

VIROTECH Liquor/CSF Standards

Borrelia + VlsE IgG Liquor/CSF Standards N.º de encomenda: EC022L60

Borrelia IgM Liquor/CSF Standards N.º de encomenda: EC022L80

EXCLUSIVAMENTE PARA O DIAGNÓSTICO IN VITRO



Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH

Waldstrasse 23 A6

63128 Dietzenbach, Alemanha

Tel.: +49 6074 23698-0

Fax: +49 6074 23698-900

E-mail: info.frankfurt@eu.goldstandarddiagnostics.com

Website: clinical.goldstandarddiagnostics.com



Índice

1. Utilização	3
2. Princípio do teste	3
3. Conteúdo da embalagem	3
4. Conservação e prazo de validade do kit de teste e dos reagentes prontos a usar	3
5. Medidas de precaução e avisos	4
6. Realização do teste	4
6.1 Material de análise	4
6.2 Preparação dos reagentes	4
6.3 Realização do teste VIROTECH ELISA	5
6.4 Utilização de processadores ELISA	5
7. Avaliação do teste	6
7.1 Controlo de função do teste	6
7.2 Avaliação	6
7.3 Cálculo do índice de anticorpos IA (com exemplo)	6
7.4 Interpretação	8
7.5 Limitações do teste	8
8. Literatura	8
9. Esquema de realização do teste	10

1. Utilização

Os padrões de liquor destinam-se à elaboração de uma curva de calibração que é usada para a comprovação de uma síntese de anticorpos própria do SNC, através da análise paralela de pares de soro e liquor. É determinado o quociente específico para o agente patogénico a partir do liquor e do soro. A relação entre este quociente de anticorpos específico e o quociente de imunoglobulina total é designada como índice de anticorpos (IA).

2. Princípio do teste

O anticorpo procurado no soro humano e no liquor forma juntamente com o antigénio fixado na microplaca um imunocomplexo. As imunoglobulinas não ligadas são removidas por processos de lavagem. O conjugado enzimático liga-se a este complexo. Os imunoglobulinas não ligados são novamente removidos por processos de lavagem. Após a adição do substrato (TMB) é criado pela actividade enzimática (peroxidase) um corante azul que após a adição da solução de stop muda para amarelo. A extinção (OD) da solução de cor encontra-se numa relação directamente proporcional à concentração de anticorpos **IgG** ou **IgM** específicos, analisados no soro e no liquor. Para a comprovação das sínteses de anticorpos próprias do SCN é necessário fazer uma quantificação das concentrações de anticorpos medidas e que, inicialmente, existem nas extinções. Para este fim servem as séries de soros padrão com uma concentração gradual de anticorpos específicos, a partir dos quais pode ser elaborada uma curva de referência, ou manualmente ou com a ajuda de programas apropriados, que então permite a transformação dos valores de OD determinados em unidades de medida sem dimensão, definidas de forma arbitrária (UMA). Compensando as unidades de medida determinadas (UMA) com as concentrações totais de **IgG** e **IgM** no soro e no liquor, medidas pelo método nefelométrico, é determinado o chamado índice de anticorpos (IA) (ver cálculo do IA no ponto 7.3). Este índice de anticorpos indica os quocientes de anticorpos específicos procurados como múltiplo ou fracção do respectivo quociente de imunoglobulina total. Assim, o valor é independente do estado da função de barreira cerebral individual. O índice de anticorpos permite uma conclusão relativa à existência e à extensão de uma síntese de anticorpos específicos própria do SNC. Este procedimento não é válido quando ocorre síntese de imunoglobina intratecal poliespecífica, uma vez que o quociente IgX total deixou de ser apropriado como parâmetro de barreira e tem de ser substituído pelo chamado valor Limes (ver cálculo do Limes ponto 7.3.4 B).

3. Conteúdo da embalagem

Padrões para a quantificação de concentrações de anticorpos específicos, 4 ampolas de 1000 µl cada, soro humano com estabilizadores proteicos e conservantes, pronto a usar, 100UMA; 25UMA; 6,2UMA; 1,5UMA (UMA = unidades de medida aleatórias).

4. Conservação e prazo de validade do kit de teste e dos reagentes prontos a usar

Conservar o kit de teste a uma temperatura de 2-8°C. O prazo de validade dos vários componentes é indicado na respectiva etiqueta, o prazo de validade do kit consta no certificado de controlo de qualidade.

- Depois de retirar os poços individuais necessários, conservar os poços/tiras restantes no saco fechado juntamente com o dissecador a uma temperatura de 2-8°C. Depois de terem sido usados conservar os reagentes de imediato novamente a 2-8°C.
- O conjugado pronto a usar e o substrato TMB são sensíveis à luz e devem ser guardados num lugar escuro. Se devido à incidência de luz se verificar uma coloração do substrato, este deve ser inutilizado.
- Retirar apenas a quantidade de conjugado pronto a usar ou de TMB necessária para a realização do teste. Uma eventual demasia de conjugado ou TMB deve ser inutilizada, não pode ser novamente guardada.

Material	Estado	Armazenamento	Durabilidade
Amostras	Diluído	+2 a +8°C	máx. 6h
	Não diluído	+2 a +8°C	1 semana
Controlos	Depois de abrir	+2 a +8°C	3 meses
Placa de microtitulação	Depois de abrir	+2 a +8° (armazenamento dentro do saco fornecido com saco contendo dissecante)	3 meses
RF-SorboTech	Não diluído, Depois de abrir	+2 a +8°C	3 meses
	Diluído	+2 a +8°C	1 semana

Conjugado	Depois de abrir	+2 a +8°C (protegido contra a luz)	3 meses
Tetrametilbenzidina (TMB)	Depois de abrir	+2 a +8°C (protegido contra a luz)	3 meses
Tampão de diluição PBS (azul)	Depois de abrir	+2 a +8°C	3 meses
Solução stop	Depois de abrir	+2 a +8°C	3 meses
Solução de lavagem	Depois de abrir	+2 a +8°C	3 meses
	Estado diluído final (pronto a usar)	+2 a +25°C	4 semanas

5. Medidas de precaução e avisos

1. Como padrões são usados apenas soros que foram testados e que se revelaram negativos em relação aos anticorpos de HIV1, HIV2, HIV3 e ao antigénio de superfície de hepatite B. Mesmo assim, todas as amostras, amostras diluídas, padrões, conjugados e microtiras devem ser considerados como material potencialmente infeccioso e manuseados com o respectivo cuidado necessário. São aplicáveis as directivas para trabalhos em laboratório.
2. Os componentes que contêm conservantes bem como a solução stop de citrato e a TMB têm um efeito irritante sobre a pele, os olhos e as mucosas. Em caso de contacto lavar as áreas afectadas do corpo imediatamente com água corrente e consultar, eventualmente, um médico.
3. A eliminação ecológica dos materiais usados deve ser realizada de acordo com as directivas do respectivo país.

6. Realização do teste

O cumprimento exacto das normas de trabalho é o pré-requisito para obter resultados corretos.

6.1 Material de análise

Como material de análise podem ser usados soro e plasma (o tipo de anticoagulantes não é relevante), mesmo se neste folheto se refere apenas o soro.

A ter em atenção nas amostras de soro:

As diluições para doentes devem ser preparadas sempre frescas.

Para conservar os soros durante mais tempo, estes devem ser congelados. Evitar descongelá-los várias vezes.

1. Usar apenas soros frescos não inactivados.
2. Não use amostras hiperlipémicas, hemolíticas e microbianamente contaminadas nem soros turvos (resultados positivos/negativos errados).

A ter em atenção nas amostras de liquor:

Usar sempre soros de paciente diluídos frescos.

Para uma conservação mais prolongada o melhor procedimento é alíquotar os líquidos e congelá-los a -80 °C, a fim de evitar sucessivas descongelações.

1. As punções venosas e as punções lombares devem ser feitas sempre ao mesmo tempo.
2. Só devem ser usados líquidos opticamente claros, de baixa celularidade e não inactivados.
3. Não usar líquidos hemolíticos ou microbianamente contaminados ou turvos.
4. Líquidos congelados podem ser usados desde que após a descongelação se verifiquem as condições exigidas nos pontos 2 de 3.

6.2 Preparação dos reagentes

A VIROTECH System Diagnostik oferece uma grande flexibilidade através da possibilidade da aplicação inter-parâmetros e inter-lotes de tampões de diluição e de lavagem, TMB, solução de paragem de citrato, assim como do conjugado. Os padrões obedecem a parâmetros específicos e só podem ser usados com lotes de placas que lhes são atribuídos. O certificado de controlo de qualidade do respectivo kit de soro indica as combinações entre lotes de placas e lotes de padrões permitidas.

1. Regular a incubadora para 37°C e antes do início da incubação verificar se a temperatura é atingida.
2. Todos os reagentes devem atingir a temperatura ambiente antes de serem abertos.
3. Agitar bem todos os componentes líquidos antes da sua utilização.
4. Misturar o concentrado de solução de lavagem com água dest./desmin. até se obter 1 litro de solução (se o concentrado formar cristais, aquecer à temperatura ambiente antes de diluir e agitar bem antes de utilizar).

5. Diagnóstico IgM: Absorção prévia com RF-SorboTech

Elevadas titulações de IgG ou factores reumatóides podem perturbar a detecção específica de anticorpos IgM e dar

origem a resultados positivos ou negativos errados **Pré-tratar os soros com RF-SorboTech** (meio de adsorção **VIROTECH**). Nos controlos de IgM e nos padrões a absorção prévia deixa de ser necessária.

6.3 Realização do teste VIROTECH ELISA

- Os pares de liquor/soro devem ser analisados sempre um ao lado do outro, na mesma linha de determinação numa placa de teste.
- Para o valor vazio, soros padrão, soros de paciente e amostras de liquor recomendamos usar duas soluções.
- Para minimizar, tanto quanto possível, os efeitos de matriz, o liquor é usado numa diluição de 1:2 e o soro numa diluição de 1:404. Para o diagnóstico IgM recomenda-se começar sempre com uma diluição de 1:101 e depois seguir, eventualmente (- ultrapassagem do ponto de medição de 100 UMA) com uma diluição de 1:404. De uma maneira geral, recomenda-se para o diagnóstico **IgG e IgM** a preparação de duas diluições para o liquor e o soro, por exemplo, liquor 1:2 e 1:4; soro 1:101 e 1:404, para excluir o teste no excesso de anticorpos.
- Para o diagnóstico IgM faça o tratamento prévio com RF-SorboTech.

1. Em cada teste pipetar **100µl** do **tampão de diluição** (valor vazio), dos **soros padrão prontos a usar**, dos **controlos de IA prontos a usar** (caso existam) ou **controlos de qualidade do soro** e das **amostras de liquor e soro diluídas**.

Diluição de trabalho das amostras de soro:

IgG: 1:404; (ex. soro 5µl + tampão de diluição 500µl (diluição 1:101), depois diluir mais 1:4, ex. 100µl diluição 1:101 + tampão de diluição 300µl).

IgM: 1:101; (por exemplo, 10µl de soro + 1ml de tampão de diluição/RF-SorboTech).

Diluição de trabalho das amostras de liquor: 1:2; por exemplo, 150µl de amostra de liquor + 150µl de tampão de diluição.

2. Depois da pipetagem realiza-se a incubação durante 30 min. a 37°C (com cobertura).
3. Findo o período de incubação, lavar 4x os poços, cada uma com 350-400µl de solução de lavagem por poço. Não deixar a solução de lavagem dentro dos poços, removendo os últimos restos de líquido batendo sobre uma base de celulose.
4. Pipetar 100µl do conjugado pronto a usar em todos os poços.
5. Incubar os conjugados 30 min. a 37°C (com cobertura)
6. Termine a incubação do conjugado com 4 lavagens (ver Ponto 3).
7. Pipetar 100µl do substrato TMB pronto a usar em todos os poços.
8. Incubação da solução de substrato: 30 minutos a 37°C (tapar e colocar num lugar escuro).
9. Parar a reacção do substrato, pipetando 50µl de solução stop de citrato em todos os poços. Agitar a placa cuidadosamente até os líquidos estarem totalmente misturados e ser visível uma cor amarela homogénea.
10. Medir os coeficientes de extinção com 450/620nm (comprimento de onda de referência 620-690nm). Regular o fotómetro por forma a que o valor zero medido seja subtraído de todas as outros coeficientes de extinção. A medição fotométrica deve ser realizada no prazo de uma hora após a adição da solução stop.

Esquema de realização do teste ver última página

6.4 Utilização de processadores ELISA

Todas as ELISAs da **VIROTECH** podem ser executadas com a ajuda de processadores ELISA. O utilizador deve realizar uma validação regular dos aparelhos.

Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH recomenda proceder da forma seguinte:

1. Para o ajuste do aparelho ou a realização de reparações de maior envergadura do seu processador ELISA, **Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH** recomenda a validação do aparelho de acordo com as indicações do fabricante do aparelho.
2. Recomenda-se verificar o processador ELISA, a seguir, com a ajuda do kit de validação (EC250.00). Esta verificação regular com o kit de validação deve ser realizada pelo menos uma vez por trimestre.
3. Sempre que se realize o teste, devem ser preenchidos os critérios de conformidade do certificado de controlo de qualidade do produto.

Este procedimento garante um funcionamento perfeito do seu processador ELISA e destina-se à garantia de qualidade do laboratório.

7. Avaliação do teste

7.1 Controlo de função do teste

Para garantir a funcionalidade ideal do kit de teste, os valores de DO do soro padrão de anticorpos **IgG e IgM** de 100UMA e do soro padrão de anticorpos **IgG ou IgM** de 6,2UMA devem situar-se acima dos valores mínimos indicados no certificado de controlo de qualidade. Em caso de utilização dos controlos de IA, devem ser atingidas as áreas indicadas no certificado de controlo.

Caso contrário (sem controlos de IA), a validade do teste deve ser verificada com a ajuda dos controlos de qualidade do soro:

a) Valores de DO

O valor de DO do valor vazio deve ser $<0,15$

Os valores de DO dos controlos negativos devem situar-se abaixo dos valores de DO indicados no certificado de controlo de qualidade, enquanto os valores de DO dos controlos positivos e dos controlos cut-off devem situar-se acima dos valores de DO indicados no certificado de controlo de qualidade.

b) Unidades VIROTECH (VE)

As unidades VIROTECH (VE) dos controlos cut-off são definidas com 10 VE. As VE calculadas dos controlos positivos devem situar-se dentro das gamas indicadas no certificado de controlo de qualidade.

Se os requisitos (valores de OD, VE) não forem preenchidos, o teste deve ser repetido.

7.2 Avaliação

No diagnóstico do liquor, o cálculo através do controlo cut-off - como na serologia - **não** é possível!

Para a quantificação do teor de anticorpos agente-específicos de pares de soro/liquor, é criada uma curva de referência, com a ajuda dos soros padrão **IgG ou IgM** -AK, manualmente ou pelo método instrumental. Para esse efeito, os valores de DO dos soros padrão são registados na ordenada (eixo y) e as concentrações de anticorpos em wME na abcissa (eixo x). A curva de referência elaborada manual ou instrumentalmente (100UMA, 25UMA, 6,2UMA, 1,5UMA) deve apresentar um declive satisfatório, um salto perto do ponto zero das coordenadas e um desvio aceitável de todos os pontos da curva do decurso extrapolado.

Os valores de OD dos pares de soro/liquor podem ser expressos agora em UMA, através da leitura da curva, e, após multiplicação com os factores de diluição, correspondem às concentrações do anticorpo **IgG ou IgM** específico no soro e no liquor. Para obter índices de anticorpos numericamente plausíveis, os valores de OD abaixo de 0,05 e valores UMA abaixo de 1,5 ou acima de 100 não devem ser considerados na avaliação. Nos valores de OD que dão origem a valores acima de 100UMA, pode ser usada uma diluição de soro superior a 1:101 / 1:404 ou uma diluição de liquor superior a 1:2, tendo em consideração a proporção de diluição diferente. **Para a melhor avaliação possível do anticorpo IgG ou IgM específico do agente patogénico no soro e no LCR, recomenda-se a seleção de valores de DO que se situem entre o padrão do LCR 6,2wME e 25wME. A diferença entre o valor de DO do LCR e o valor de DO do soro das amostras testadas não deve, idealmente, ser superior a 0,300 DO.**

Para simplificar todos os cálculos do IA, **Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH** oferece-lhe soluções de liquor/software fáceis de usar.

7.3 Cálculo do índice de anticorpos IA (com exemplo)

Abreviaturas:

$IgX_{ges.} = IgX$ (**IgG ou IgM**, mg/l) total

$IgX_{spez.} = IgX$ (**IgG ou IgM**) específico

Q = Quociente

Q_{alb} = Quociente do teor de albumina do liquor e do teor de albumina do soro (mg/l) / necessário apenas em conjunto com o cálculo Limes!

7.3.1 $QIgX_{spez}$ (quociente de anticorpo específico)

Soro

- valor de OD lido: 0,700

- concentração determinada a partir da curva de referência: 3,5 UMA

- Diluição: 1:400

Liquor

- valor de OD lido: 0,500
- concentração determinada a partir da curva de referência: 2.5 UMA
- Diluição: 1:2

$$Q \text{ IgX}_{\text{espec.}} = \frac{\text{IgX}_{\text{liquor espec.}}(\text{wME}) \times \text{Diluição}}{\text{IgX}_{\text{soro espec.}}(\text{wME}) \times \text{Diluição}} = \frac{2,5\text{wME} \times 2}{3,5\text{wME} \times 400} = 3,6 \times 10^{-3}$$

7.3.2 Q_{IgX} (quociente de imunoglobulina total: valor da química clínica)

- $\text{IgX}_{\text{Liquor}} = 33\text{mg/l}$
- $\text{IgX}_{\text{Soro}} = 10000\text{mg/l}$

$$Q \text{ IgX}_{\text{total}} = \frac{\text{IgX}_{\text{liquor total}}}{\text{IgX}_{\text{soro total}}} = \frac{33\text{mg/l}}{10.000\text{mg/l}} = 3,3 \times 10^{-3}$$

7.3.3 Cálculo Q_{LIM} (cálculo do quociente Limes)

Caso ocorra adicionalmente síntese de imunoglobulina intratecal poliespecífica, o quociente $\text{IgX}_{\text{total}}$ já não pode ser usado para o cálculo do IA). Em vez do quociente $\text{IgX}_{\text{total}}$ tem de ser usado o chamado Q_{LIM} . Para esse efeito é necessário determinar adicionalmente o quociente de albumina. (valor da química clínica)

Cálculo do valor LIMES (segundo Reiber):

$$Q_{\text{LIM-IgG}} = 0,93 \times \sqrt{Q_{\text{alb}}^2 + 6 \times 10^{-6}} - 1,7 \times 10^{-3}$$
$$Q_{\text{LIM-IgM}} = 0,67 \times \sqrt{Q_{\text{alb}}^2 + 120 \times 10^{-6}} - 7,1 \times 10^{-3}$$

7.3.4 Calcular o índice de anticorpos

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

O índice de anticorpos (IA) indica a relação entre o quociente de anticorpos específicos e o quociente de imunoglobulina total. Assim, é possível comprovar e quantificar uma síntese de anticorpos específicos. Neste caso, o quociente de imunoglobulina total é usado como parâmetro de barreira.

$$AI = \frac{Q \text{ IgX}_{\text{espec.}}}{Q \text{ IgX}_{\text{total}}} = \frac{\frac{\text{IgX}_{\text{liquor espec.}} \times \text{Diluição}}{\text{IgX}_{\text{soro espec.}} \times \text{Diluição}}}{\frac{\text{IgX}_{\text{liquor total}}}{\text{IgX}_{\text{soro total}}}} = \frac{3,6 \times 10^{-3}}{3,3 \times 10^{-3}} = 1,1$$

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

Se, no entanto, ocorrer adicionalmente síntese de imunoglobulina intratecal poliespecífica, o quociente de imunoglobulina total já não pode ser usado para o cálculo do valor IA, uma vez que uma síntese de anticorpos procurada e eventualmente existente pode ser falsificada na sua extensão ou mesmo totalmente desfigurada. Nestes casos, é calculado (ver fórmula) ou determinado graficamente o chamado valor LIMES do quociente de imunoglobulina, com a ajuda do quociente de albumina que tem de ser determinado adicionalmente. Este valor Limes é então usado para calcular o valor do IA, em vez do quociente de imunoglobulina medido.

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

7.4 Interpretação

Avaliações IA (4):		
IA: < 0,6	não comprovável:	na teoria não é de esperar, acontece ocasionalmente na rotina, sem significado patológico, recomenda-se localizar o erro
IA: 0,6 – 1,3	normal:	uma produção intratecal de anticorpos não é provável
IA: 1,4 – 1,5	no limite:	recomenda-se testar a amostra novamente ou testar um segundo par soro/liquor
IA: >1,5	patológico:	indício para uma produção intratecal de anticorpos

- Uma vez que o cálculo do valor do IA relevante para o diagnóstico inclui pelo menos quatro resultados de medição diferentes (anticorpos de liquor e soro específicos em unidades de medida, valor total de **IgG ou IgM** no soro e liquor, albuminas de liquor e soro em mg/l), são somados aqui todos os erros metódicos e casuais. No caso mais desfavorável também é possível que haja uma propagação do erro, o que pode ser mais facilmente detectado quando são feitas duas determinações ou, melhor ainda, quando são medidas duas diluições de amostras diferentes. Por esta razão, deu boas provas um valor-limite IA clinicamente relevante de 1,5, para o indício de uma síntese local de anticorpos específicos no liquor.
- Num caso normal, verifica-se para anticorpos específicos da classe **IgG ou IgM** a mesma relação entre o liquor e o soro que também é encontrada para a fracção I **IgG ou IgM** sumária. O valor IA teoricamente esperado situa-se, por isso, em 1,0. As respectivas análises mostraram que a todos os anticorpos específicos é aplicável uma área de referência de 0,6 – 1,3. Os valores IA entre 1,4 e 1,5 devem ser considerados como próximos do limite. Com uma qualidade analítica satisfatória de todos os valores individuais verificados, os valores IA superiores a 1,5 podem ser considerados patológicos e são caracterizados por uma síntese dos respectivos anticorpos específicos própria do SNC.
- Os valores IA inferiores a 0,6 não são possíveis em teoria e, em regra, indicam um erro analítico.
- Sem a respectiva referência clínica, um aumento dos valores IA por si só não permite uma conclusão segura em relação à existência da fase aguda de uma doença infecciosa do SNC. As sínteses de anticorpos poliespecíficos e persistentes próprias do SNC, nomeadamente da classe IgG, mas às vezes também da classe IgM, são possíveis. Um aumento do IA do IgM é considerado, em regra, como prova de uma infecção aguda do SNC. Em casos de dúvida, uma alteração significativa do valor do IA correspondente a movimentos de titulações é favorável na segunda determinação para a avaliação de uma infecção do sistema nervoso central. Um tal controlo é ligado obrigatoriamente a uma segunda recolha de liquor que deve ser feita num intervalo temporal adequado, mas para cuja indicação são determinantes, em regra, apenas aspectos clínicos.

7.5 Limitações do teste

- A interpretação dos resultados sorológicos deve incluir sempre o quadro clínico, dados epidemiológicos e outros resultados analíticos eventualmente disponíveis.
- Em caso de concentrações de anticorpos específicos muito elevadas no liquor e no soro existe o perigo de a concentração de antígenos disponível nas cavidades não ser suficiente para satisfazer as melhores condições para uma determinação quantitativa dos anticorpos. Se se suspeitar de excesso de anticorpos (ter em atenção a curva de Heidelberg e o diagnóstico de liquor total), deve ser feita uma segunda determinação com uma diluição de soro ou liquor mais elevada.

8. Literatura

- 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. Petereit, Sindern, Wick (2007): Leitlinien der Liquordiagnostik und Methodenkatalog der Deutschen Gesellschaft für Liquordiagnostik und Klinische Neurochemie, Springer Verlag, ISBN 978-3-540-39017-6

9. Esquema de realização do teste

Preparação das amostras de pacientes e solução de lavagem

▼ **Solução de lavagem:** Juntar água destilada/desmineralizada ao concentrado, por forma a obter 1 litro.

▼ **Diluição amostras IgG**
1:404

▼ **Diluição liquor**
1:2

p.ex.:

1:101: 5 µl de soro/plasma + 500 µl de tampão de diluição

1:404 : 100 µl de soro diluído 1:101 + 300µl de tampão de diluição

150 µl de amostra de liquor + 150 µl de tampão de diluição

▼ **Diluição amostras IgM**
1:101/1:404

▼ **Diluição liquor**

Absorção do factor reumatóide com RF

p.ex.:

1:101: 5 µl de soro/plasma + 450 µl de tampão de diluição + 1 gota de RF-SorboTech

Incubar durante 15 min. a temperatura ambiente

1:404 : 100 µl de mistura de soro/VP/RF- SorboTech + 300µl de tampão de diluição

50 µl de RF-SorboTech + 200 µl de tampão de diluição

225 µl de mistura de RF-Sorbo-tampão de diluição +

225 µl de amostra de liquor

Incubar durante 15 min a temperatura ambiente

Realização do teste

Incubação de amostras

30 minutos a 37°C

100 µl de amostras de paciente

Valor vazio (tampão de diluição) e padrões

Lavar 4x

400 µl de solução de lavagem

bater bem para sair tudo

Incubação do conjugado

30 minutos a 37°C

100 µl de conjugado

IgG , IgM

Lavar 4x

400 µl de solução de lavagem

bater bem para sair tudo

Incubação do substrato

30 minutos a 37°C

100 µl de substrato

Parar

50 µl de solução stop

agitar cuidadosamente

Medir o coeficiente de extinção

Fotómetro com 450/620nm
(comprimento de onda de referência 620-690nm)