

VIROTECH Liquor/CSF Standards

Borrelia + VlsE IgG Liquor/CSF Standards Referencia: EC022L60

Borrelia IgM Liquor/CSF Standards Referencia: EC022L80

CMV IgG Liquor/CSF Standards Referencia: EC113L60*

EBV IgG Liquor/CSF Standards Referencia: EC102L60

FSME/TBE IgG Liquor/CSF Standards Referencia: EC117L60

FSME/TBE IgM Liquor/CSF Standards Referencia: EC117L80

HSV 1 (gG1) IgG Liquor/CSF Standards Referencia: EC130L60

HSV 2 (gG2) IgG Liquor/CSF Standards Referencia: EC131L60

HSV Screen IgG Liquor/CSF Standards Referencia: EC108L60

Masern/Measles IgG Liquor/CSF Standards Referencia: EC105L60

Mumps IgG Liquor/CSF Standards Referencia: EC106L60

Rubella IgG Liquor/CSF Standards Referencia: EC109L60

VZV IgG Liquor/CSF Standards Referencia: EC110L60

VZV IgA Liquor/CSF Standards Referencia: EC110L40

Por favor tenga en cuenta asimismo nuestro diagnóstico del líquido cefalorraquídeo con instrucciones de trabajo separadas para Rubella IgG EC 109L00

EXCLUSIVAMENTE PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO

**Virotech Diagnostics GmbH
Waldstrasse 23 A2
63128 Dietzenbach, Germany**

**Tel.: +49(0)6074-23698-0
Fax.: +49(0)6074-23698-900
www.goldstandarddiagnostics.com**



*



0483

Índice

1. Finalidad de la prueba	3
2. Principio de la prueba	3
3. Contenido	3
4. Conservación y plazo de caducidad del kit de ensayo y de los reactivos listos para utilizar	3
5. Medidas de precaución y advertencias	4
6. Realización de la prueba	4
6.1 Material de muestra	4
6.2 Preparación de los reactivos	4
6.3 Realización de la prueba ELISA de VIROTECH	5
6.4 Empleo de procesadores ELISA	5
7. Valoración del ensayo	6
7.1 Control del funcionamiento del ensayo:	6
7.2 Valoración	6
7.3 Cálculo del índice de anticuerpos AI (con ejemplo)	6
7.4 Interpretación	8
7.5 Limitaciones del ensayo	9
8. Literatura	9
9. Esquema de la realización de la prueba	10

1. Finalidad de la prueba

Los patrones para líquido cefalorraquídeo sirven para elaborar una curva de calibración empleada para determinar una síntesis de anticuerpos propia del SNC mediante análisis paralelo de parejas de suero y líquido cefalorraquídeo. Se obtiene el cociente entre líquido cefalorraquídeo y suero específico para cada patógeno. La proporción entre este cociente de anticuerpos específico para ese patógeno y el cociente total de inmunoglobulinas se denomina índice de anticuerpos (siglas en inglés AI).

2. Principio de la prueba

El anticuerpo buscado en el suero humano y el líquido cefalorraquídeo forma un complejo inmune con el antígeno fijado en la placa de microtitulación. Las inmunoglobulinas no ligadas son eliminadas mediante procesos de lavado. El conjugado enzimático se liga al citado complejo. Las inmunoglobulinas no ligadas son de nuevo eliminadas mediante procesos de lavado. Tras la adición de la solución de sustrato (TMB), la actividad enzimática (peroxidasa) da lugar a un pigmento azul, que adopta un color amarillo después de añadir la solución de paro.

La extinción (densidad óptica, DO) de la solución teñida es directamente proporcional a la concentración del anticuerpo IgG, IgM o IgA específico del patógeno en cuestión en el suero y el líquido cefalorraquídeo. Para determinar la síntesis de anticuerpos propia del SNC es necesario cuantificar las concentraciones medidas, para las que inicialmente sólo se dispone de valores de extinción. Para este fin sirven las series de sueros patrón con concentraciones escalonadas de anticuerpos específicos contra determinados antígenos, a partir de los cuales es posible elaborar manualmente o mediante los programas adecuados una curva de referencia que permite transformar los valores de DO obtenidos en unidades de medida arbitrarias (UMA) adimensionales. Comparando las unidades UMA determinadas con las concentraciones totales de IgG, IgM e IgA en suero y líquido cefalorraquídeo determinadas nefelométricamente se determina el llamado índice de anticuerpos (siglas inglesas AI) (véase también el cálculo del AI en el punto 7.3). Este índice de anticuerpos indica el cocientes de anticuerpos específico para el patógeno buscado como múltiplo o fracción del correspondiente cociente total de inmunoglobulinas. Por lo tanto, el valor es independiente del estado de la función de barrera cerebral de cada individuo. El índice de anticuerpos permite deducir la existencia y grado de una síntesis propia de anticuerpos específicos contra patógenos determinados por parte del SNC. Este procedimiento no es aplicable en caso de síntesis inmunoglobulínica intratecal poliespecífica, ya que en ese caso el cociente de IgX total ya no es adecuado como parámetro umbral y debe ser sustituido por el llamado valor límite (véase el cálculo del límite en el punto 7.3.4 B).

3. Contenido

Patrones para la cuantificación de las concentraciones de anticuerpos específicos contra patógenos determinados, 4 frascos con 1000 µl cada uno, suero humano con estabilizadores de proteínas y conservante, listos para usar, 100UMA 25UMA; 6,2UMA; 1,5UMA (UMA = unidades de medición arbitrarias).

4. Conservación y plazo de caducidad del kit de ensayo y de los reactivos listos para utilizar

Conserve el kit de ensayo a 2-8°C. El plazo de caducidad de cada componente figura en la correspondiente etiqueta; el plazo de caducidad del kit puede consultarse en el certificado de control de calidad.

- Una vez separados los pocillos individuales necesarios conserve los restantes pocillos / tiras en la bolsa cerrada con desecante a una temperatura de 2-8°C. Los reactivos deben volverse a guardar a 2-8°C inmediatamente después de su uso.
- El conjugado listo para utilizar y la solución de sustrato TMB son fotosensibles y deben conservarse en la oscuridad. Si la solución de sustrato se tiñe por efecto de la luz, debe desecharse.
- Extraiga únicamente la cantidad de conjugado listo para utilizar o de TMB necesaria para la prueba. El exceso de conjugado o TMB extraído no debe devolverse, sino que debe ser desechado.

Material	Estado	Almacenamiento	Durabilidad
Muestras de análisis	diluidas	de +2 hasta +8°C	máx. 6h
	sin diluir	de +2 hasta +8°C	1 semana
Controles	tras la apertura	de +2 hasta +8°C	3 meses

Placa de microtitulación	tras la apertura	de +2 hasta +8° (almacenamiento en la bolsa suministrada con bolsita de secante)	3 meses
RF-SorboTech	sin diluir, tras la apertura	de +2 hasta +8°C	3 meses
	diluido	de +2 hasta +8°C	1 semana
Conjugado	tras la apertura	de +2 hasta +8°C (protegido contra la luz)	3 meses
Tetrametilbencidina (TMB)	tras la apertura	de +2 hasta +8°C (protegido contra la luz)	3 meses
Tampón de dilución PBS, azul	tras la apertura	de +2 hasta +8°C	3 meses
Solución de parada	tras la apertura	de +2 hasta +8°C	3 meses
Solución de lavado	tras la apertura	de +2 hasta +8°C	3 meses
	dilución final (lista para el uso)	de +2 hasta +25°C	4 semanas

5. Medidas de precaución y advertencias

1. Como patrones sólo deben utilizarse sueros que hayan dado resultado negativo en las pruebas de anticuerpos VIH1, anticuerpos VIH2, anticuerpos VHC y antígeno de superficie de la hepatitis B. En cualquier caso, todas las muestras, muestras diluidas, patrones, conjugados y tiras de microtitulación deben considerarse como material potencialmente infeccioso y manipularse con las correspondientes precauciones. Deberán seguirse las correspondientes directrices para trabajos de laboratorio.
2. Los componentes que contienen conservante, así como la solución de parada de citrato y la TMB, son irritantes para la piel, los ojos y las mucosas. En caso de contacto, lave inmediatamente la parte afectada con abundante agua y acuda al médico si fuera necesario.
3. Los materiales utilizados deberán eliminarse según la normativa de eliminación de residuos de cada país.

6. Realización de la prueba

El cumplimiento exacto de las instrucciones de VIROTECH Diagnostics es el requisito previo para obtener resultados correctos.

6.1 Material de muestra

Como material de análisis es posible utilizar suero o plasma (sin importar el tipo de anticoagulantes), aunque en el prospecto sólo se mencione el suero.

A observar en las muestras de suero:

Las diluciones de pacientes siempre deben prepararse frescas.

Para un almacenamiento más prolongado, los sueros deben congelarse. Evítese una descongelación repetida.

1. Sólo deben utilizarse sueros recientes no inactivados.
2. No deben emplearse muestras hiperlipémicas, hemolíticas o con contaminación microbiana ni sueros que presenten turbidez (riesgo de falsos positivos o negativos).

A observar en las muestras de líquido cefalorraquídeo:

Las diluciones de sueros de pacientes deben realizarse siempre en el momento.

Para una conservación durante más tiempo, conviene subdividir los líquidos cefalorraquídeos en partes alícuotas y congelarlos a -80°C a fin de evitar una descongelación repetida.

1. Las punciones venosa y lumbar deben realizarse siempre de forma aproximadamente simultánea.
2. Sólo pueden utilizarse líquidos cefalorraquídeos ópticamente transparentes, sin células y no inactivados.
3. No emplear líquidos hemolíticos, con contaminación microbiana o turbios.
4. Pueden utilizarse líquidos cefalorraquídeos congelados si, tras su descongelación, se cumplen los requisitos exigidos en los puntos 2 y 3.

6.2 Preparación de los reactivos

El sistema de diagnóstico de VIROTECH Diagnostics ofrece una gran flexibilidad al permitir el uso de los mismos tampones de dilución y lavado, TMB, solución de paro de citrato y conjugado para todos los parámetros y lotes. Los patrones son específicos para cada parámetro y deben emplearse exclusivamente con los lotes de placas que les están asignados. El certificado de control de calidad del correspondiente kit para suero informa sobre las combinaciones permitidas entre lotes de placas y de patrones.

1. Seleccione una temperatura de 37°C en la estufa y cerciórese de que se ha alcanzado dicha temperatura antes de comenzar la incubación.
2. Deje que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente antes de abrir el envase con las tiras de prueba.
3. Agite bien todos los componentes líquidos antes de su uso.
4. Completar el concentrado de solución de lavado a 1 litro con agua destilada/desionizada (en caso de una eventual formación de cristales en el concentrado, éste debe llevarse a temperatura ambiente antes de la dilución, agitándolo bien antes del uso).
5. **Diagnóstico de IgM: absorción previa con RF-SorboTech**
Los niveles elevados de IgG o los factores reumáticos pueden interferir en la determinación de anticuerpos IgM y provocar falsos positivos o falsos negativos. **Tratar previamente los sueros con RF-SorboTech** (agente de adsorción VIROTECH). En el caso de los controles IgM y los patrones no es necesaria la adsorción previa.

6.3 Realización de la prueba ELISA de VIROTECH

- Las parejas de líquido cefalorraquídeo y suero deben analizarse una junto a otra en la misma fila de determinación de una placa de prueba.
 - Para el valor cero, los sueros patrón, los sueros de paciente y las muestras de líquido cefalorraquídeo recomendamos realizar la prueba por duplicado.
 - Para reducir al mínimo los efectos de matriz, el líquido cefalorraquídeo se emplea con una dilución de trabajo de 1:2 y el suero con dilución de 1:404. Para el diagnóstico de IgM se recomienda empezar con carácter general por una dilución 1:101 y, en caso necesario (si se supera el punto de medición de 100 UMA) efectuar posteriormente una dilución 1:404. En general se recomienda para el diagnóstico de IgG, IgM e IgA preparar dos diluciones para el líquido cefalorraquídeo y el suero, p. ej. líquido cefalorraquídeo 1 :2 y 1 :4; suero 1 :101 y 1 :404 para excluir el análisis con exceso de anticuerpos.
 - Para el diagnóstico de IgM, realiza el tratamiento previo con RF-SorboTech.
1. Por cada ensayo deben pipetearse **100µl** del **tampón de dilución** (valor en blanco), de los **sueros estándares listos para el uso**, de los **controles AI listos para el uso** (si existen) o de los **controles de calidad del suero** y de las **muestras diluidas de líquido cefalorraquídeo y de suero**.
Dilución de trabajo de las muestras de suero:
IgG: 1:404; (p.ej. 5µl de suero + 500µl de tampón de dilución (1:101 dilución), luego dilución 1:4, p.ej. 100µl de dilución 1:101 + 300µl de tampón de dilución).
IgM: 1:101; (p.ej. 10µl de suero + 1ml de tampón de dilución/RF-SorboTech).
IgA: 1:404; (p.ej. 5µl de suero + 500µl de tampón de dilución (1:101 dilución), luego dilución 1:4, p.ej. 100µl de dilución 1:101 + 300µl de tampón de dilución).
Dilución de trabajo de las muestras de líquido cefalorraquídeo: 1:2; p.ej. 150µl de muestra de líquido cefalorraquídeo + 150µl de tampón de dilución.
 2. Tras el pipeteado tiene lugar la incubación a 37 °C (con cubierta) durante 30 min.
 3. El periodo de incubación finaliza con 4 lavados utilizando cada vez 350-400µl de solución de lavado por cavidad. No deje solución de lavado en los pocillos: retire los últimos restos de líquido sacudiendo sobre una superficie de celulosa.
 4. Pipetee en todas las cavidades 100µl del conjugado listo para utilizar.
 5. Incubación de los conjugados: 30 min. a 37°C (con cubierta).
 6. Finalización de la incubación de los conjugados con 4 lavados (véase el punto 3).
 7. Pipetee en cada pocillo 100µl de la solución de sustrato TMB lista para utilizar.
 8. Incubación de la solución de sustrato: 30 minutos a 37°C (con cubierta, en la oscuridad).
 9. Paro de la reacción de sustrato: pipetee en cada pocillo 50µl de la solución de parada de citrato. Agite cuidadosamente la placa hasta que los líquidos se hayan mezclado por completo y pueda verse un color amarillo uniforme.
 10. Mida la absorbancia a 450/620 nm (longitud de onda de referencia 620-690nm). Ajuste el fotómetro de modo que se reste el valor obtenido para el valor cero de todos los demás valores de absorbancia. La medición fotométrica debe realizarse en la hora siguiente a la adición de la solución de paro.

Véase esquema de la realización de la prueba en la última página

6.4 Empleo de procesadores ELISA

Todas las pruebas ELISA de VIROTECH Diagnostics pueden realizarse con ayuda de procesadores ELISA. El usuario está obligado a validar periódicamente el aparato.

VIROTECH Diagnostics recomienda el siguiente procedimiento:

1. Al instalar el aparato, o en caso de reparaciones importantes de su procesador ELISA, VIROTECH Diagnostics recomienda validarlo según las instrucciones del fabricante.
2. Se recomienda comprobar seguidamente el procesador ELISA con el kit de validación (EC250.00). Esta comprobación periódica con el kit de validación debe realizarse al menos una vez al trimestre.
3. En cada ciclo de prueba deben cumplirse los criterios de autorización del certificado de control de calidad del producto. Este modo de procedimiento garantiza la función impecable de su procesador ELISA, sirviendo además para el aseguramiento de calidad del laboratorio.

7. Valoración del ensayo

7.1 Control del funcionamiento del ensayo:

Para garantizar la capacidad funcional óptima del kit de ensayo, los valores OD del suero estándar de anticuerpos 100wME IgG, IgM y IgA así como del suero estándar de anticuerpos 6,2 wME IgG, IgM y IgA deben superar los valores mínimos especificados en el certificado de control de calidad. En el empleo de controles AI deben conseguirse los campos indicados en el certificado de control.

De lo contrario (sin controles AI) debe verificarse la validez del ensayo con ayuda de los controles de calidad del suero:

a) Valores DO

El valor DO del valor en blanco debe ser $<0,15$.

Los valores DO de los controles negativos deben hallarse por debajo de los valores DO indicados en el certificado de control de calidad, debiendo los valores DO de los controles positivos así como de los controles cut-off ser superiores a los valores OD indicados en el certificado de control de calidad.

b) Unidades VIROTECH (VE)

Las unidades VIROTECH (VE) de los controles cut-off se definen con 10 VE. Las VE calculadas de los controles positivos deben hallarse dentro de los campos indicados en el certificado de control de calidad.

Si no se cumplen las exigencias (valores DO, VE) debe repetirse el ensayo.

7.2 Valoración

¡En el diagnóstico del líquido cefalorraquídeo **no** es posible, contrariamente a la serología, el cálculo a través del control cut-off!

Para cuantificar el contenido en anticuerpos específico del patógeno, se crea en forma manual o instrumentalmente una curva de referencia con ayuda de los sueros estándares de anticuerpos IgG, IgM o IgA. Para ello se registran los valores DO de los sueros estándares en la ordenada (eje Y) y las concentraciones de anticuerpos en wME en la abscisa (eje x). La curva de referencia elaborada manual o instrumentalmente (100 UNA, 25 UMA, 6,2 UMA, 1,5 UMA) debe presentar una pendiente suficiente, un origen próximo al origen de coordenadas y una divergencia razonable de todos los puntos de la curva con respecto a la trayectoria extrapolada de la curva.

Tras ello, los valores de DO de las parejas de suero-líquido cefalorraquídeo pueden expresarse en UMA a partir de la curva, con lo que una vez multiplicados por los factores de dilución se corresponden con las concentraciones en el suero y el líquido cefalorraquídeo de los anticuerpos IgG, IgM o IgA contra el patógeno en cuestión. Para obtener índices de anticuerpos numéricamente plausibles, no deben incluirse en la valoración valores de DO inferiores a 0,05 ni valores UMA inferiores a 1,5 o superiores a 100. En caso de valores de DO que lleven a valores superiores a 100 UMA, puede utilizarse una dilución mayor de 1:101 / 1:404 en el caso del suero y mayor de 1:2 en el caso del líquido cefalorraquídeo, teniendo en cuenta este hecho a la hora de realizar los cálculos.

Para simplificar el cálculo AI entero, VIROTECH le ofrece soluciones de software fáciles de emplear para líquido cefalorraquídeo.

7.3 Cálculo del índice de anticuerpos AI (con ejemplo)

Abreviaturas:

IgX_{tot} = IgX total (IgG, IgM o IgA, en mg/l)

IgX_{espec} = IgX específico contra el patógeno en cuestión (IgG, IgM o IgA)

Q = cociente

Q_{alb} = Cociente entre el contenido en albúmina del líquido cefalorraquídeo y el contenido en albúmina del suero (en mg/l) / sólo necesario para el cálculo del valor límite

7.3.1 $QIgX_{espec}$ (cociente de anticuerpos específicos contra el patógeno en cuestión)

Suero

- valor de DO leído: 0,700
- concentración determinada a partir de dicho valor en la curva de referencia: 3,5 UMA
- Dilución: 1:400

Líquido cefalorraquídeo

- valor de DO leído: 0,500
- concentración determinada a partir de dicho valor en la curva de referencia: 2,5 UMA
- Dilución: 1:2

$$Q IgX_{espec.} = \frac{IgX_{espec.LCR} \text{ (UMA) } \times \text{dilución}}{IgX_{espec.suero} \text{ (UMA) } \times \text{dilución}} = \frac{2,5 \text{ UMA} \times 2}{3,5 \text{ UMA} \times 400} = 3,6 \times 10^{-3}$$

7.3.2 Q_{IgX} (Cociente total de inmunoglobulinas: valor del análisis clínico bioquímico)

- IgX_{LCR} = 33mg/l
- IgX_{suero} = 10000mg/l

$$QIgX_{tot.} = \frac{IgX_{tot.LCR}}{IgX_{tot.suero}} = \frac{33mg/l}{10.000mg/l} = 3,3 \times 10^{-3}$$

7.3.3 Cálculo de Q_{LIM} (cálculo del cociente límite)

En caso de una síntesis inmunoglobulínica intratecal poliespecífica adicional, el cociente IgX total ya no puede utilizarse para calcular el AI. En lugar del cociente IgX total debe utilizarse el llamado Q_{LIM} . Para ello es necesario determinar adicionalmente el cociente de albúmina. (valor del análisis clínico bioquímico)

Cálculo del valor límite (según Reiber):

$$\begin{aligned} Q_{LIM-IgG} &= 0,93 \times \sqrt{Q_{alb}^2 + 6 \times 10^{-6}} - 1,7 \times 10^{-3} \\ Q_{LIM-IgM} &= 0,67 \times \sqrt{Q_{alb}^2 + 120 \times 10^{-6}} - 7,1 \times 10^{-3} \\ Q_{LIM-IgA} &= 0,77 \times \sqrt{Q_{alb}^2 + 23 \times 10^{-6}} - 3,1 \times 10^{-3} \end{aligned}$$

7.3.4 Cálculo del índice de anticuerpos

A. $Q_{IgX} < Q_{LIM}$

El índice de anticuerpos (AI) indica la relación entre el cociente de anticuerpos específicos contra un patógeno determinado y el cociente total de inmunoglobulinas. Esto permite determinar y cuantificar una síntesis de anticuerpos específicos contra el patógeno en cuestión. En ese caso se emplea como parámetro umbral el cociente total de inmunoglobulinas.

$$AI = \frac{Q \text{ IgX}_{\text{espec.}}}{Q \text{ IgX}_{\text{tot.}}} = \frac{\frac{\text{IgX}_{\text{espec.LCR}} \times \text{dilución}}{\text{IgX}_{\text{tot.suero}} \times \text{dilución}}}{\frac{\text{IgX}_{\text{tot.LCR}}}{\text{IgX}_{\text{tot.suero}}}} = \frac{3,6 \times 10^{-3}}{3,3 \times 10^{-3}} = 1,1$$

B. $Q_{\text{IgX}} > Q_{\text{LIM}}$

Sin embargo, si además existe una síntesis inmunoglobulínica poliespecífica intratecal, el cociente total de inmunoglobulinas ya no puede emplearse para calcular el valor del AI, ya que una síntesis de anticuerpos buscada, que puede existir simultáneamente, puede verse falsificada en su magnitud o incluso resultar totalmente irreconocible. En esos casos, con ayuda del cociente de albúmina –que debe determinarse adicionalmente– se obtiene también el llamado valor límite del cociente de inmunoglobulinas mediante cálculo (véase fórmula) o de forma gráfica. Posteriormente, para el cálculo del valor AI se utiliza ese valor límite en lugar del cociente de antiglobulinas medido.

$$AI = \frac{Q \text{ IgX}_{\text{espec.}}}{Q_{\text{Lim}}}$$

7.4 Interpretación

Valoraciones AI (4):

AI: < 0,6	no detectable:	teóricamente no es de esperar; se presenta ocasionalmente en la rutina del laboratorio, carece de significado patológico; conviene localizar la falla subyacente
AI: 0,6 – 1,3	normal:	es poco probable una producción intratecal de anticuerpos
AI: 1,4 – 1,5	valor límite:	conviene ensayar la muestra otra vez o bien ensayar una segunda pareja de suero-líquido cefalorraquídeo en el curso
AI: >1,5	patológico:	indicio de una producción intratecal de anticuerpos

- Como en el cálculo del valor de AI relevante para el diagnóstico se utilizan al menos cuatro resultados de medición diferentes (anticuerpos específicos contra el patógeno en cuestión en líquido cefalorraquídeo y suero expresados en unidades de medición arbitrarias, valor total de IgG, IgM e IgA en suero y LCR, albúmina en LCR y suero en mg/l), todos los errores sistemáticos y aleatorios se suman. En el caso más desfavorables es posible que todos los errores se reproduzcan en el mismo sentido; la mejor forma de detectarlo es mediante doble determinación, o aún mejor mediante medición de dos diluciones diferentes de las muestras. Por ese motivo ha demostrado ser adecuado utilizar un valor límite clínicamente relevante de AI de 1,5 como indicio de síntesis local de anticuerpos en el LCR contra un determinado patógeno.
- En el caso normal, para los anticuerpos de la clase IgG, IgM e IgA contra un determinado patógeno existe la misma proporción entre LCR y suero que el existente para los IgG, IgM e IgA totales. Por eso, el valor de AI que cabe esperar teóricamente es de 1,0. Los estudios han demostrado que para todos los anticuerpos específicos contra un patógeno concreto existe un intervalo de referencia de 0,6 a 1,3. Los valores IA entre 1,4 – 1,5 se clasifican como marginales. Si la calidad analítica de todos los valores individuales es suficiente, los valores de AI superiores a 1,5 deben considerarse patológicos, y corresponden a una síntesis propia en el SNC de los correspondientes anticuerpos específicos contra el patógeno en cuestión.
- Los valores de AI inferiores a 0,6 son imposibles en teoría, y en general corresponden a errores analíticos.

4. Sin una referencia clínica en ese sentido, valores aumentados del AI no permiten por sí solos concluir de forma segura la existencia de una fase aguda de una enfermedad infecciosa del SNC. Son posibles síntesis duraderas prolongadas y poliespecíficas de anticuerpos propias del SNC, en particular de la clase IgG, pero en ocasiones también de IgM. En general, los aumentos de AI en el caso de IgM se consideran una prueba de infecciones floridas del SNC. En casos dudosos, una variación significativa del valor del AI en una segunda determinación que se corresponda con una modificación del nivel resulta útil para la valoración de una infección del sistema nervioso central. Una comprobación así está necesariamente ligada a una extracción posterior de LCR, realizada con una separación temporal suficiente, cuya indicación debe sin embargo ser determinada únicamente por criterios clínicos.

7.5 Limitaciones del ensayo

1. La interpretación de resultados serológicos debe tener siempre en cuenta el cuadro clínico, los datos epidemiológicos y los otros resultados analíticos que puedan existir.
2. En caso de concentraciones muy elevadas de anticuerpos contra un patógeno determinado en el líquido cefalorraquídeo o el suero existe el riesgo de que la concentración de antígeno disponible en las cavidades no sea suficiente para cumplir las condiciones óptimas de una determinación cuantitativa de los anticuerpos. Si se sospecha un exceso de anticuerpos (obsérvese la curva de Heidelberg y el resultado total en el LCR), debe realizarse una segunda determinación con una mayor dilución del suero o el LCR.

8. Literatura

1. Zimmermann K., Liquordiagnostik, MTA 11 (1996)4 ; 258 - 260
2. Reiber H, Lange P., Virus-spezifische Antikörper in Liquor und Serum. ELISA-Analytik und Auswertung mittels Antikörper-Index und Quotientendiagramm, Lab.med. 15: 204 (1991) 204 - 207
3. Linke E, Zimmermann K: Liquordiagnostik; hauseigene Liquorbroschüre 2003
4. Peterleit, Sindern, Wick (2007): Leitlinien der Liquordiagnostik und Methodenkatalog der Deutschen Gesellschaft für Liquordiagnostik und Klinische Neurochemie, Springer Verlag, ISBN 978-3-540-39017-6

Preparación de las muestras de paciente y la solución de lavado

▼ **Solución de lavado:** Añadir agua destilada/desionizada al concentrado hasta alcanzar 1 litro

▼ **Dilución del Muestras IgG/IgA**
1:404

▼ **Dilución del LCR**
1. 1:2

p.ej.

1:101: 5 µl de suero/plasma +500 µl de tampón de dilución
1:404: 100 µl de suere diluido 1:101 +300 µl de tampón de dilución

150 µl de muestra de líquido cefalorraquídeo +150 µl de tampón de dilución

▼ **Dilución del Muestras IgM**
1:101/1:404

▼ **Dilución del LCR**
1:2

Adsorción del factor reumático con RF

p.ej.

1:101: 5 µl de suero/plasma +450 µl de tampón de dilución
1 gota de adsorbente RF, incubar 15 min a temp. amb.
1:404: 100 µl de mezcla de suero/tampón de dilución/RF-SorboTech +300 µl de tampón de dilución

50µl de RF-SorboTech + 200µl de tampón de dilución
225µl de mezcla RF-SorboTech-tampón +
225 µl de muestra de líquido cefalorraquídeo
Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente

Realización de la prueba

Incubación de muestras

30 minutos a 37°C

100 µl de muestras de paciente

valor cero (tampón de dilución) y patrones

4 lavados

400 µl de solución de lavado

sacudir bien

Incubación de los conjugados

30 minutos a 37°C

100 µl de conjugado

IgG, IgM, IgA

4 lavados

400 µl de solución de lavado

sacudir bien

Incubación del sustrato

30 minutos a 37°C

100 µl de sustrato

Parada

50 µl de solución de parada

agitar con cuidado

Medición de la absorbancia

Fotómetro a 450/620nm
(longitud de onda de referencia 620-690nm)