



CIENCIAS TECNOLÓGICAS  
ARTÍCULO ORIGINAL

## Optimización del uso de las Placas de Inmunodifusión Radial Simple de la firma Siemens

### Optimization of the usage of single radial immunodiffusion plates from Siemens

Alberto Juan Dorta-Contreras<sup>1\*</sup>, Cristóbal González-Losada<sup>2</sup>, Consuelo Sánchez Martínez<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Ciencias Médicas de La Habana. Facultad de Ciencias Médicas “Miguel Enríquez”. Laboratorio Central de Líquido Cefalorraquídeo. La Habana, Cuba.

<sup>2</sup>Universidad de Ciencias Médicas de La Habana. Facultad de Ciencias Médicas “Miguel Enríquez”. La Habana, Cuba.

<sup>3</sup>Universidad de Ciencias Médicas de La Habana. Facultad de Ciencias Médicas “Miguel Enríquez”. Hospital Clínico Quirúrgico “Miguel Enríquez”. La Habana, Cuba.

\*Autor para la correspondencia: [adorta@infomed.sld.cu](mailto:adorta@infomed.sld.cu)

#### Cómo citar este artículo

Dorta-Contreras AJ, González-Losada C, Sánchez Martínez C. Optimización del uso de las Placas de Inmunodifusión Radial Simple de la firma Siemens. Rev haban cienc méd [Internet]. 2018 [citado ]; 17(5):826-836. Disponible en: <http://www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/2304>

Recibido: 02 de abril del 2018.

Aprobado: 20 de septiembre del 2018.

#### RESUMEN

**Introducción:** La Inmunodifusión radial simple es una técnica con fundamento inmunológico confiable por su especificidad para la cuantificación de inmunoglobulinas principales y se emplea también para otras proteínas. Las

placas de Inmunodifusión comerciales se ofertan con un número determinado de pocillos donde se coloca la muestra biológica que contiene la proteína a cuantificar.

**Objetivo:** Evaluar la sensibilidad y la especificidad de la modificación introducida para optimizar el uso de las placas de inmunodifusión radial simple de la marca SIEMENS por aumento del número de muestras por placas.

**Material y métodos:** Se presenta una innovación que permite optimizar el área biológicamente activa de la placa no utilizada para emplearla para la cuantificación de otras muestras. Se realizan montajes paralelos de muestras de controles en los pocillos tradicionales y en los realizados en los espacios disponibles para cuantificar IgG y albúmina para suero y líquido cefalorraquídeo.

**Resultados:** La sensibilidad del empleo por el método tradicional y por el nuevo no presenta diferencias significativas. En cuanto a la especificidad tampoco existen diferencias significativas menos en las placas para cuantificar

albúmina en suero por lo que se recomienda diluir la muestra de suero antes de ser utilizada en el área disponible. En el caso de las placas NOR y LC Partigen® el número de muestras a ser beneficiadas con la cuantificación se duplica, pero de igual manera puede ser aplicada en otras placas de otras firmas comerciales.

**Conclusiones:** Esta innovación permite hacer un uso óptimo de las placas de inmunodifusión con el consiguiente ahorro de material de importación y se puede aplicar fácilmente en todos los laboratorios del país

**Palabras claves:** Inmunodifusión radial, cuantificación de proteínas, innovación, suero, líquido cefalorraquídeo, IgG, albúmina, sensibilidad, especificidad, curvas ROC.

#### ABSTRACT

**Introduction:** Single radial immunodiffusion assay is a technique with immunological base, which is reliable because of its specificity in the quantification of main immunoglobulins, although it is also used for other proteins. Commercial immunodiffusion plates are offered with a determined number of holes where the biological samples containing protein to be quantified are placed.

**Objective:** To evaluate the sensitivity and specificity of the modification implemented to optimize the usage of single radial immunodiffusion plates from Siemens by increasing the number of samples in the plates.

**Materials and Methods:** An innovating procedure that allows to optimize the non-used biologically active area and use it in the

quantification of other samples is presented. A parallel quantification of control samples from traditional holes and the other ones opened in available spaces was performed in order to quantify IgG and albumin in serum and in cerebrospinal fluid.

**Results:** Sensitivity was not affected significantly between the normal plates and the usage of the new procedure. Regarding specificity, there are also no significant differences except in the plates used to quantify serum albumin; so, it is recommended to dilute serum samples before the application. In case of NOR and LC Partigen®, this proposed modification duplicates the number of samples to be quantified in each plate, but otherwise, it could be applied in other commercial immunoplates.

**Conclusions:** This innovation allows to make an optimal usage of immunodiffusion plates with the consequent saving of import materials, which can be easily applied in all the laboratories of the country.

### INTRODUCCIÓN

El empleo de técnicas y métodos inmunológicos aplicados al estudio del líquido cefalorraquídeo (LCR) ha revolucionado la Neurología y brindado importantes herramientas para la caracterización, diagnóstico y seguimiento de enfermedades infecciosas, autoinmunes y genéticas.<sup>(1)</sup>

La inmunodifusión radial simple está basada en una reacción inmunoquímica mediada por anticuerpos, que forman inmunocomplejos con las proteínas a determinar y se pueden ver como precipitados de forma circular.<sup>(2,3)</sup>

Las placas contienen una lámina de gel de agarosa con antisuero monoespecífico contra la proteína a determinar. La proteína en cuestión forma una reacción inmunoquímica con el anticuerpo específico presente en el gel de agarosa, y forma un inmunocomplejo que precipita y origina un anillo de precipitado. Se

### OBJETIVO

Como parte de la política de ahorro implementada en Cuba, el objetivo del presente estudio es evaluar la sensibilidad y la especificidad de la modificación introducida para

### MATERIAL Y MÉTODOS

Esta investigación se clasifica dentro de los estudios de tamizaje o pesquizaje donde la normalización de pruebas de laboratorio constituye un caso particular. En este trabajo se

**Keywords:** radial immunodiffusion, protein quantification, innovation, serum, cerebrospinal fluid, IgG, albumin, sensitivity, specificity, ROC curves.

deja la placa montada en reposo a temperatura ambiente (entre +15 y 250C) y se lee el halo de precipitado a las 72 horas, con un pie de rey como instrumento de medición.<sup>(2,3)</sup>

En el Laboratorio Central de Líquido Cefalorraquídeo (LABCEL) se utiliza la inmunodifusión radial simple para determinar las concentraciones de diferentes analitos, como: albúmina e inmunoglobulinas, alfa 1 antitripsina, C3c, subclases de IgG y C4. Estas determinaciones son principalmente para realizar labor asistencial e investigaciones básicas y clínicas aplicadas y ha permitido culminar un grupo importante de publicaciones entre las que se relaciona su empleo para el estudio de las manifestaciones neurológicas del dengue y en pacientes con meningoencefalitis por *Angiostrongylus cantonensis*, por solo citar algunas de las más recientes.<sup>(4,5)</sup>

optimizar el uso de las placas de inmunodifusión radial simple de la marca SIEMENS por aumento del número de muestras por placas.

comparan los resultados de la modificación de las placas NOR y LC-Partigen® de la firma Siemens con los resultados obtenidos en las placas no

modificadas. Este trabajo fue realizado entre enero de 2015 y enero de 2018.

#### *Aprovechamiento de las placas de inmunodifusión radial*

Para las determinaciones en suero se utilizan las placas NOR y las LC Partigen® para las determinaciones en LCR.

Las placas de inmunodifusión radial NOR y LC Partigen® están constituidas por 12 pocillos perforados en la lámina de agarosa, orientados alrededor de la placa y numerados siguiendo las manecillas del reloj, en cada uno de los cuales se monta la muestra de suero o LCR de cada paciente respectivamente lo que se traduce en 12 pacientes con determinaciones en suero y LCR en dependencia del tipo de placa.

El método para el aprovechamiento óptimo de estas placas de inmunodifusión consiste en lo siguiente:

A estas placas se les perforaron pocillos entre las perforaciones originales, con un obturador estéril diseñado específicamente para este fin, con el mismo diámetro de las perforaciones originales, cuidando de realizar el nuevo pocillo en un área libre de anillo de precipitación porque en esas zonas libres quedan como áreas no utilizadas con el antisuero distribuido homogéneamente con igual calidad a la de las áreas originales. El objetivo entonces es darle valor de uso a esas áreas vírgenes de las placas para aprovecharlas en la cuantificación de las proteínas específicas.

#### *Obturador*

Se diseñó un obturador cilíndrico, hueco por dentro y del mismo diámetro de los pozos originales.

#### *Método*

Una vez consumido los 12 pozos originales de la placa, se procede a identificar los espacios disponibles entre cada halo de precipitación. Una vez identificado el sitio se procede a la perforación y extracción del cilindro de agar que dará lugar al nuevo pozo.

Las placas de NOR Partigen originales poseen tan alta repetitividad y reproducibilidad que no requiere de la realización de una curva de calibración y para las placas LC se realizan siempre curvas de calibración para cada placa.

Con las placas de inmunodifusión radial simple optimizadas se realiza un riguroso control de calidad del método. Cuando se va a iniciar una nueva placa con las perforaciones adicionales, se monta un control (N/T Control proteínas SL/L, M, H) para rangos de concentración: bajo, mediano y alto. Estos se utilizan como controles de la exactitud y la precisión en la determinación de las diferentes proteínas que se utilizan y permite hacer una curva de calibración para cada una de las placas tanto para donde se cuantifican los sueros como en las placas para dosificar proteínas en el LCR.

Los valores asignados para cada una de las proteínas a analizar están establecidos por el fabricante para el uso como control de calidad intralaboratorio, valorado para la evaluación de la precisión y el sesgo analítico. Estos controles SL/L, M y H se analizan y evalúan del mismo modo que las muestras de pacientes.

**Criterios de inclusión.** Se utilizan los sueros controles suministrados por los fabricantes que se encuentren en estado óptimo de conservación y dentro del período recomendado por el fabricante y controles secundarios a partir de

sueros y líquidos cefalorraquídeos bien conservados en alícuotas en condiciones de refrigeración.

Criterios de exclusión. Que los sueros controles estén vencidos y los controles secundarios estén turbios o con precipitados.

Para la comparación de la determinación de albúmina en LCR por la placa original y con el empleo de los nuevos pocillos de la innovación se realizaron 42 determinaciones en paralelo y para la evaluación de albúmina en suero se compararon 57 muestras controles.

Para IgG en LCR se emplearon 31 muestras controles con el objeto de comparar los nuevos pocillos realizados en la placa y los del fabricante. De la misma manera para evaluar la innovación para IgG en suero se utilizaron 32 determinaciones en paralelo.

Los valores de albúmina tanto en suero como en LCR obtenidos tanto por la placa original como los obtenidos por las nuevas perforaciones en las

placas fueron contrastadas con los valores obtenidos por cuantificación de albúmina realizadas por un método inmunoenzimático modificado.<sup>(6)</sup>

Los valores de IgG en suero y LCR obtenidos por inmunodifusión en las placas originales y modificadas fueron comparadas con los valores obtenidos por un ELISA tipo sándwich normalizado en LABCEL.

Estos resultados fueron procesados en el paquete estadístico MedCalc versión 8.1.

*Diseño estadístico*

A menudo sucede que un investigador necesita saber qué tan exacta es una prueba de laboratorio en comparación con otra ya establecida. Para poder realizar esta comparación se usa el análisis de las curvas ROC. Para hallar si existen diferencias significativas en la sensibilidad y la especificidad se realizaron comparación de proporciones. Se trabajó con un nivel de significación  $p < 0,05$ .

Esquema de las variables que contempla la curva ROC

| Test     | Enfermedad         |       |                    |       | Total |
|----------|--------------------|-------|--------------------|-------|-------|
|          | SI                 | n     | NO                 | n     |       |
| Positivo | Verdadero positivo | a     | Falso positivo     | c     | a + c |
| Negativo | Falso negativo     | b     | Verdadero negativo | d     | b + d |
| Total    |                    | a + b |                    | c + d |       |

Sensibilidad: es la probabilidad que un resultado de un test pueda ser positivo cuando la enfermedad está presente (índice verdadero positivo, expresado como porcentaje).

Sensibilidad =  $a / a + b$

Especificidad: es la probabilidad que un resultado de un test pueda ser negativo cuando la enfermedad no está presente (índice verdadero negativo, expresado como porcentaje).

Especificidad =  $d / c + d$

Punto de corte: Una de los valores prácticos de la curva ROC es que propone el punto de corte que es el valor donde se alcanza una mayor

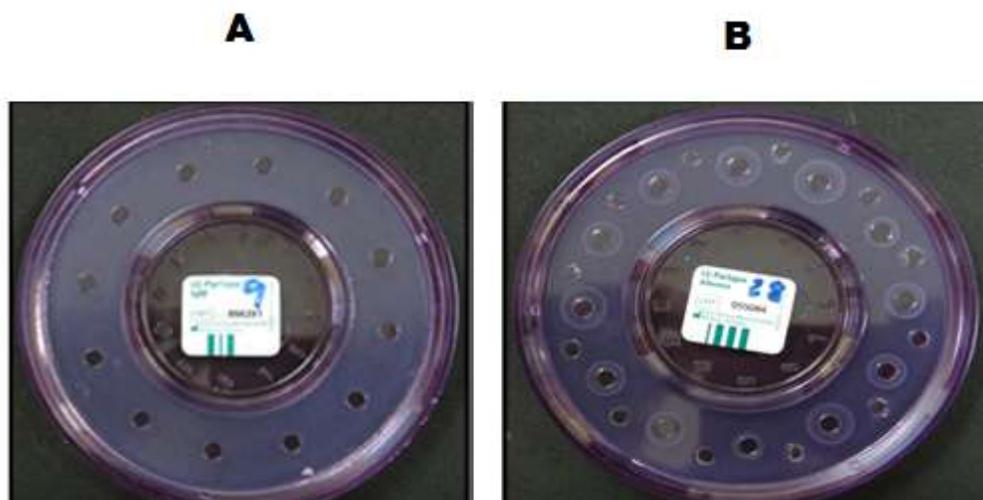
discriminación de estos y mejor sensibilidad y especificidad. Cada método analítico posee un valor de corte óptimo.

### RESULTADOS

Cada placa de inmunodifusión radial no optimizada cuenta con 12 pocillos (Figura 1A) que permite un total de igual número de determinaciones.

Una placa totalmente optimizada cuenta con 24 pocillos (Figura 1B), lo cual permite aumentar el

número de determinaciones correspondientes hasta 24 muestras por placa. El número de pocillos adicionales está en dependencia de la superficie útil que queda sin ser afectada por los anillos de precipitación de los pocillos utilizados con antelación para la cuantificación.



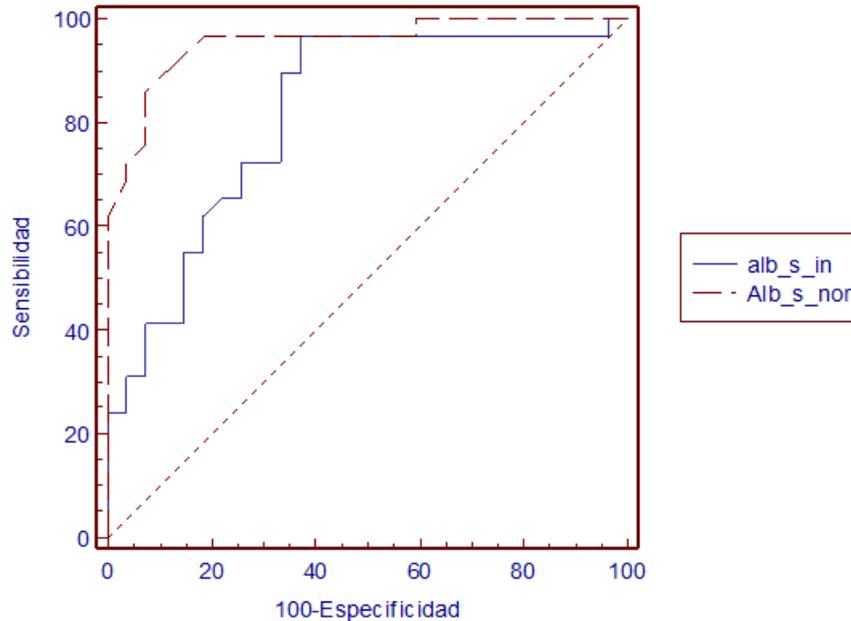
**Figura 1.** Placas LC Partigen® de inmunodifusión radial simple original (A) optimizada (B).

Como el objetivo del trabajo fue evaluar la sensibilidad y la especificidad de la modificación introducida en comparación con la propia de la placa original se compararon los resultados de la cuantificación por ambas formas para albúmina e IgG en suero y LCR.

En la Tabla 1 se muestran los valores de sensibilidad y especificidad tanto de las determinaciones en las placas originales como la de las placas modificadas con las nuevas perforaciones que permitió un uso mayor de estas placas. (Tabla 1 y Figura 2).

**Tabla 1.** Especificidad y sensibilidad en placas originales y modificadas para la cuantificación de albúmina e IgG en LCR y en suero comparadas con los métodos de ELISA

|                          | Especificidad | Sensibilidad | Punto de corte óptimo |
|--------------------------|---------------|--------------|-----------------------|
| <b>Albúmina en LCR</b>   |               |              |                       |
| Placas originales        | 85,7          | 61,9         | Mayor de 0,15         |
| Placas modificadas       | 76,6          | 52,4         | Menor o igual 0,21    |
| <b>Albúmina en suero</b> |               |              |                       |
| Placas originales        | 92,6          | 86,2         | Menor o igual a 117   |
| Placa modificadas        | 96,6          | 63,0         | Menor o igual a 51,79 |
| <b>IgG LCR</b>           |               |              |                       |
| Placa originales         | 33,3          | 94,1         | Mayor 12,97           |
| Placa modificadas        | 58,3          | 94,1         | Menor o igual a 21,7  |
| <b>IgG suero</b>         |               |              |                       |
| Placas originales        | 100           | 60           | Menor o igual 0,26    |
| Placa modificadas        | 100           | 40           | Menor o igual 9,28    |



**Figura 2.** Curva ROC para la comparación del método de cuantificación por inmunodifusión para albúmina en suero por el método convencional (Alb\_s\_nor) y por los nuevos pocillos perforados (alb\_s\_in). Se toma como método de referencia la cuantificación de albúmina por el test de ELISA modificado<sup>(6)</sup> destinado originalmente para cuantificación de microalbuminuria.

Se realizó la comparación de la sensibilidad y especificidad entre las placas originales y las placas que están modificadas por la optimización de las áreas no utilizadas. Estos resultados pueden observarse en la Tabla 2. Como puede

apreciarse no existen diferencias significativas en cuanto a sensibilidad y especificidad en la mayoría de las determinaciones en suero y LCR en cuanto a IgG y albúmina menos en el caso de la especificidad de la albúmina en suero.

**Tabla 2.** Comparación de sensibilidad y especificidad de las placas originales y las modificadas

|                      | Diferencia | IC 95%         | Chi cuadrado | gl | p       |
|----------------------|------------|----------------|--------------|----|---------|
| <b>Sensibilidad</b>  |            |                |              |    |         |
| Albúmina LCR         | 9,5        | -20,29 a 39,29 | 0,096        | 1  | 0,7564  |
| Albúmina suero       | 10,40      | 0,29 a 20,51   | 2,710        | 1  | 0,099   |
| IgG LCR              | 20,0       | -5,2 a 45,2    | 1,589        | 1  | 0,2075  |
| IgG suero            | 0,00       | -11,73 a 11,73 | 0,291        | 1  | 0,5809  |
| <b>Especificidad</b> |            |                |              |    |         |
| Albúmina LCR         | 9,10       | 11,4 a 32,6    | 0,129        | 1  | 0,7193  |
| Albúmina suero       | 29,60      | 15,34 a 43,86  | 12,795       | 1  | 0,0003* |
| IgG LCR              | 21         | -4,14 a 46,14  | 1,790        | 1  | 0,1809  |
| IgG suero            | 0,00       | -              | -            | -  | -       |

**Leyenda:** \*Diferencia significativa

IC= Intervalo de confianza

gl= grado de libertad

### *Cálculo económico*

Como resulta fácil comprender, el número de determinaciones se duplica por cada placa de Inmunodifusión empleada que se pueda utilizar completamente. Estas placas poseen un valor de 40 euros en Alemania, según los precios de 2015. El total de pacientes a los que se les realizan las determinaciones en LABCEL por año es 250.

El total de pruebas/paciente/proteína entonces, a los que se les realizan las determinaciones por año con las placas optimizadas, es de 500.

A partir de la introducción de esta innovación se ahorró por concepto de sustitución de importaciones un total de 6 600 euros en los dos primeros años de implementada la innovación. Sin embargo, si se suma a esta innovación el costo de todo el procesamiento, evaluación y diagnóstico en los servicios que de ella se derivan, el impacto económico ascendería a 100 000 euros, teniendo en cuenta los precios de este servicio en un país de la Unión Europea.

### **DISCUSIÓN**

La innovación objeto de este trabajo llevó implícito primero una normalización de los

resultados que implicó en todos los casos la realización de curvas controles aun cuando los

fabricantes no la recomendaban para la cuantificación de albúmina e IgG en suero.

Es verdaderamente admirable la calidad lograda por el fabricante en este caso la firma Siemens, antes Dade-Behring y mucho antes Behring cuya casa matriz es el Instituto Behring radicado en la ciudad de Marburg. Esto es debido a que se logra la reproducibilidad de los resultados entre placas que permite con la valoración del diámetro del anillo de precipitación dar con certeza el valor de la concentración en suero de estas proteínas. Sin embargo, esto es posible cuando se trata de líquido cefalorraquídeo donde es necesario siempre hacer una curva control debido a que como se conoce la concentración de albúmina e IgG en LCR es unas 200 veces menor en este último líquido biológico.

Cuando se realiza la innovación basada en el aprovechamiento de las áreas que no están afectadas por la precipitación del inmunocomplejo que se produce al interactuar la proteína con su antisuero específico, se impuso la realización de las curvas para cada placa.

La realización de esta modificación de las placas comerciales para la cuantificación de IgG y albúmina en suero y LCR pone en evidencia que el método es válido porque no se ve afectada de manera general de forma significativa tanto la sensibilidad como la especificidad de la inmunodifusión radial.

Es particularmente importante que la sensibilidad no se haya afectado significativamente para la IgG y la albúmina en suero y LCR. Esto significa que ambas posibilidades son válidas para medir esas proteínas a partir de que es capaz de medir por

igual las mismas mínimas cantidades diferentes de cero.

En el caso particular donde se observó una diferencia significativa en la especificidad fue la determinación de la albúmina en suero. Esto puede ser debido a que el anillo del inmunocomplejo precipitado es en general de un diámetro mayor en comparación con otras proteínas como la IgG y esto pudo haber afectado la delimitación del anillo por la cercanía de los otros anillos de precipitación. Para evitar esta dificultad se pudiera recomendar en este caso que se diluya la muestra de suero  $\frac{1}{2}$  para de esta forma disminuir el diámetro del inmunocomplejo precipitado y el resultado final cuando se traduzca la medida del diámetro a unidades de concentración g/L, se multiplica por la dilución previa que es 2 y se puede mejorar la especificidad de la innovación.

Para el diagnóstico neuroinmunológico es necesario procesar muestras tomadas simultáneamente de suero y LCR para evitar diferencias en el mapa inmunológico de ambos fluidos en un mismo paciente. El valor de estas determinaciones se puede emitir para conocer las concentraciones aisladas o ser introducidos en los reibergramas específicos para cada analito, el cual permite evaluar la respuesta inmune en el SNC y conocer el estado de la barrera sangre/LCR. Además, permite discriminar la fracción de determinada proteína sintetizada en el SNC de la que pasa a este fluido biológico por simple difusión.<sup>(1,7,8)</sup>

En tal sentido, gracias a esta innovación, y ante la no disponibilidad de placas en el mercado cubano, se ha podido caracterizar entidades atípicas nuevas en Cuba como las

manifestaciones neurológicas asociadas al virus del dengue<sup>(4)</sup> o de enfermedades emergentes como la meningoencefalitis eosinofílica por *Angiostrongylus cantonensis*.<sup>(5)</sup>

Este método permite además cuantificar otras proteínas específicas si se utilizan placas de Inmunodifusión preparadas para estimar estas. Por ejemplo, si se cuantifica albúmina y de otra proteína como IgG en suero y líquido cefalorraquídeo, se pueden calcular las razones líquido cefalorraquídeo/suero o razones de Reiber de cada proteína y llevarlas al correspondiente reibergrama que se emplea entre otras aplicaciones para comprobar la ocurrencia del síndrome de Guillain Barre o la existencia de un proceso neuroinflamatorio.<sup>(1,7,8)</sup>

Este método de igual manera auxilia el diagnóstico y seguimiento de enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis múltiple. Cuantificar la respuesta inmune en el sistema nervioso central aventaja a la determinación de bandas oligoclonales (a pesar de que estas tienen mayor sensibilidad que el propuesto) por ser un método cuantitativo. También permite trabajar en cualquier condición de barrera sin que esta situación interfiera con la medición del estado de respuesta neuroinmunológica.<sup>(1,8)</sup>

Aunque las lecturas de los anillos de precipitación pueden ser leídas a las 24 horas, el resultado

óptimo o más confiable resulta la lectura a las 72 horas. Esto pudiera ser una desventaja con respecto a otras determinaciones como los métodos turbidimétricos o nefelométricos. Sin embargo, estos últimos métodos necesitan equipos altamente costosos y cuyo mantenimiento representa una erogación de divisas importante para cualquier país, por lo que no se dispone de ellos de forma rutinaria.

Para los servicios especializados donde se manejan reducidos grupos de pacientes diariamente, el método de inmunodifusión radial simple en placas optimizadas permite duplicar el número de pacientes estudiados y no se necesita por ejemplo, disponer de un número específico de casos acumulados para procesar una placa completa, como ocurre con el método de ELISA.

Aunque esta innovación se realiza a partir de las placas que produce la firma Siemens (Marburg) se puede utilizar en otras placas de otras firmas comerciales como The Binding Site® (Birmingham) puesto que el principio es el mismo, el cual consiste en aprovechar los espacios de soporte, que contiene el gel de agarosa combinado con el antisuero específico, no utilizados por la interacción con el material biológico a cuantificar y que no muestre un inmunoprecipitado. En este sentido siempre se puede cuantificar un mayor número de muestras.

### CONCLUSIONES

Esta innovación permite hacer un uso óptimo de las placas de inmunodifusión con el consiguiente ahorro de material de importación y se puede aplicar fácilmente en todos los laboratorios del país, y aun fuera del mismo, que usan de forma

habitual este procedimiento técnico para la cuantificación de proteínas séricas y de otros líquidos biológicos con sensibilidad y especificidad aceptables.

## REREFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Reiber H. Cerebrospinal fluid data compilation and knowledge-based interpretation of bacterial, viral, parasitic, oncological, chronic inflammatory and demyelinating diseases. Diagnostic patterns not to be missed in neurology and psychiatry. *Arq Neuropsiquiatr.* 2016; 74(4):337-350.
2. Wildemann B, Oschmann P, Reiber H. Laboratory diagnosis in Neurology. Stuttgart: Thieme; 2010.
3. Choi Y, Lee S, Kwon SY, Lee Y, Park YK, Ban SJ. Analysis of the proficiency of single radial immunodiffusion assays for quality control of influenza vaccines in Korea. *Biologicals.* 2017 Nov[consultado 13/09/2018]; 50:137-140. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1045105617300969?via%3Dihub>
4. Padrón-González AA, González-Losada C, Dorta Contreras A. Empleo del Reibergrama en manifestaciones neurológicas del dengue. *Rev haban cienc méd.* 2017[consultado: 20/12/2017]; 16(5):711-719. Disponible en: <http://www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/2004>
5. Martini Robles L, Dorta Contreras AJ, editores. *Angiostrongylus cantonensis. Emergencia en América.* La Habana: Academia; 2016. 7-17.
6. Betancourt Loza M, Cordero Eiriz A, Peña Sánchez M, González García S, Lorigados Pedres L, González-Quevedo A. Cuantificación de la inmunoglobulina G y la albúmina en el líquido cefalorraquídeo mediante las modificaciones de las técnicas para otros fluidos biológicos. *Rev Cubana Neurol Neurocir.* [Internet]. 2016 [consultado 29/09/2018];6(1):9-16. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/revcubneuro/cnn-2016/cnn161b.pdf>
7. Reiber H. Knowledge-base for interpretation of cerebrospinal fluid data patterns. *Essentials in neurology and psychiatry. Arq Neuropsiquiatr.* 2016; 74(6): 501-512.
8. Reiber H. Polyspecific antibodies without persisting antigen in multiple sclerosis, neurolupus and Guillain-Barré syndrome: immune network connectivity in chronic diseases. *Arq Neuropsiquiatr.* 2017; 75(8):580-588.

### Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

### Contribución de autoría

Todos los autores participamos en la discusión de los resultados y hemos leído, revisado y aprobado el texto final del artículo.