

Comportamiento del resultado de las Bandas oligoclonales en líquido cefalorraquídeo en Pacientes con esclerosis múltiple del Hospital Militar Central

**Por:
Sergio Cabrera Limpías
Juan Carlos González**

UNIVERSIDAD MILITAR NUEVA GRANADA

SERVICIO DE NEUROLOGIA

HOSPITAL MILITAR CENTRAL

BOGOTÁ, 2010

Comportamiento del resultado de las Bandas oligoclonales en líquido cefalorraquídeo en Pacientes con esclerosis múltiple del Hospital Militar Central

Por:
Sergio Cabrera Limpias
Juan Carlos González

Proyecto de Investigación
Como Requisito Para Optar
al Título de Especialidades Médicas

Asesor Metodológico:
Dr. Jean Paul Vergara

Asesor Temático:
Dra. Consuelo Romero
Dr. Gabriel Centanaro

UNIVERSIDAD MILITAR NUEVA GRANADA
SERVICIO DE NEUROLOGÍA
HOSPITAL MILITAR CENTRAL
BOGOTÁ, 2010

TABLA DE CONTENIDOS

1. Resumen
2. Introducción
3. Fundamento teórico
 - 3.1. Análisis cualitativo de inmunoglobulinas en líquido cefalorraquídeo.
 - 3.1.2. Electroforesis de proteínas de alta resolución
 - 3.1.2.1. Electroforesis de proteínas en gel de agarosa y el descubrimiento de las bandas oligoclonales en el líquido cefalorraquídeo
 - 3.1.3. Isoelectroenfoque
 - 3.1.3.1. Isoelectroenfoque y bandas oligoclonales en el líquido cefalorraquídeo
 - 3.1.4. Electroforesis de proteínas de alta resolución vs isoelectroenfoque
 - 3.2. Papel de las bandas oligoclonales en los nuevos criterios diagnósticos para la esclerosis múltiple
 - 3.3. Recomendaciones para el análisis del líquido cefalorraquídeo en esclerosis múltiple
4. Identificación y formulación del problema
5. Justificación
6. Objetivos
 - 6.1. Objetivo general
 - 6.2. Objetivos específicos
7. Metodología
 - 7.1. Tipo de estudio
 - 7.2. Población y muestra
 - 7.3. Criterios de inclusión y exclusión
 - 7.4. Variables
 - 7.5. Recolección de datos
8. Plan análisis
9. Resultados
10. Conclusiones
11. Discusión
12. Cronograma de actividades
13. Presupuesto
14. Aspectos éticos
15. Declaración de autoría
16. Referencias bibliográficas

1. RESUMEN

La esclerosis múltiple es la enfermedad neurológica más común y discapacitante en adultos jóvenes¹ en Colombia se estima una prevalencia de 1,48 a 4,98 casos por 100.000 habitantes^{2,3}. Hasta el momento no existe ninguna prueba diagnóstica certera y ni siquiera la biopsia es totalmente específica para su diagnóstico. Los criterios para su diagnóstico permanecen vigentes desde su última actualización en el 2005⁴. El laboratorio clínico ha tomado gran importancia desde hace casi 3 décadas cuando se incluyó la valoración producción intratecal de anticuerpos en Líquido cefalorraquídeo como ayuda complementaria para el diagnóstico⁵. Existen 2 formas establecidas para la medición de tales anticuerpos: la cualitativa y la cuantitativa⁶, siendo esta última la mas implementada, a la vez que recomendada por la literatura^{7,6}. A través de la historia, se han venido desarrollando diferentes técnicas de medición cualitativa y mezclas de estas para tratar de mejorar la sensibilidad y la especificidad de ellas. Actualmente en el Hospital Militar Central se esta empleando para la detección de las bandas oligoclonales la técnica cualitativa, Electroforesis de proteínas de alta resolución solo en líquido cefalorraquídeo, técnica que en varios estudios demostró tener baja sensibilidad y especificidad per se^{8,9} y comparada con la técnica mundialmente recomendada⁶. Por lo anterior, dada la importancia de la sensibilidad hasta del 100% reportada en la literatura de este examen en el proceso diagnóstico de la esclerosis múltiple^{7,10} y el desconocimiento de la prevalencia de bandas oligoclonales positivas en nuestra población de pacientes con Esclerosis múltiple, se propone hacer un estudio descriptivo de cohorte retrospectiva, para tratar mostrar cual es la proporción de pacientes con Bandas oligoclonales positivas y con diagnóstico vigente de Esclerosis Múltiple definitiva.

2. INTRODUCCIÓN

La esclerosis múltiple (EM) fue descrita por primera vez a comienzos del siglo XIX por (Cruveilhier 1829; Carswell, 1838; Frerichs, 1849) y Charcot propuso su nombre “la sclerose en plaques” en 1868¹¹; forma parte de un grupo de enfermedades neurológicas que tienen como característica principal, la destrucción de la mielina (desmielinización)¹², de gran importancia debido a su frecuencia, cronicidad e inicio a temprana edad¹². Es la patología neurológica más común y discapacitante en adultos jóvenes¹, la epidemiología en países de baja prevalencia ha sido poco estudiada, en Colombia se estima de 1,48 a 4,98 casos por 100.000 habitantes^{2,3}.

Las manifestaciones clínicas son producto de la gran variedad de ubicación y extensión de los focos desmielinizantes generando daño en nervio óptico, cerebro y médula espinal que remiten y recurren en un periodo de tiempo de meses a años¹², generando así una subclasificación clínica dependiendo del curso que tome la enfermedad: Síndrome clínico aislado, EM recaída-remisión, EM primaria progresiva y secundaria progresiva¹³. En su patogénesis se ha involucrado al sistema inmune como el principal causante de su patogénesis, estando involucrados todos sus componentes, tanto respuestas innatas como adquiridas (humorales-celulares) en la generación de la lesión del sistema nervioso central. Dada la clara participación inmune en la patología se han hecho estudios para tratar de dilucidar esta cascada de reacciones biológicas para se aplicadas tanto para el avance del conocimiento de la enfermedad en si, como para el desarrollo de procedimiento diagnósticos¹⁴.

El diagnóstico de la enfermedad es fundamentalmente clínico, dado que no existe ninguna exploración complementaria cuyo resultado sea patognomónico¹⁵, se basa en la confirmación de la diseminación de las lesiones en el tiempo y en el espacio, al mismo tiempo que excluyendo otras posibles etiologías. Por consiguiente requiere una integración de la información obtenida en la anamnesis, examen neurológico y pruebas complementarias, entre ellas la demostración de los hallazgos característicos del líquido cefalorraquídeo (LCR) y las imágenes de resonancia magnética, paraclínicos que han venido cobrando gran importancia con el tiempo dado el desarrollo tecnológico que han presentado¹⁵. Los hallazgos anormales en el LCR en pacientes con EM

fueron reportados por primera vez por Hinton en 1922, en 1983 Poser los introdujo en los criterios para su diagnóstico⁵ y actualmente continúan siendo vigentes según la última revisión de los criterios en el 2005⁴. Como se mencionó anteriormente, la respuesta humoral juega un papel importante en la fisiopatología de la enfermedad sintetizando inmunoglobulinas (Igs) intratecales con aumento principalmente en la IgG en los pacientes diagnosticados, lo que es característico de inflamación crónica, estos están dirigidos al azar o contra proteínas de la mielina sin estar implicados claramente con las manifestaciones clínicas o el curso de la enfermedad⁷, pero sí con importante valor en el proceso diagnóstico por la gran sensibilidad (90-100%) que le confiere un alto valor predictivo negativo¹⁰ muy útil para descartarla en casos sospechoso, dado que un resultado negativo prácticamente nos descartaría esta patología; incluso en los criterios de McDonald modificados sugieren explícitamente, que de si las bandas oligoclonales del LCR son negativas, se requiere extremo cuidado antes de hacer el diagnóstico de EM y diagnósticos alternativos se deben buscar⁴. La síntesis intratecal de Ig se puede medir de forma cuantitativa a través de índice de IgG LCR/suero o de forma cualitativa con técnicas de electroforesis; estas últimas han llegado a mencionarse como las futuras “pruebas de oro” para la valoración de las IgG intratecales⁶ dado su gran sensibilidad al implementarse con la técnica apropiada. En estas técnicas se busca la presencia de Bandas oligoclonales en el corrido electroforético que representarían la presencia de proteínas del tipo gammaglobulinas, que luego se comparan con las de suero y si existe una diferencia de 2 o mas en el LCR con respecto al suero se considera como un examen positivo para la presencia de Bandas oligoclonales .

En nuestro Hospital contamos con una técnica de medición cualitativa que no es la recomendada actualmente en la literatura (isoelectroenfoque). El método que se ha implementado en nuestro laboratorio para la detección intratecal de Ig, es la electroforesis de proteínas de alta resolución, que ha mostrado menor rendimiento en diferentes estudios en los que directamente la comparan con el isoelectroenfoque^{8,9}. Estos estudios mostraron que las bandas oligoclonales eran menos definidas y mas difíciles de interpretar con la técnica de electroforesis de alta resolución, encontrando además que entre los resultados

negativos había una gran proporción de resultados con bandas monoclonales y entre las positivas había en promedio un número de bandas oligoclonales significativamente menor cuando eran comparadas con las bandas que en promedio aparecían cuando se usaba la técnica del isoelectroenfoco^{8,9}.

Aún mas inquietante, es que en ninguna parte del país se esta implementando la técnica sugerida para la realización de las Bandas oligoclonales y en la mayoría de centros de referencia la que se esta realizando (electroforesis de alta resolución con inmunofijación) no se esta llevando a cabo de la forma adecuada ya que solo se esta tomando muestra del LCR y no del suero concomitante con la anterior.

3. FUNDAMENTO TEÓRICO

La EM es la enfermedad neurológica más común y discapacitante en adultos jóvenes¹, en Colombia se estima una prevalencia de 1,48 a 4,98 casos por 100.000 habitantes^{2,3}. Aún se desconoce su etiología dado la gran heterogenicidad de la presentación clínica, inmunológica, inmunogénica y neuropatológica^{14,16}. Hasta el momento no existe ninguna prueba diagnóstica, ni siquiera la biopsia es totalmente específica para su diagnóstico. Los criterios para su diagnóstico permanecen vigentes desde su última actualización en el 2005⁴ donde se agrupan herramientas clínicas, imaginológicas, neurofisiológicas y de laboratorio clínico para intentar agrupar a los sospechosos en 3 grupos: EM definitiva, probable y No EM. El laboratorio clínico ha tomado gran importancia desde hace casi 3 décadas cuando Poser incluyó la valoración de la producción intratecal de anticuerpos en líquido cefalorraquídeo (LCR) como ayuda complementaria para el diagnóstico⁵, requisito que ha continuado vigente hasta la mencionada última revisión de los criterios⁴. La clásica descripción de la patología de esta enfermedad soporta con gran fuerza una posible etiología autoinmune¹⁴ y dado que la barrera hematoencefálica aísla al sistema nervioso central de un gran número de elementos existentes en la sangre periférica, incluidas las inmunoglobulinas¹⁷, se demostró que la presencia intratecal de anticuerpos tiene un gran valor predictivo negativo en el proceso del diagnóstico de esta enfermedad¹⁰, incluso en el síndrome clínico aislado donde se correlaciona con una sensibilidad del 91% y una especificidad del 94% como predictor para el desarrollo futuro de la esclerosis múltiple¹⁸.

El incremento anormal de inmunoglobulinas en el LCR puede resultar de una elevada síntesis de ellas en sangre periférica, de alteración de la barrera hematoencefálica, disminución del flujo del LCR y síntesis intratecal de anticuerpos, por tanto para diferenciar entre la síntesis intratecal de las derivadas de sangre periférica asociadas a alteración de la BHE, siempre se tiene que hacer la corrección de estas 2 condiciones para evitar la sobreestimación en sus resultados¹⁹, mas aún cuando se sabe que desde muy temprano en la enfermedad se presenta una alteración de la BHE mediada por las citoquinas resultantes del proceso fisiopatológico^{14,16}.

En la actualidad, se cuenta con 2 opciones para medir la producción intratecal de anticuerpo: la forma cuantitativa, por medio del cociente de IgG LCR/Suero y por métodos cuantitativos que son considerados actualmente como la prueba de oro⁶; ambos miden la síntesis anormal de IgG confinada al SNC.

3.1. ANALISIS CUALITATIVO DE INMUNOGLOBULINAS EN LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO

Desde 1922 ya se reconocían anormalidades en el LCR en paciente con EM, pero no fue sino hasta 1964 cuando Laterre por medio de electroforesis de proteínas describe por primera vez las bandas oligoclonales¹⁰.

La electroforesis de proteínas y el isoelectroenfoque son 2 métodos usados actualmente para la detección de las bandas oligoclonales en el líquido cefalorraquídeo. La sensibilidad reportada para el primero varía de 47% a 77%. A muestras de líquido cefalorraquídeo y suero del mismo paciente se les realiza el corrido electroforético en el mismo gel de agarosa de alta resolución y luego son sometidas a tinción para identificar las proteínas en la banda gamma. Desafortunadamente han ocurrido inconsistencias considerables en la calidad de los geles de agarosa que han sido producidos comercialmente y sumado a la baja sensibilidad de la tinción de proteínas, ha limitado notablemente la sensibilidad de esta técnica para la detección de las bandas oligoclonales¹⁰.

Por el contrario, la sensibilidad del isoelectroenfoque para la detección de las bandas oligoclonales supera el 95%. Con una mejor visualización de las bandas cuando estas aparecen dado que son más delgadas y contrastan mejor con el fondo, por lo cual es la técnica preferida para la realización de este examen actualmente¹⁰.

3.1.2. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS DE ALTA RESOLUCIÓN

La electroforesis es un método analítico – semipreparativo, en el que se separan biomoléculas, en dependencia entre otros factores de su carga y bajo la acción de un campo eléctrico, fue empleado por primera vez por *Tiselius* en el año 1937. La electroforesis es la migración de solutos iónicos bajo la

influencia de un campo eléctrico; Estas partículas migran hacia el cátodo o ánodo (electrodos - y +), en dependencia de una combinación de su carga, peso molecular y estructura tridimensional. Es de destacar que a escala analítica, los métodos electroforéticos son de alta sensibilidad, poder de resolución y versatilidad, y sirven como método de separación de mezclas complejas de ácidos nucleicos, proteínas y otras biomoléculas, donde aportan un potente criterio de pureza. Es útil además para determinar otros parámetros como peso molecular, punto isoeléctrico y número de cadenas polipeptídicas de las proteínas. La velocidad de migración (v) de la partícula es directamente proporcional al producto de su carga efectiva (q) y el gradiente de potencial eléctrico (E) e inversamente proporcional al coeficiente de fricción (f) relativo a la talla y forma de la molécula, o sea, a la resistencia que le ofrece el medio. La velocidad de migración electroforética depende de la densidad de carga de la molécula (relación carga / peso), del voltaje aplicado y de la porosidad del gel de electroforesis. La carga neta de la partícula está dada por el pH del medio y puede ser modificada por la interacción con pequeñas moléculas de iones u otras macromoléculas. De lo anterior se deduce que el pH influye sobre la velocidad de migración de las moléculas.² En el punto isoeléctrico de la biomolécula, pH al cual su carga neta es 0, esta no migra. Por debajo del punto isoeléctrico tiene carga neta positiva y migra hacia el cátodo, y por encima del punto isoeléctrico tienen carga neta negativa y migra hacia el ánodo²⁰.

3.1.2.1. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN GEL DE AGAROSA Y EL DESCUBRIMIENTO DE LAS BANDAS OLIGOCLONALES EN EL LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO

La era de la electroforesis en la neurología clínica originó permitió el descubrimiento de las bandas oligoclonales en el LCR, el desarrollo del isoelectroenfoque y otros métodos mas sensibles para que permitieron la identificación de proteínas individuales luego de la separación inicial del LCR. La nueva era de la electroforesis inició en la década de los 50s cuando el gel de agar de alta resolución fue introducido como sustrato para la separación de proteínas. Cuando muestras simultáneas de suero y LCR de pacientes con enfermedades inflamatorias como la esclerosis múltiple eran analizadas por

medio de electroforesis en gel de agar, bandas de proteínas aparecieron en la muestra del LCR, mas no así en le del suero. Basados en estos resultados se aclaró posteriormente que estas bandas representaban inmunoglobulinas G, mientras que otras que comigraban con correspondían a otras inmunoglobulinas o cadenas ligeras de las inmunoglobulinas. El término bandas oligoclonal se adoptó por la suposición que en enfermedades inflamatorias como la esclerosis múltiple un número restringido de clones de células B eran activados en el sistema nervioso central y transformados en células plasmocíticas productoras de inmunoglobulinas. El potencial diagnóstico se hizo evidente rápidamente, dado que estas bandas eran demostradas hasta en el 90% de los pacientes con esclerosis múltiple y en una significativa población de otras enfermedades inflamatorias^{7,10,21,33}.

En la década de los 70s el gel de agarosa fue introducido dando similares frecuencias de positividades de bandas oligoclonales que el de agar, pero el primero es mas fácil de manejar, es menos tóxico y se pueden montar varias parejas LCR/suero en una misma prueba. Desafortunadamente, ocurrieron problemas con la comercialización de los platos de electroforesis en gel de agarosa con diferentes calidades y tipos de estandarización, lo que impactó en la sensibilidad final de este examen con sensibilidad que se reportaba entre 45 y 77%. Por esta baja sensibilidad, el análisis de LCR en paso a ser de poco interés^{10,21}.

3.1.3. ISOELECTROENFOQUE

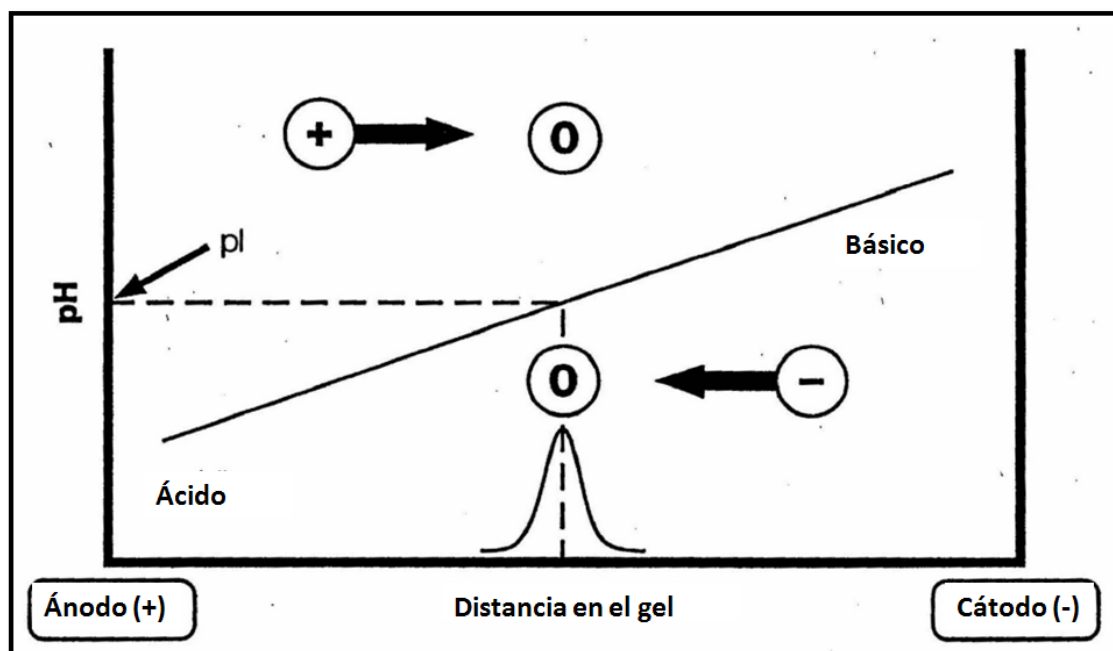
El isoelectroenfoco es un método de electroforesis en el cual las proteínas son separadas basándose en sus puntos isoeléctricos, siendo la carga neta de la proteína determinada por el pH del entorno local, por tanto tienen carga positiva, negativa o cero dependiendo del pH que las rodee²².

La carga neta de cualquier proteína es la suma de todas sus cargas negativas y positivas; esto es determinado por los lados ionizables ácidos y básicos de las cadenas de aminoácidos y sus grupos prostéticos. Si el número de grupos ácidos es mayor al de los básicos, el punto isoeléctrico estará en un valor de

pH bajo y la proteína será catalogada como ácida; lo contrario pasa si hay predominio de grupos básicos²².

Las proteínas muestran una considerable variación en sus puntos isoeléctricos, pero el valor usual cae en el rango entre 3 y 12 con la gran mayoría entre 4 y 7. Las proteínas toman carga positiva si el medio en que se encuentran tiene un valor de pH menor a su punto isoeléctrico, de esta forma cuando los valores de pH están por debajo del punto isoeléctrico de una proteína en particular, esta migrará hacia el cátodo durante la electroforesis; por el contrario, con valores por encima del punto isoeléctrico migrarán hacia el ánodo. Una proteína en un medio isoeléctrico, no migrará²².

Cuando una proteína se pone en un medio con un gradiente de pH y se somete a un campo eléctrico, inicialmente se moverá hacia el electrodo de carga opuesta. Durante la migración a través del gradiente de pH, la proteína recogerá o perderá protones y gradualmente va disminuyendo su velocidad de migración. En algún momento la proteína llegará a un pH igual al de su punto isoeléctrico y se detendrá. De esta forma, las proteínas se condensan o "focalizan" en bandas delgadas según el valor particular de su punto isoeléctrico²².



Las proteínas se aproximan a su punto isoeléctrico a velocidades variables, pero permanecen ubicados en este por tiempos prolongados, en contraste con la electroforesis convencional en la cual las proteínas se continúan moviendo por el medio hasta que el campo eléctrico es removido ²².

El gradiente de pH y el campo eléctrico aplicado van a determinar la resolución para diferenciar las bandas; así la diferencia entre 2 proteínas adyacentes va a ser directamente proporcional a la raíz cuadrada del gradiente de pH e inversamente proporcional al cuadrado del gradiente de voltaje, por tanto bajos gradientes de pH y grandes voltajes darán mayor resolución ²².

3.1.3.1. ISOELECTROENFOQUE Y BANDAS OLIGOCLONALES EN EL LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO

El isoelectroenfoque se realiza usualmente en gel de poliacrilamida o de agarosa, este último es el de elección dado que es menos tóxico, fácil de manipular y almacenar. Comparado con las diferentes variantes de la electroforesis que se han desarrollado en el tiempo, esta técnica tiene muchas ventajas. La sensibilidad en la detección de bandas oligoclonales es mucho mayor, el número de bandas detectadas por prueba es usualmente mayor de 10, mientras que en promedio solo 2 son visibles por electroforesis en la misma prueba, son mas definidas y contrastan mejor con el fondo policlonal. Independiente del medio que se utilice, el procedimiento requiere ser estandarizado. En este método no se debe concentrar el LCR dado que puede resultar pérdida de proteínas de hasta 50% en el caso de la IgG, también puede alterar las propiedades de migración de algunas proteínas. Como medida para aumentar la sensibilidad se recomendó usar esta técnica con una posterior inmunofijación. Con la implementación de estas técnicas se ha logrado un resultado sostenido de sensibilidad mayor del 90% en esta prueba para la detección de bandas oligoclonales en esclerosis múltiple, demostrado en varios estudios alrededor del mundo⁷.

En el año 2003 se publicó un artículo del Colegio Americano de Patólogos en el que se reportó que mas del 90% de 235 laboratorios realizaban la detección

de bandas oligoclonales en LCR por medio de electroforesis y menos del 10% usaban el isoelectroenfoque ^{7,21}.

3.1.4. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS DE ALTA RESOLUCIÓN Vs ISOELECTROENFOQUE

Hay publicados 2 estudios que comparan directamente estas dos técnicas para el análisis de bandas oligoclonales en el líquido cefalorraquídeo, uno de ellos comparó la sensibilidad y la especificidad del isoelectroenfoque con inmunofijación, la electroforesis de alta resolución y el índice de IgG para la detección de síntesis intratecal de inmunoglobulinas en pacientes con esclerosis múltiple y otras patologías del sistema nervioso central. En este se analizaron muestras de LCR/suero de 147 pacientes seleccionados al azar. Entre ellos, los que padecían de esclerosis múltiple cumplían los criterios de Poser. Los análisis se realizaron por el mismo médico, el cual no conocía el diagnóstico. En los resultados mostraron una para la electroforesis de proteínas, una sensibilidad de 45% y una especificidad del 97%. Para el isoelectroenfoque la sensibilidad fue de 100% y la especificidad de E: 91%⁹.

El segundo trabajo tuvo una muestra de 175 pacientes en los cuales se analizaron muestras pareadas de LCR/suero y se comparó la sensibilidad y la especificidad de la electroforesis de proteínas de alta resolución, el isoelectroenfoque y el índice cuantitativo de IgG, en paciente con diagnóstico de esclerosis múltiple de acuerdo a los criterios de Poser que eran vigentes en ese tiempo con la clasificación de esclerosis múltiple probable y posible, los cuales se compararon con pacientes con otras enfermedades neurológicas de carácter inflamatorio y otro grupo con patología neurológica no inflamatoria. Todas las pruebas se corrían en el mismo día en cada paciente y dos técnicos independientes revisaban los resultados, un tercero resolvía la diferencia si hubiese. Los resultados mostraron que en el isoelectroenfoque las bandas oligoclonales eran más definidas y fáciles de identificar. De las 31 pruebas que se realizaron con bandas oligoclonales negativas, con la electroforesis 19 tenían banda monoclonal (solo una banda) y con el isoelectroenfoque de todas las negativas, ninguna tenía bandas monoclonales. Entre las 20 pruebas positivas con la electroforesis había un promedio de 2 bandas y con el

isoelectroenfoco 8 bandas. Lo que daba una sensibilidad de 60%, con una especificidad de 96% para la electroforesis, contrastando con la sensibilidad de 90% y especificidad de 94% para el isoelectroenfoco⁸.

3.2. PAPEL DE LAS BANDAS OLIGOCLONALES EN LOS NUEVOS CRITERIOS DIAGNÓSTICOS PARA LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

En el 2001, el Panel Internacional para el Diagnóstico de la Esclerosis Múltiple presentó unos nuevos criterios para el diagnóstico de esta enfermedad, que han sido conocidos como los criterios de “McDonald”. Con estos criterios se intentó presentar un esquema diagnóstico que pudiera ser mas confiable, con mayor detección de casos en etapas tempranas y con menos falsos positivos. En el 2005 se reunieron nuevamente y actualizaron los criterios de McDonald con el fin de minimizar el riesgo de falsos negativos, pero mantener un alto nivel de especificidad. Como los anteriores, se usan criterios clínicos y paraclínicos, con información final que resulta en Esclerosis Múltiple, Esclerosis Múltiple posible y no Esclerosis múltiple. Usa los test paraclínicos para mejorar la especificidad de los otros paraclínicos, tomando estos gran importancia cuando existe grandes dudas clínicas, por tanto, si estos son normales, sugiere con gran fuerza un diagnóstico alternativo, mientras si son anormales, soportan el diagnóstico primario⁶. Desde 1983 con Poser se introdujeron las bandas oligoclonales del LCR entre la batería de paraclínicos coadyuvantes para el diagnóstico de esta enfermedad⁵. En los actuales continúan siendo considerados dado que incrementa la sensibilidad en el diagnóstico, a pesar de su baja especificidad. Por tanto, en estos se anota que si el resultado de bandas oligoclonales en el LCR es negativo, se tiene que tener un extremo cuidado antes de hacer el diagnóstico de esta patología e incluso se debe considerar otra patología. Como método para realizar este examen se recomienda el isoelectroenfoco y anotan como un examen positivo a la aparición de bandas que están presentes en el LCR pero no en el suero.

Además de importancia en cuanto a sensibilidad y valor predictivo negativo de esta prueba, se adiciona como requisito para disminuir el número necesario de lesiones en la resonancia magnética de 9 a solo 2 para cumplir en criterio de

diseminación en el espacio necesario para el diagnóstico de la esclerosis múltiple tipo recaída remisión que aporta el 85% de los casos. Además se incluyó también en 1 de los 4 criterios que para el diagnóstico del subtipo primaria progresiva (con 2 de 4 se hace este diagnóstico).

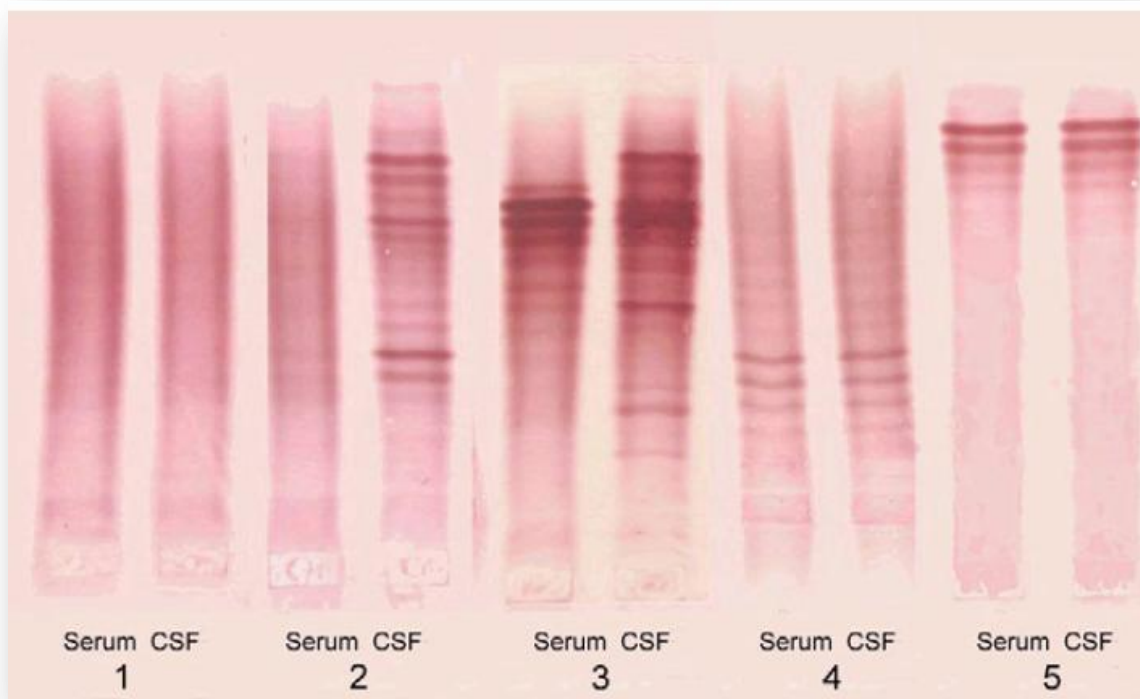
Por anterior queda claro que las bandas oligoclonales juegan un papel importante en el proceso diagnóstico de la esclerosis múltiple, ayudando a detectar a aquellos pacientes que probablemente tienen la enfermedad y además, ayudan a un diagnóstico mas temprano por disminuir el número de lesiones requeridas para cumplir uno de los criterios fundamentales, como lo es el lesiones con diseminación en el espacio.

3.3. RECOMENDACIONES PARA EL ANÁLISIS DEL LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO EN ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Como respuesta a la publicación de los criterios de McDonald en el 2005, un panel de expertos publicó las recomendaciones para la toma de las bandas oligoclonales en el LCR, dado que no quedo anotado de forma explícita cual debería ser el método óptimo, la forma de realizarlo e interpretarlo⁶.

Hay un completo acuerdo que el isoelectroenfoque en gel de agarosa seguido de inmunofijación debe ser la “Prueba de Oro” para la detección de las bandas oligoclonales en el LCR. Los otros métodos dado su variación y baja sensibilidad no fueron recomendados en este consenso⁶.

Para homogeneizar los reportes de los resultados de esta prueba se propuso en consenso como deben ir reportados resultados: **Patrón tipo 1:** Normal, con respuesta policlonal en suero y en el LCR; **patrón tipo 2 (anormal):** Típica respuesta oligoclonal (mas de 2 bandas de IgG) en LCR y normal (policlonal) en suero; **patrón tipo 3 (anormal):** respuesta oligoclonal en suero y LCR pero a diferentes alturas y el número de bandas en el LCR en mayor (>2) al del suero. **Patrón tipo 4:** respuesta oligoclonal en suero y líquido idéntico, “Patrón en espejo”. **Patrón tipo 5:** 3 a 5 bandas espaciadas regularmente cerca al cátodo, típica de paraproteínas⁶.



23. *Clin Neurol Neurosurg* 111 (2009) 313–318

Se anotaron explícitamente las recomendaciones⁶:

1. El análisis cuantitativo es el mejor método para valorar la IgG en LCR y el isoelectroenfoque debería ser la Prueba de Oro.
2. Se debe usar LCR no concentrado y se debe comparar con suero del paciente. Hay que correr las muestras simultáneamente en el mismo ensayo en filas adyacentes.
3. La prueba óptima debe usar cantidades similares de IgG del suero y del LCR.
4. Debe haber controles negativos y positivos para cada muestra. Rechazar si el positivo es tenue o el negativo es fuerte.
5. Los **reportes** se deben realizar en términos de los **5 patrones**.
6. El estudio debe ser interpretado por persona experimentada.
7. Se debe interpretar integralmente todos los parámetros del LCR.

8. En algunos casos, la evaluación de cadenas ligeras por inmunodetección puede ayudar a resolver casos dudosos de bandas oligoclonales.
9. Se debe considerar repetir la punción lumbar si hay alta sospecha de Esclerosis múltiple y hay bandas oligoclonales negativas o respuesta monoclonal.
10. El análisis cuantitativo IgG es prueba complementaria pero no sustituye el cualitativo.
11. Los laboratorios deben asegurar control de calidad interno y externo.

4. IDENTIFICACIÓN Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Si bien, la esclerosis múltiple es una enfermedad de baja prevalencia en nuestro territorio^{2,3}, es la enfermedad neurológica que genera la mayor discapacidad en personas jóvenes dado su pico de aparición a temprana edad, que genera un trastorno crónico caracterizado por un deterioro clínico gradual tanto físico, cognitivo, familiar y social, además de acarrear costos importantes para su manejo integral. Desde 1983⁵ se han realizado continuamente grandes esfuerzos para tratar de simplificar su diagnóstico para intentar intervenirla en etapas tempranas y de esta forma disminuir la progresión manifestada en discapacidad acumulada. El diagnóstico de la enfermedad se hace basado en la clínica, dado que no existe ninguna exploración complementaria cuyo resultado sea patognomónico; sin embargo se han incluido ayudas paraclínicas como la resonancia Magnética y el estudio del líquido cefalorraquídeo en búsqueda de bandas oligoclonales, como herramientas de gran ayuda para diagnóstico temprano de la enfermedad⁴, siendo estas últimas, mas sensibles como predictoras de conversión a esclerosis múltiple definitiva cuando salen positivas en las etapas iniciales de la enfermedad^{24,25,26}. Sumado a esto, se ha demostrado la importancia de las bandas oligoclonales por el gran valor predictivo negativo de este examen, que puede facilitar y orientar al médico en el proceso diagnóstico de esta patología¹⁰. La técnica correcta (isoelectroenfoque) para la identificación de estas bandas oligoclonales ya ha sido ampliamente descrita y estudiada, sin embargo, en Colombia e incluyendo nuestro Hospital, no se cuenta con el recurso tecnológico para realizarla, por lo que se han usado técnicas alternativas que igualmente han demostrado ser de utilidad, pero con un grado de eficiencia significativamente menor al del recomendado por el panel internacional.

En nuestro hospital contamos con una población de pacientes de esclerosis múltiple definitiva, pero desconocemos en ellos como se ha comportado el resultado de las bandas oligoclonales como grupo, por tanto surge la pregunta:

¿La proporción de pacientes con esclerosis múltiple y bandas oligoclonales positivas del Hospital Militar Central es comparable con lo reportado en la literatura mundial cuando se emplean la técnica de medición usual de nuestro laboratorio?

5. JUSTIFICACIÓN

Como se ha mencionado ampliamente en este escrito, la Esclerosis múltiple es una enfermedad de alto impacto en nuestros pacientes por la discapacidad que va a generar en ellos con el transcurso del tiempo generado por la alteración en su calidad de vida^{27,28,29}, deterioro laboral, social y en últimas, también para el sistema de salud dada la inversión que implica tratar esta enfermedad con medicamentos biológicos modificadores de la enfermedad de alto costo, sus recaídas y su rehabilitación.

Hasta el momento queda claro que esta patología es de etiología autoinmune con secuelas neurodegenerativas^{4,16,17}, presentando su mayor proceso inflamatorio en las fases iniciales que dan como primera manifestación, una recaída clínica. Por tanto, en estas fases iniciales es donde se puede realmente impactar en el pronóstico de la enfermedad, porque si se puede lograr modular la inflamación cuando hay gran proporción de parénquima cerebral sano, se evitará por medio de medicamento modulares de la enfermedad que la esclerosis múltiple progrese de forma natural y así se puede lograr impactar el resultado final en cuestiones de pronóstico clínico.

En el momento no existe un método totalmente definitivo que determine con precisión aquellos pacientes que padecen la enfermedad; se cuenta por el contrario con una batería de herramientas clínicas, paraclínicas e imagenológicas, todas ellas contempladas en los criterios actuales para el diagnóstico de esta enfermedad⁴. Uno de ellos, son las bandas oligoclonales del líquido cefalorraquídeo, incluidos desde 1983⁵ en el proceso diagnóstico para esta patología; gradualmente fue evolucionando la técnica con la que se determinaban, llegando a desarrollar la conocida como isoelectroenfoque³⁰ con la que se lograron resultados muy alentadores dado que se pudo obtener una técnica de tamización casi ideal con estudios que muestran una sensibilidad en promedio superior al 90%, con un elevado valor predictivo negativo para la detección de las bandas oligoclonales^{31,32}, con las implicaciones que esto trae para el algoritmo diagnóstico.

En nuestro hospital no se cuenta con esta técnica, por lo cual se cree pertinente tratar de determinar como es el comportamiento del resultado

obtenido de las bandas oligoclonales en nuestro pacientes por la técnica que se esta implementando actualmente en nuestro laboratorio de inmunología y a partir de allí, desarrollar un nuevo protocolo donde se garantice la mayor calidad posible para la determinación de este examen, además de caracterizar nuestra población de pacientes con respecto a este resultado.

Con lo anterior se ayudará a detectar con mejor exactitud y oportunidad a los pacientes con patología sospechosa de esclerosis múltiple en nuestra población de las Fuerzas Militares.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Describir el comportamiento del resultado de las bandas Oligoclonales en el LCR, en pacientes con Esclerosis Múltiple diagnosticados en el Hospital Militar Central de Bogotá.

6.2. Objetivos específicos

1. Describir las características demográficas de los pacientes con Esclerosis Múltiple del Hospital Militar Central.
2. Determinar la proporción de pacientes con Bandas oligoclonales positivas entre los pacientes con esclerosis múltiple del Hospital Militar Central.
3. Comparar la proporción de pacientes con Bandas oligoclonales positivas de hombres con las mujeres.
4. Determinar el número de pacientes con diagnóstico de esclerosis múltiple según fuerza.

7. METODOLOGÍA

7.1. Tipo de estudio

Se realizó un estudio observacional descriptivo tipo serie de casos.

7.2. Población y muestra

- **Población**: Usuarios del HMC.
- **Muestra**: Pacientes con EM definitiva en tratamiento actualmente en el HMC.
- **Unidad de análisis**: Pacientes que cumplan criterios de inclusión

7.3. Criterios de inclusión y exclusión

- Todos presentados en junta médica de neurología.
- Con estudios de imágenes y bandas oligoclonales.
- Cumplen criterios de McDonald 2005.

7.4. Variables

	DIMENSIÓN	DESCRIPCIÓN	CLASIFICACIÓN	ESCALA
VARIABLES A ESTUDIO	Género	Género del paciente	Cualitativa nominal	a.Femenino b.Masculino
	Edad	Edad que tiene el paciente	Cuantitativa continua	Edad en años del paciente
	Fuerza	Fuerza a la que pertenece el paciente	cualitativa nominal	a. Ejercito b. Fuerza aérea c. Armada d. Hospital Militar Otros
	Bandas oligoclonales	Resultado de las Bandas oligoclonales en el líquido cefalorraquídeo	cualitativa nominal dicotómica	a.BOC positivas b. BOC negativas

7.5. Recolección de datos

- El resultado de las bandas oligoclonales en LCR se extrajo de las bases de datos del laboratorio de inmunología y de la revisión de la historia clínica.
- Periodo de recolección abarca 1995 a junio del 2010.

8. PLAN DE ANÁLISIS

- Las variables cualitativas se analizarán en formas de frecuencias absolutas.
- Las variables cuantitativas se analizaran con medidas de tendencia central y dispersión.
- Se usará para el análisis estadístico el programa SPSS-18 (licencia: Universidad El Bosque).

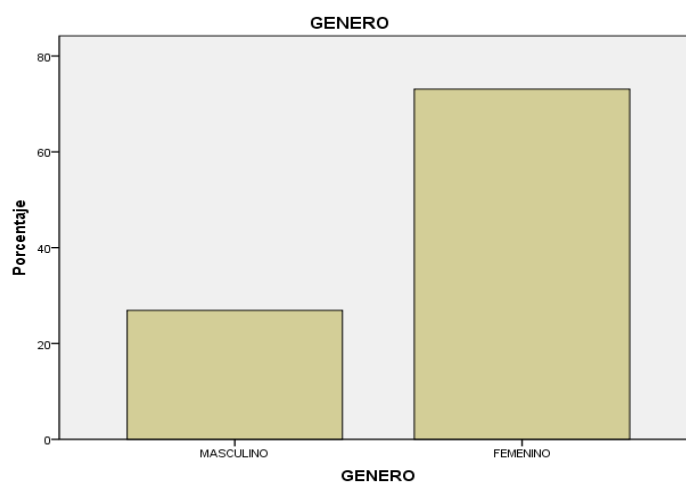
9. RESULTADOS

- Entre la población de usuarios del HMC hay 26 pacientes con EM definitiva.
- La media de edad fue 43 años.
 - Rango entre 29 y 62 años, con desviación estándar típica de 8,542.

Estadísticos descriptivos					
	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
EDAD	26	29	62	43,00	8,542

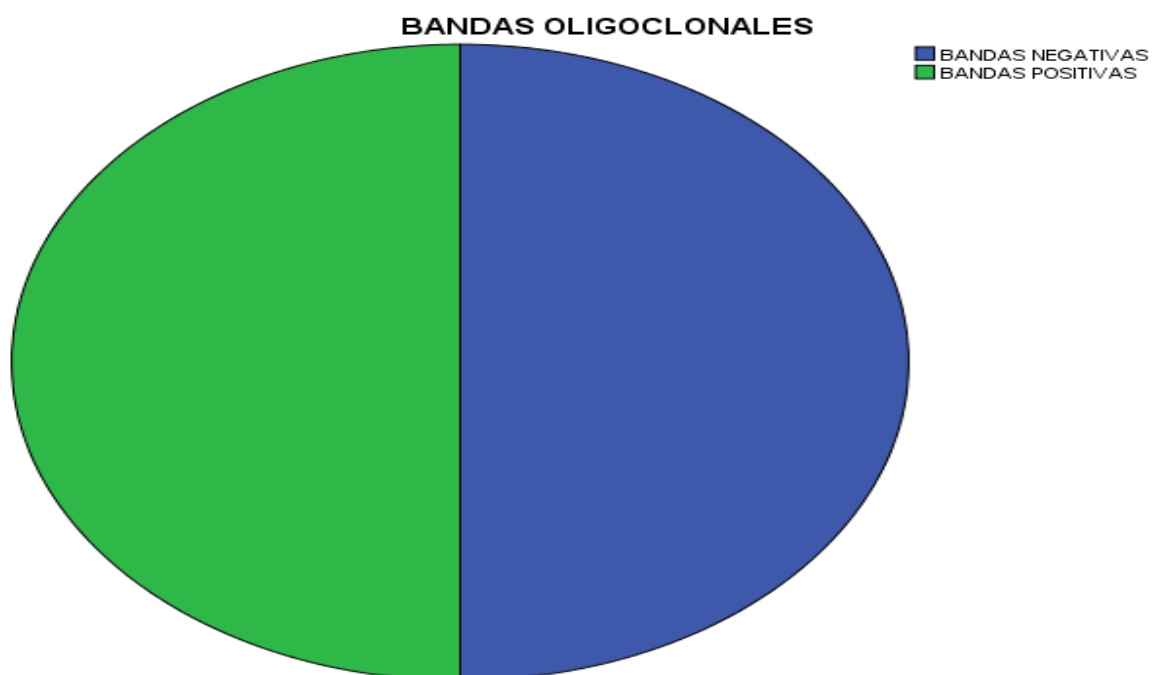
- El 75.1% (19) eran del género femenino y el 26.9% (7) del masculino:
 - Con un índice de feminización de 2,71:1.

GENERO				
	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
MASCULINO	7	26,9	26,9	26,9
FEMENINO	19	73,1	73,1	100,0
Total	26	100,0	100,0	



- El 50% (13) de los pacientes tiene bandas oligoclonales positivas y el 50% (13) tienen bandas oligoclonales negativas.

BANDAS OLIGOCLONALES				
	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
BANDAS NEGATIVAS	13	50,0	50,0	50,0
BANDAS POSITIVAS	13	50,0	50,0	100,0
Total	26	100,0	100,0	



- El 57,9% (11/19) de las Mujeres tuvieron bandas oligoclonales positivas y el 28,6% (2/7) de los Hombres tuvieron bandas oligoclonales positivas.

Tabla de contingencia GENERO * BANDAS OLIGOCLONALES				
		BANDAS OLIGOCLONALES		Total
		Bandas negativas	Bandas positivas	
GENERO	Masculino	5	2	7
	Femenino	8	11	19
TOTAL		13	13	26

- El 76,9% de los paciente pertenecían al Ejército, el 11,5% a la fuerza aérea, el 3,8% a la Armada y el 3,8% al Hospital Militar Central.

REGIMEN ADMINISTRADOR				
		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido
Válidos	EJC	20	76,9	76,9
	FAC	3	11,5	11,5
	HMC	1	3,8	3,8
	ARC	1	3,8	3,8
	OTRA	1	3,8	3,8
	Total	26	100,0	100,0

10. CONCLUSIONES

El presente estudio descriptivo es el primero de su clase en el Hospital Militar Central, en el cual se logra una caracterización gruesa de la población y se obtienen resultados acordes a los objetivos planteados al inicio del trabajo.

Se muestra claramente que la población de paciente con esclerosis múltiple de este Hospital es similar a la descrita en la literatura en cuanto a las variables del género, dado que hay una predominancia del género femenino, en esta serie de 2,71 mujeres por cada hombre lo que es comparable con los resultados de otros estudios epidemiológicos en nuestro país. Igualmente el rango de edad de nuestros pacientes se corresponde con lo reportado, reiterando y mostrando que en nuestros usuarios del Hospital Militar Central los afectados continúan siendo gente en edades productivas, ubicándose el de mayor edad en los 62 años. Por tanto, se cumple que es la enfermedad neurológica más discapacitante en adultos jóvenes, con el impacto personal y social que ello conlleva.

Como era de esperarse, se obtuvo un número notablemente mayor de personas con esta enfermedad en el Ejército con respecto a las otras dado el mayor número de usuarios con que cuenta esta fuerza, cifra que debe ser tomada en cuenta en el momento de realizar los presupuestos para el manejo multidisciplinario de esta enfermedad.

Con respecto al resultado de la bandas oligoclonales se obtuvo un resultado similar a lo reportado en la literatura mundial, con un porcentaje de resultados positivo igual al de los negativos en una población considerable comparada con los estudio publicados en la literatura. Hay que anotar claramente, que en este punto se abre un gran campo de discusión, ya que en nuestro Hospital se estaba realizando de una forma errónea este examen. Por el contrario a lo recomendado en la literatura, solo se analizaron muestras del líquido cefalorraquídeo, sin ser comparadas simultáneamente con el suero, lo que últimas no permitiría diferenciar si las bandas obtenidas como positivas, son realmente positivas, dado que si estas también se encontraran en la muestra del suero, no se considerarían como positivas. Por tanto, quizás algunos de nuestros resultados positivos, no lo sean. Por otro lado, ninguno de los

resultados estaba reportado en alguno de los 5 patrones recomendados por la literatura mundial como medida de unificación de criterios. Estas prácticas erróneas generadas por el desconocimiento del tema mostraron ser una constante en nuestro medio local, por parte de todo el equipo terapéutico encargado de esta patología.

Un hallazgo llamativo, fue que se encontró un porcentaje mayor de resultados de bandas oligoclonales positivas en los pacientes de género femenino con respecto al masculino, sin embargo este hallazgo carecería de importancia al implementar la técnica ideal en la obtendría según lo reportado por su sensibilidad igual número de pruebas positivas en hombre y en mujeres dado que casi todos los que van a tener la enfermedad contarán con esta prueba positiva.

Estos resultados están acordes con que la electroforesis de proteínas de alta resolución en gel de agarosa es una prueba de baja sensibilidad para la detección de bandas oligoclonales en el líquido cefalorraquídeo, por tanto se interroga el valor de los resultados por medio de esta prueba, dado los costos que implica y la poca información que nos estará aportando, ya que todos los resultados negativos serán cuestionados, siendo ellos donde radica la mayor importancia de esta prueba cuando es adecuadamente realizada.

Hay que aclarar que en nuestro país no se tiene la tecnología disponible para realizar este examen según las normas requeridas internacionalmente, ya que ningún laboratorio cuenta con el equipo de isoelectroenfoque.

11. DISCUSIÓN

La búsqueda de bandas oligoclonales en el líquido cefalorraquídeo continua siendo una herramienta útil en el proceso diagnóstico de la esclerosis múltiple, en la ayuda de detección de pacientes con sospecha de esta enfermedad y para diagnosticarla de forma mas temprana en aquellos que la van a padecer.

Con los resultados de este estudio se demuestra que se tienen que hacer todos los esfuerzos para tratar de estandarizar la técnica de detección de bandas oligoclonales, usando la técnica de isoelectroenfoque de alta sensibilidad y no otras técnicas de análisis cualitativo que ya están en desuso como es la electroforesis de alta resolución.

Se resalta además la importancia de la toma concomitante de una muestra de suero del paciente, que se debe analizar simultáneamente con la del líquido cefalorraquídeo y además montar en el mismo gel para obtener los resultados idóneos.

El interés en este tema de los autores de este estudio motivó a la compra del equipo de isoelectroenfoque en el Hospital Militar Central, hasta el momento único en el país. En el momento se están realizando las pruebas de estandarización y pronto estará en funcionamiento con un nuevo protocolo ajustado a las normas internacionales.

Se espera en un futuro continuar estudiando el comportamiento del resultado de las bandas oligoclonales en el líquido cefalorraquídeo en paciente con esclerosis múltiple con este nuevo instrumento, el cual tendrá como base para la comparación de datos este estudio.

Se espera además que se motiven otras instituciones para la adquisición de este equipo, para ofrecerles a los pacientes con sospecha de esclerosis múltiple una herramienta de real ayuda para su proceso diagnóstico.

13. PRESUPUESTO

Recursos		Cantidad	Costo	Total
Humanos	Investigador (residente cuarto año)	1	2000000	2000000
	Investigador (residente primer año)	1	2000000	2000000
	Asesor temático	1	1500000	1500000
	Asesor metodológico	1	1500000	1500000
Subtotal				7000000
Equipos y software	Computador portátil	2	3000000	3000000
	Computador de escritorio	1	1500000	1500000
	Paquete estadístico spss	1	3000000	3000000
Papelería	Fotocopias	100	5000	5000
Subtotal				7505000
Total				14505000

14. ASPECTOS ÉTICOS

El proyecto de investigación planteado en este protocolo seguirá las normas estipuladas en la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Protección social. Según el artículo 11 de esta resolución, la investigación en curso es considerada una investigación “sin riesgo”, no se realizará ninguna intervención o modificación intencionada de las variables biológicas, fisiológicas, psicológicas o sociales de los individuos que participan en el estudio, no se tendrá contacto directo con los pacientes, únicamente se hará revisión de bases de datos.

15. DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Los autores de este protocolo, Sergio Cabrera Limpas identificado con c.c. 71.371.800 de Medellín, residente del programa de Neurología de la Universidad Militar Nueva Granada y Juan Carlos González identificado con c.c. 7.180.722 de Tunja, residente del programa de Neurología de la Universidad Militar Nueva Granada, declaran que para la realización de este trabajo, no se encuentran influenciados, patrocinados por ninguna empresa pública o privada y no presentan ningún tipo de conflicto de interés.

Declaran bajo gravedad de juramento que la propuesta planteada en el proyecto, así como su desarrollo son totalmente originales, planeados y desarrollados por los investigadores.

16. BIBLIOGRAFÍA

1. Burton JM, O'Conor P. Multiple Sclerosis clinical trial design and analysis. *Continuum Life long Learning Neurology* 2008, Dec.10 (6)173-196.
2. Sanchez JL, Aguirre C, Arcos OM, Jimenez I, Jimenez M, León F, et al. Prevalencia de la esclerosis múltiple en Colombia. *Revista de Neurología*.2000;31(12):1101-1103
3. Toro J, Sarmiento O, Castillo A, Satizábal CL, Ramírez JD, Montenegro AC, et al. Prevalence of Multiple Sclerosis in Bogotá, Colombia. *Neuroepidemiology* 2007;28:33-38
4. PolmanCH, 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;58:840–846
5. 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 Mar;13(3):227-31.
6. Freedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F, Giovannoni G, Grimsley G, Keir G, et al. Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement. *Arch Neurol*. 2005;62(6):865-70.
7. Link H, Huang YM. Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness. *J Neuroimmunol*. 2006;180(1-2):17-28.
8. Fortini AS, Sanders EL, Weinshenker BG, Katzmann JA. Cerebrospinal fluid oligoclonal bands in the diagnosis of multiple sclerosis. Isoelectric focusing with IgG immunoblotting compared with high-resolution agarose gel electrophoresis and cerebrospinal fluid IgG index. *Am J Clin Pathol*. 2003 Nov;120(5):672-5.
9. Lunding J, Midgard R, Vedeler CA. Oligoclonal bands in cerebrospinal Fluid: a comparative study of isoelectric focusing, agarose gel electrophoresis and IgG index. *Acta Neurol Scand* 2000: 102: 322-325
10. Awad A, Hemmer B, Hartung HP, Kieseier B, Bennett JL, Stuve O. Analyses of cerebrospinal fluid in the diagnosis and monitoring of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2010;219(1-2):1-7.
11. Kalman B, Brannagan TH. *Neuroimmunology in Clinical Practice*. Blackwell Publishing. Oxford, 2008. Part II. 29-82.

12. Ropper AH, Brown RH. Adams and Victor's, Principles of Neurology. The McGraw-Hill Companies. United States of America. Part 4 (36), 771-796.
13. Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology*. 1996;46(4): 907-11.
14. Barr-Or A. The immunology of Multiple Sclerosis. *Seminars in Neurology*. 2008; 28(1) 29-43.
15. Álvarez JC, Arroyo R, Arbizu T, Andrés C, Blasco R, Casanova B, Guía oficial para el diagnóstico y tratamiento de la esclerosis múltiple. Barcelona- España. Prous Science, S.A., 2007. 1-103.
16. John W. Rose, Noel G. Carlson, Pathogenesis of multiple sclerosis. *Continuum Lifelong Learning Neurol* 2007;13(5):35–62.
17. Pachter, Joel S; De Vries, Helgae E.; Fabry, Zsuzsa, The Blood-Brain Barrier and Its Role in Immune Privilege in the Central Nervous System. *J of Neuropathology & Experimental Neurology*. 62(6):593-604, June 2003.
18. Masjuan J, Alvarez JC, Garcia N, Díaz M, Espiño M, Sábada NC, et al. A new oligoclonal band test accurately predicts conversión to MS. *Neurology*. 2006; 66(4) 576-8.
19. Correale J, de los Milagros Bassani Molinas M. Oligoclonal bands and antibody responses in multiple sclerosis. *J Neurol*. 2002;249(4):375-89.
20. García HM. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Univ Diag* 2000; 1 (2): 31-41.
21. Keren DF. Optimizing detection of oligoclonal bands in cerebrospinal fluid by use of isoelectric focusing with IgG immunoblotting. *Am J Clin Pathol* 2003; 120:649-651.
22. Garfin DE. Essential cell biology, ectrophoresis of proteins. Oxford University Press, Oxford UK, 2003. Vol 1, 197-268.
23. Regeniter A, Kuhle J, Mehling M, Moller H, Wurster U, Freidank H. A modern approach to CSF analysis: Pathophysiology, clinical application, proof of concept and laboratory reporting. *Clinical Neurology and Neurosurgery*; 2009 (111): 313–318.

24. Masjuan J, Alvarez JC, Garcia N, Diaz M, Espiño M, Sábada MC. Clinically isolated syndromes: a new oligoclonal band test accurately predicts conversion to MS. *Neurology*. 2006; 66(4):576-8.
25. Zipoli V, Hakiki B, Portaccio E, Lolli F, Siracusa G, Giannini M, et al. The contribution of cerebrospinal fluid oligoclonal bands to the early diagnosis of multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2009;15(4):472-8.
26. Villar LM, García N, Sábada MC, Espiño M, Gómez-Rial J, Martínez J. Accuracy of CSF and MRI criteria for dissemination in space in the diagnosis of multiple sclerosis. *J Neurol Sci*. 2008;266(1-2):34-7.
27. Schwid SR. Symptomatic management of multiple sclerosis. *Continuum Lifelong Learning Neurology*; 13 (5). 181-197.
28. Confavreux C, Aimard G, Devic M. Course and prognosis of multiple sclerosis assessed by the computerized data processing of 349 patients. *Brain*. 1980;103(2):281-300
29. Confavreux C, Vukusic S, Adeleine P. Early clinical predictors and progression of irreversible disability in multiple sclerosis: an amnesic process. *Brain*; 2003; 126:770-782.
30. Hosein ZZ, Johnson KP. Isoelectric focusing of cerebrospinal fluid proteins in the diagnosis of multiple sclerosis. *Neurology*. 1981;31(1):70-6.
31. Kostulas VK, Link H, Lefvert AK. Oligoclonal IgG bands in cerebrospinal fluid. Principles for demonstration and interpretation based on findings in 1114 neurological patients. *Arch Neurol*. 1987;44(10):1041-4.
32. 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;113:1269-89.
33. Johnson KP, Arrigo SC, Nelson BJ, Ginsberg A. Agarose electrophoresis of cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. A simplified method for demonstrating cerebrospinal fluid oligoclonal immunoglobulin bands. *Neurology*. 1977;27(3):273-7.