone in the diagnosis of multiple sclerosis (MS), but can be observed in other disease as well. In this retrospective study, between 1990 and 2000, MS diagnosed in 57 (16.1%) of 374 patients on the basis of Poser's criteria which includes OCB using two different electrophoretic methods, number of attacks, clinical evident, magnetic resonance imaging (MRI), measurement of evoke potential. OCB was found in 43 (75.4 %) of 57 patients with MS and in 50 (16.3%) of 307 patients without MS. Sensitivity and specificity were 88.2 %, 85.7 % with cellulose acetate-gold staining methos, 70.0 %, 83.3 % with agarose gel-silver staining and 91.8 %, 58.1 % with MRI, respectively. Sensitivity and specificity were 96.4 %, 90.7 % with each of OCB and MRI or all of them, respectively. As a result, OCB is an important laboratory test in diagnosis of MS as well. Although both of the electrophoretic methods are suitable, cellulose acetate-gold staining method is more convenient than agarose gel-silver staining. In addition, using OCB together with MRI and other clinical parameters may enhance the diagnostic sensitivity and specificity of MS.

Key Words: Multiple sclerosis, oligoclonal band

Özet: Multipl skleroz (MS) santral sinir sisteminde, fokal veya multifokal demyelinizan alanlar ve perivasküler lenfositik infiltrasyon ile karakterize bir hastalıktır. MS tanısında beyin omurilik sıvısında (BOS) oligoklonal bantın (OKB) saptanması önemli bir tanısal gelişim sağlamıştır. Ancak OKB azda olsa diğer santral sinir sistemi hastalıklarında da pozitif olabilmektedir. Bu retrospektif çalışmada, 1990-2000 yılları arasında çeşitli nörolojik şikayetleri bulunan 374 hastada klinik parametreler, elektrofizyolojik çalışmalar, magnetik rezonans görüntüleme (MRG) ve BOS'da iki farklı elektroforetik yöntemle OKB değerlendirmesi yapıldı. Poser kriterlerine göre 57 (%16.1) hastaya klinik kesin MS tanısı konuldu. MS tanısı alan 57 hastanın 43'ünde (%75.4) ve MS olmayan 307 hastanın 50'sinde (%16.3) OKB pozitif saptandı. Çalışma sonucunda, selüloz asetat-altın boyama elektroforezinin duyarlılığı ve özgünlüğü % 88.2, % 85.7 saptanırken, agaroz jel-gümüş boyama tekniği için % 70.0, % 83.3 ve MRG için ise % 91.8, % 58.1 olarak saptandı. İlave olarak MRG veya OKB testlerinden herhangi birinin pozitifliğinde sensitivite % 96.4 iken her ikisinin pozitifliğinde spesifite % 90.7 tespit edildi. Sonuç olarak, OKB MS tanısında halen önemli bir testir. Her iki elektroforezde uygun olmasına rağmen selüloz asetat-altın boyama elektroforezi daha duyarlı olduğu gözlemlendi. Ayrıca OKB, MRG ve klinik parametreler ile birlikte değerlendirilmesi sonucunda, duyarlılık ve özgünlüğünün önemli derecede artırılabilirdiği değerlendirildi.

Anahtar Kelimeler: Multipl sklerozis, oligoklonal band

1 Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara

2 Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Nöroloji Anabilim Dalı, Ankara



GİRİŞ

Multiple sklerosis (MS), myelinin otoimmün nedenlerle yıkılmasıyla oluşan, genellikle atak ve düzelmelerle seyreden, bazen de progresif bir seyir gösteren santral sinir sisteminin demiyelinizan bir hastalığıdır. Patolojik olarak beyaz cevherde lezyonlar fokal veya multifokal perivenöz lenfosit infiltrasyonlar gösterir. Klinik olarak güçsüzlük, ataxia, koordinasyon bozukluğu, optik nörit ve parastezi gibi bulgular oluşturur (1,2).

MS'de temel patoloji, miyelin yıkımı ve etrafında kronik inflamatuvar hücreler ile çevrili plaklardır. Plak etrafındaki inflamatuvar alan içerisinde T lenfosit (CD8+ ve CD4+) ve makrofajlar bulunmaktadır. Hem makrofaj hemde T hücreleri, oligodendrositlerin yıkımına neden olur. Sitotoksik CD4+ T lenfosit hücrelerinin etkileri muhtemel Fas/Fas ligand yolu üzerinden gerçekleşir. Değişik çalışmalarda MS benzeri lezyonların patolojisinde hücrel immünitenin rolü saptanmıştır. MS'li hastaların BOS immunglobulinlerinin artışıda, antikor aracılı miyelin yıkımını desteklemektedir (1). Bununla beraber MS'lu hastalarda yapılan HLA antijen çalışmalarında, HLA-DR2 antijenlerinin OKB pozitifliği, HLA-DR4'ün ise OKB negatif olan hastalarda daha yüksek oranlarda saptanmıştır. Bu farklılığın oluşan immün cevabın derecesiyle ilişkili olabileceği belirtilmiştir (2). BOS immunglobulinlerinin artışı, özellikle IgG'nin sınırlı heterojenitesi sonucunda BOS elektroforezinde oligoklonal bantlar (OKB) oluşturur. OKB'in MS tanısında ki kullanımı önemli bir dönüm noktası olmuştur. Ancak santral sinir sisteminde (SSS) diğer demiyelinizan, inflamatuvar, infeksiyöz (viral ensefalit, menenjit, subakut sklerozan panensafalit vs), dejeneratif, vasküler ve tümoral patolojilerde de OKB'in gözlenebilmesi testin özgünlüğünü azaltmıştır (1-3).

MS'de immunglobulinlerin artışı uzun yıllardır bilinmektedir. Her ne kadar artış IgM ve IgA'da da gözlenirse de, başlıca IgG fraksiyonundadır. Bununla

birlikte MS'li hastaların IgG değerleri normal olsa bile yaklaşık %90'ında OKB'in saptanması, yalnızca IgG ölçümleri ile değerlendirmenin yetersizliğini göstermiştir (4).

MS tanısı özellikle klinik değerlendirmeler ile konulmaktadır (5,6). Tanı, atak sayısı ve diğer klinik bulguların varlığı, elektrofizyolojik testlerle saptanan uyarılmış yanıtlar ve magnetik rezonans inceleme (MRG) ile SSS'deki multifokal demiyelinize odakların saptanması ile konulmaktadır. Bununla birlikte biyokimyasal testler olan miyelin basic protein, OKB ve % IgG, MS tanısında önemli derecede yardımcı olmaktadır. Bir çok laboratuvarıda BOS elektroforezi ve IgG değerlendirilmesi yapılmasına rağmen miyelin basic protein ölçümleri sınırlı olarak kullanılmaktadır (7,8).

Bu çalışmada MS ve diğer SSS hastalığı tanısı alan hastalarda OKB, %IgG, MRG kullanılarak OKB'nin tanısız değeri araştırıldı. Ayrıca OKB ölçümleri için yaygın olarak kullanılan selüloz asetat ve agaroz jel elektroforez yöntemleri karşılaştırıldı.

MATERYAL VE METOD

1990-2000 yılları arasında GATA Nöroloji Kliniğine çeşitli şikayetlerle başvuran 374 hastaya (76 kadın, 278 erkek) OKB ve 312 hastaya da IgG ölçümleri yapıldı. Bunlarla birlikte klinik durumlar göz önünde bulundurularak 90 hastaya MRG, elektrofizyolojik incelemeler uygulandı ve Poser kriterlerine göre klinik kesin MS (KKMS) tanısı konuldu (6).

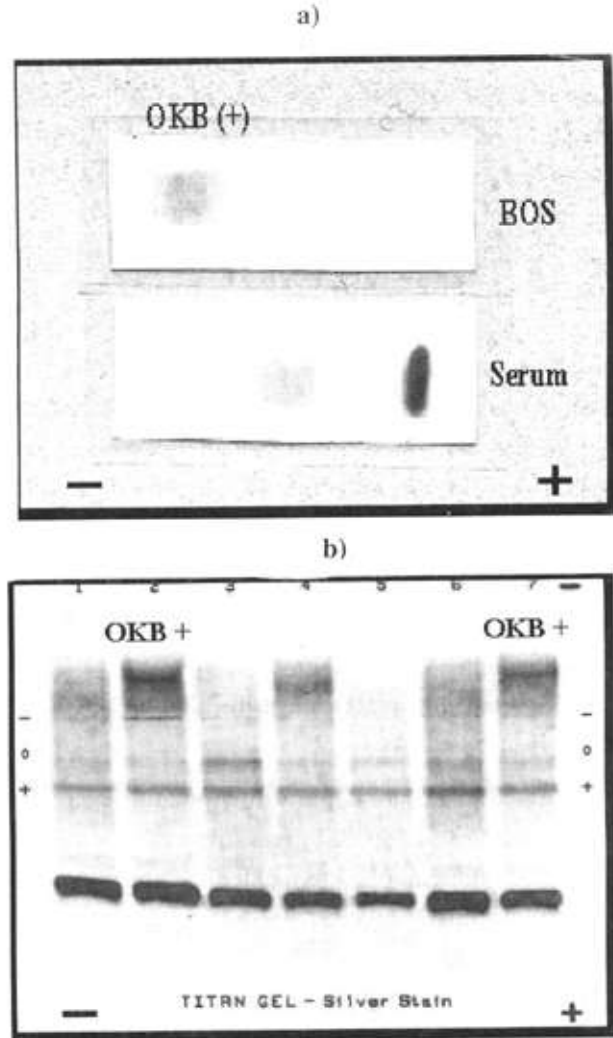
OKB değerlendirilmesi amacıyla alınan BOS ve serum örneklerinin 136'sına selüloz asetat, 238 'sine ise agaroz jel elektroforezi yapıldı.

BOS örnekleri lumbar ponksiyon ile toplandıktan sonra total protein ve IgG ölçümleri yapıldı. Total protein triklor asetik asit kullanılarak, türbidimetrik yöntemle ölçüldü (9). BOS IgG ise nefelometrik yöntemle (Behring Nephelometer, Marburg, Germany) ölçüldü. %IgG (IgG/total protein) değerleri için sınır değeri %18 olarak belirlendi (8).

Selüloz asetat elektroforezi; Dilüe edilmeden direkt olarak uygulanan BOS veya 1/200 dilüe serum örnekleri, pH'sı 8.6 olan 0.06 M barbital tampon içerisinde 180 V'da 60 dakika elektroforeze tabi tutuldu. Elektroforez işleminin sonunda pleytler sırasıyla, 15 dk protein fiksasyonu %10'luk triklorasetik asitte, 10 dk % 5'lik asetik asitte tutuldu ve distile su ile 5 dk yıkandı. İmmunofiksasyon işlemi için pleytler 15 dk anti IgG içeren ortamda tutuldu ve 30 sn akan su altında yıkandı. İşlem bitimini takiben, iki defa 15 dk 154 mmol/L sodyum klorür içerisinde bekletildi ve boyama işlemi için altın klorür (100 mg/dl altın klorür çözeltisinden 10 ml, 4 ml HCL, 20 ml Tween 20 ve 200 ml taze sitrik asit çözülerek distile su ile bir litreye tamamlandı) içerisinde en az 1.5 saat (daha iyi görünmesi için bir gece bekletilebilir) bekletildi. İşlem sonrası pleytler distile su ile yıkanarak kurutuldu ve OKB varlığı vizüel olarak değerlendirildi (10).

Agaroz jel elektroforezi (Helena Laboratories, Beaumont, Texas, USA): Gümüş boyama agaroz jel elektroforezi klasik agaroz jel elektroforez problemleri giderilerek 100 kat daha hassas getirilmiştir (15) Alınan BOS örneklerinde total protein düzeyi 30-50 mg/dl olacak şekilde dilüe edilerek 4 ml uygulandı. Soğutucu aparat yerleştirilmiş 8.4-8.6 pH 0.06 M barbital tampon bulunan elektroforez tankında 250 V'da 20 dakika elektroforeze tabi tutuldu. İşlem sonrasında yıkandıktan sonra plaklar 60-70 oC'de kurutularak 3 dakika süre ile gümüş boyaması (Solüsyon A: %5 sodyum karbonat , Solüsyon B: 0.4 g amonyum nitrat, 0.4 g gümüş nitrat, 1 g silikotungstik asit ve 2.8 ml 370 g/L lik formaldehit çözeltisi su ile 200 ml ye tamamlanır. Solüsyon A ve B, 2:1 oranında karıştırılır) yapıldı. Boyama tamamlanmasından sonra 15 dk 10 ml/L lik asetik asit solüsyonu ile reaksiyon sonlandırıldı. 5 dk distile su ile yıkandıktan sonra kurutuldu ve OKB vizüel olarak değerlendirildi.

MRG yalnızca 90 hastaya yapıldı ve lezyonun büyüklüğü (> 6 mm), yeri (corpus collosum veya infratentorial yerleşim), şekli (oval), sayısı, lezyondaki atrofi değişiklikleri belirlenerek kayıt altına alındı.



Şekil 1: Beyin omurilik sıvısında (BOS) oligoklonal bantın (OKB) elektroforetik görünümü, a) Agaroz jel elektroforezi-gümüş boyama tekniği ile, b) Selüloz asetat elektroforezi-altın boyama yöntemi

MS tanısına yardımcı olması amacıyla ilave olarak elektrofizyolojik inceleme yapıldı bunlar: optik nöriti saptamak için vizüel stimuluslar uygulaması (VEP-visual evoked potential) , sesin transmisyonunun bozulduğu demiyelinizan



lezyonların saptanması (BAEP-brain stem auditory evoked potential) ve el bileği ve dize yapılan uyarılar ile SSS içerisindeki yolların değerlendirilmesi (SSEP-somatosensory evoked potential) yapıldı.

Çalışma için duyarlılık (gerçek pozitif,gerçek pozitif+yalancı negatif), özgünlük (gerçek negatif,gerçek negatif+yalancı pozitif), pozitif öngörü değeri (PÖD=gerçek pozitif,gerçek pozitif yalancı pozitif) ve negatif öngörü değeri (NÖD=gerçek negatif,gerçek negatif +yalancı negatif) hesaplandı.

BULGULAR

MS şüphesi üzerine yapılan bütün testlere ait duyarlılık, özgünlük, PÖD, NÖD sonuçları tablo I'de, bu hastalara ait elektroforetik görünümünden örnekler şekil 1'de gösterilmiştir. Agaroz jel elektroforezi ile 40'ı KKMS (%17.5) 238 hastaya, selüloz asetat elektroforeziyle 17'i KKMS (%12.5) 136 hastada OKB elektroforeziyle değerlendirildi.

% IgG sonuçlarına ait değerlendirmelerde, özgünlüğünün yüksek olmasına rağmen (%83.9) KKMS tanısı için yeterli duyarlılığa sahip olmadığı (%57.1) tespit edildi.

MRG yapılan hastalarda yanlış pozitif değerlerin yüksek olması diğer SSS hastalıklarının ayırımında güçlükler olduğunu göstermektedir. Ancak yanlış negatifliğin düşük çıkması ile duyarlılığının yüksek olduğu (%91.8) tespit edildi.

Tablo I: Klinik kesin MS (KKMS) tanısı için, oligoklonal bantın (OKB), %IgG, magnetik rezonans görüntüleme (MRG) yöntemlerinin tamsal etkinlikleri

	n	Gerçek pozitif	Gerçek negatif	Yanlış pozitif	Yanlış negatif	Duyarlılık %	Özgünlük %	PÖD %	NÖD %
OKB Agaroz jel	238	28	165 (53)	33 (20)	12	70.0	83.3	45.9	93,22
OKB Selüloz Asetat	136	15	102 (13)	17 (9)	2	88.2	85.7	46.9	98,1
% IgG	312	32	199 (65)	38 (21)	24	57.1	83.9	45.7	89,2
MRG	90	24	36 (17)	26 (23)	4	91,8	58,1	50	94,7
MRG veya OKB	90	27	38	24	1	96,4	61,3	52,9	97,4
MRG ve OKB	90	20	53	3	12	62,5	90,7	86,9	81,5

Parantez içerisindeki değerler diğer santral sinir sistemi hastalıkları saptanan olguları göstermektedir.

MS ile diğer SSS hastalıkları oldukça sık karıştırılmaktadır. Yanlış pozitif vakaların önemli bir kısmı, tanısı konan diğer SSS patolojileridir. Bunların en önemlisi dejeneratif SSS hastalıklarıdır. Özellikle MRG incelemesinde 26 yanlış pozitif vakanın 23'ü (% 88.3) diğer SSS hastalıklarıdır.

Elde edilen sonuçlara göre selüloz asetat-altın boyama ile OKB değerlendirilmesinin daha yüksek duyarlılığa, özgünlüğe, PPV ve NPV'ye sahip olduğu saptandı. Bununla birlikte çalışma sonuçları değerlendirildiğinde OKB ve MRG yöntemleri ortak kullanıldığında duyarlılık ve özgünlüğün arttığı saptandı (% 96.4 ve %90.7).

TARTIŞMA

MS tanısı için günümüzde yeterli duyarlılık ve özgünlüğe sahip test henüz bulunmamaktadır. Bununla birlikte klinik bulgular, elektrofizyolojik incelemeler, MRG bulguları ve BOS proteinlerini değerlendirilmesi ile MS tanısı konulmaya çalışılmaktadır (5,6). Bununla birlikte çalışmaların önemli bir kısmında BOS elektroforezi serum elektroforezi ile beraber yapılarak değerlendirilmesi önerilmiştir (12).

BOS, OKB değerlendirilmesinde poliakrilamid jel elektroforezi, selüloz asetat elektroforezi gibi değişik teknikler ve farklı boyama ve immün fiksasyon metodları kullanılmıştır (13). Son yıllarda kapiller zon elektroforez tekniği ile BOS oligoklonal band değerlendirilmelerinde konsantrasyon edilmeden

yapılabilmektedir (14). Cavuoti ve arkadaşları OKB değerlendirmesinde sensitiviteyi immünfiksasyon için %74 ve agaroz jel elektroforezini için ise %56 saptamışlar ve

kolaylığı nedeniyle immunfiksasyon tekniğinin daha uygun olduğunu belirtmişlerdir (15). Lunding ve arkadaşları ise immunfiksasyon elektroforezinin sensitivitesinin, agaroz jel elektroforezinin yaklaşık iki katı olduğunu saptamıştır (16). Ancak bu çalışmada da kullanılan agaroz jel-gümüş boyama tekniği klasik agaroz jel elektroforezinden farklı olarak, Kerenji ve arkadaşları tarafından modifiye edilerek, BOS örnekleri konsantre edilmeksizin OKB değerlendirilebilmesini mümkün hale getirmektedir (11). Selüloz asetat elektroforezi ile OKB değerlendirilmesindeki duyarlılığı ile ilgili farklı görüş bildiren çalışmalar mevcuttur (17). Bu çalışmada uygulanan selüloz asetat-altın boyama elektroforeziyle, OKB değerlendirilmesi nisbeten zor ve pahalı olmasına rağmen, agaroz jel-gümüş nitrat yöntemine göre daha hassas olduğu gözlenmiştir. Boyama aşamasında daha az hassas olduğu bilinen, ancak işlem kolaylığı nedeniyle tercih edilen Paragon viole ve coomassie brilliant blue yöntemlerinde sık kullanılmaktadır. Ancak bu boyama yöntemlerinde, BOS'un konsantre edilmesi gereklidir (18)

Gerson ve ark. 1/80 konsantre edilen örneklerde yaptıklarda çalışmada, agaroz jel elektroforezi ile OKB'nin duyarlılığını %78, özgünlüğünü ise %88 bulunurken, %IgG duyarlılığı %35, özgünlüğü ise %95 bulunmuş ve miyelin basic protein ve OKB testlerinin beraber kullanımı ile daha yüksek tanısal doğruluk elde edilebileceğini belirtmişlerdir (7). Bu çalışmada modifiye edilerek uygulanan selüloz asetat-altın boyama elektroforezinin agaroz jele göre daha yüksek tanısal değere sahip olduğu tespit edildi. Agaroz jel-gümüş boyama elektroforezinin ise OKB değerlendirmesinde güçlük ile nispeten daha düşük tanısal değere sahiptir. OKB değerlendirilmesi ve MRG beraber kullanımı, MS tanısını önemli oranda artırmıştır. MRG non invaziv olması nedeniyle günümüzde en sık başvurulan yöntemdir. Bununla birlikte pahalı olması ve değerlendirilmesinde diğer SSS hastalıkları ile ayırımında da zorluk göstermesi bir dezavantajdır.

Zeman ve ark. yaptıkları çalışmada, nadirde olsa tekrarlayan örneklerde MS'li hastaların OKB sonuçlarının negatif olmasının benign prognozu gösterebileceği belirtilmiştir (19). Benzer olarak OKB'nin prognostik bir faktör olabileceği ve optik nörit, transvers myelit gibi MS'in ilk atağında görülen izole sendromlarda BOS IgG düzeylerindeki artışların daha fazla olduğu vurgulanmıştır (20). IgG ile birlikte IgG kappa band görülmesinin veya IgM indeks çalışmalarının da MS tanısında kullanılabileceğini belirtilmiştir (21-23). Bu çalışmada % IgG duyarlılığın düşük olmasına rağmen özgünlüğü yüksek saptanmıştır. Retrospektif yapılan bu çalışmada bütün örneklerin serum ölçümleri yapılmadığı için IgG/albumin oranı çalışılmadı. Değişik çalışmacılar tarafından da belirtildiği gibi IgG/albumin oranı %75-86 arasında MS'li hastalarda pozitif saptanmıştır (24)

Sonuç olarak günümüzde MS tanısında ideal bir laboratuvar testi bulunmamasına rağmen, OKB değerlendirilmesi MS tanısında önemli laboratuvar testlerinden biridir. Duyarlılık ve maliyetleri göz önüne alındığında her iki yöntemde kullanılabilir olmasına rağmen, selüloz asetat-altın boyama elektroforezinin agaroz jel-gümüş boyama yöntemine göre daha uygun olduğu ve mutlaka diğer kriterlerle beraber değerlendirilerek MS'li hastalara tanı konulması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. De Girolami U, Anthony DC, Frosch MP. The central nervous system. In: Cotran RS, Kumar V, Collins T. Pathologic basis of disease. WB Saunders Company, 1326-1327, Pennsylvania 1999.
2. Fukazawa T, Kikuchi S, Sasaki H, Hamada K, Hamada T, Miyasaka K, Tashiro K. The significance of oligoclonal bands in multiple sclerosis in Japan: relevance of immunogenetic backgrounds. J Neurol Sci 1998;158:209-14
3. Links H. The cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. In: Sswash M, Oxbury J, eds. Clinical neurology. Edinburgh:Churchill Livingstone, 1991:1128-38.



4. Mingioli Es, Strober W, Tourtellotte WW. Quantification of IgG, IgA, Ig M, Ig D and IgE levels in central nervous systems disorders. *Neurology* 1978;28:988-90.
5. McDonald WI, Halliday AM. Diagnosis and classification of multiple sclerosis. *Br Med Bull* 1977;33:4-8.
6. Raun NE, Poser W. Age at onset, initial symptomatology and the course of multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 1982;66:355-62.
7. Gerson B, Orr JM. Oligoclonal bands and quantification of IgG in CSF as indicators of multiple sclerosis. *Am J Clin Pathol* 1980;73:87-91.
8. Gerson B, Cohen SR, Gerson IM, Guest GH. Myelin basic protein, oligoclonal bands, and IgG in cerebrospinal fluid as indicators of multiple sclerosis. *Clin Chem* 1981; 27 (12): 1974-77.
9. Gelson T, Ackermann PG. Protein and amino acids. In: *Practical Clinical Chemistry*, first edition, Little, Brown and Company, Boston, 1975, 180-182.
10. Riches PG, Kohn J. Improved resolution of cellulose acetate membrane electrophoresis. *Ann Clin Biochem* 1987;24:77-9.
11. Kerenji L, Gallyas F. A highly sensitive method for demonstrating protein electrophoretic, immunoelectrophoretic and immunodiffusion preparation. *Clin Chim Acta*, 1972;38:465-6.
12. Davenport RD, Keren DF. Oligoclonal bands in cerebrospinal fluids: significance of corresponding bands in serum for diagnosis of multiple sclerosis. *Clin Chem* 1988 Apr;34(4):764-5.
13. Link H, Kostulas V. Utility of isoelectric focusing of cerebrospinal fluid and serum on agarose evaluated for neurological patients. *Clin Chem* 1983;29:810-15.
14. Sanders E, Katzmann JA, Clark R, Oda RP, Shihabi Z, Landers JP. Development of capillary electrophoresis as an alternative to high resolution agarose electrophoresis for the diagnosis of multiple sclerosis. *Clin Chem Lab Med* 1999;37:37-45.
15. Cavuoti D, Baskin L, Jialal I. Detection of oligoclonal bands in cerebrospinal fluid by immunofixation electrophoresis. *Am J Clin Pathol* 1998;109:585-8.
16. Lunding J, Midgard R, Vedeler CA. Oligoclonal bands in cerebrospinal fluid: a comparative study of isoelectric focusing, agarose gel electrophoresis and IgG index. *Acta Neurol Scand* 2000;102:322-5.
17. Mehta PD, Mehta SP, Patrick BA. Silver staining of unconcentrated cerebrospinal fluid in agarose gel (Panagel) electrophoresis. *Clin Chem* 1984;30:735-6.
18. Jhonson A, Rohlfes EM, Siverman LM. Proteins: In *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. Editors; CA Burtis, Ashwood ER. 3th edition WB Saunders Company, Pennsylvania, 1999, 527-528.
19. Zeman AZJ, Kidd D, Mc Lean Bn, Kelly Ma, Francis DA, Miller DH, Kendall BE, Rudge P, Thompson EJ, McDonal Wl. A study of oligoclonal band negative multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1996;60:27-30.
20. Sandberg-Wollheim M, Bynke H, Cronqvist S. A long term prospective study of optic neuritis: evaluation of risk factors. *Ann Neurol* 1990;27:386-93.
21. Sharief MK, Keir G, Thompson EJ. Glutaraldehyde-enhanced immunofixation: a sensitive new method for detecting oligoclonal immunoglobulin M. *J Neuroimmunol* 1989;23:149-56.
22. Sharief MK, Thompson EJ. Intrathecal immunoglobulin M synthesis in multiple sclerosis. *Brain* 1991;114:181-95.
23. Jenkins MA, Cheng L, Ratnaike S. Multiple sclerosis: use of light-chain typing to assist diagnosis. *Ann Clin Biochem* 2001;38:235-41.
24. Link H, Müller R. Immunoglobulins in multiple sclerosis and infections of the nervous system. *Arch Neurol* 1971;25:326-44.