

APLICACIÓN

El sistema de pruebas ELISA Epstein-Barr Virus Viral Capsid Antigen (EBV-VCA) IgG de ZEUS es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) diseñado para la detección cualitativa y semicuantitativa de anticuerpos tipo IgG contra el antígeno de la cápside viral del virus Epstein-Barr en suero humano. Este sistema de pruebas está diseñado para evaluar la presencia de evidencias serológicas de infección previa por el virus de Epstein-Barr, y es para uso diagnóstico *in vitro*.

IMPORTANCIA Y ASPECTOS GENERALES

El virus Epstein-Barr (VEB) es un virus humano ubicuo que produce la mononucleosis infecciosa (MI), una enfermedad linfoproliferativa autolimitada (1). Al llegar a la edad adulta, prácticamente todas las personas han sido infectadas y han desarrollado inmunidad contra el virus. En los países en vías de desarrollo, la seroconversión al virus tiene lugar en la primera infancia y suele ser asintomática (2). En los países más ricos, las infecciones primarias con VEB a menudo se demoran hasta la adolescencia o más tarde, y se manifiestan como MI en aproximadamente el 50% de este grupo de edad (3 - 5).

Tras la seroconversión, ya sea sintomática o no, el VEB establece una infección latente crónica en los linfocitos B, la cual dura probablemente toda la vida (6). El VEB se duplica en las células epiteliales orofaríngeas y se encuentra presente en la saliva de la mayoría de los pacientes con MI (7). Además, entre el 10% y el 20% de las personas sanas que son positivas para el anticuerpo del VEB eliminan el virus en sus secreciones orales (6 - 8). La reactivación del estado de portador de virus latente, como se evidencia por los índices aumentados de eliminación de virus, se intensifica cuando existe inmunosupresión, embarazo, desnutrición o enfermedad (8, 9). Las infecciones crónicas por VEB, ya sean latentes o activas, están rara vez asociadas con enfermedad. Sin embargo, se ha implicado al VEB al menos como factor contribuyente en la etiología del carcinoma nasofaríngeo, el linfoma de Burkitt y linfomas en pacientes inmunodeficientes (4, 8).

La prueba de Paul-Bunell-Davidson para anticuerpo heterófilo es altamente específica para MI (10). Sin embargo, entre el 10 y el 15% de adultos, y porcentajes más altos de niños y bebés, con infecciones primarias por VEB no desarrollan anticuerpos heterófilos (11). Se necesitan pruebas serológicas específicas de VEB para diferenciar infecciones primarias por VEB que son negativas para heterófilos de la enfermedad similar a la mononucleosis causada por otros agentes como citomegalovirus, adenovirus y *Toxoplasma gondii* (4).

Los títulos de anticuerpos para antígenos específicos del VEB se correlacionan con etapas diferentes de la MI (4, 10 - 12). Ambos anticuerpos (IgM e IgG) contra el antígeno de la cápside viral (ACV) muestran un pico entre las tres y cuatro semanas después de la infección primaria por el VEB. Los anticuerpos de tipo IgM anti-ACV disminuyen rápidamente y generalmente dejan de detectarse transcurridas 12 semanas. Los títulos de los anticuerpo de tipo IgG anti-ACV disminuyen lentamente después de alcanzar un pico y duran por tiempo indefinido. Los anticuerpos contra el antígeno nuclear del VEB (ANEV) se desarrollan entre uno y seis meses después de la infección, y al igual que los anticuerpos anti-ACV, persisten por tiempo indefinido (11, 12). Los anticuerpos contra el ANEB indican que la infección no fue reciente (11).

Los antígenos tempranos (AT) del VEB constan de dos componentes; el difuso (D) y el restringido (R). Los términos D y R reflejan los diferentes patrones de tinción inmunofluorescente exhibidos por los dos componentes (13, 14). Los anticuerpos contra los AT aparecen de forma transitoria y duran hasta tres meses durante la fase aguda de la MI en el 85% de los pacientes (15, 16). La respuesta de anticuerpos contra AT en los pacientes con MI generalmente es contra el componente D, mientras que la seroconversión silente al VEB en niños produce anticuerpos contra el componente R (5, 11). Se puede hacer un diagnóstico definitivo de una infección primaria por VEB con el 95% de los sueros de fase aguda basándose en la detección de anticuerpos contra ACV, ANEB y AT (12).

Niveles elevados de anticuerpos anti-ACV conjuntamente con anticuerpos anti-ANEV y anti-AT-R se asocian con la reactivación del estado de portador del virus latente (16, 17). Las investigaciones muestran niveles elevados de IgG anti-ACV en los sueros de pacientes con inmunodeficiencias (6, 18), parotiditis recurrente (19), esclerosis múltiple (20) y carcinoma nasofaríngeo (21), así como en pacientes inmunosuprimidos (8, 22), mujeres embarazadas (23) y personas de edad avanzada (17).

El rastreo de la presencia de anticuerpos contra el ACV y antígenos relacionados del VEB puede proporcionar información importante para el diagnóstico de la infección por VEB. La inmunofluorescencia indirecta ha sido el método serológico más utilizado para detectar anticuerpos contra los antígenos del VEB (11). Sin embargo, el procedimiento ELISA, descrito por primera vez por Engvall y Perlman (24, 25) puede ser un método sensible y fiable para la detección de anticuerpos contra los antígenos del VEB (26, 27). El procedimiento ELISA permite una determinación objetiva del estado de los anticuerpos en una sola dilución de la muestra de la prueba y es adecuado para analizar grandes cantidades de muestras de pacientes.

FUNDAMENTO DE LA PRUEBA

El sistema de pruebas ELISA Epstein-Barr Virus Viral Capsid Antigen (EBV-VCA) IgG de ZEUS está diseñado para detectar anticuerpos de tipo IgG contra el virus de Epstein-Barr en suero humano. La creación de los pocillos sensibilizados de las tirillas de micropocillos de plástico se llevó a cabo mediante adsorción pasiva con antígeno del VEB. El procedimiento comprende tres pasos de incubación:

1. Los sueros de la prueba (debidamente diluidos) se incuban en micropocillos revestidos de antígeno. Los anticuerpos contra antígeno específico que existan en la muestra se fijarán al antígeno inmovilizado. La placa se lava para eliminar el anticuerpo no fijado y otros componentes séricos.
2. Se agrega anti-IgG humana de cabra conjugada con peroxidasa a los pocillos y se incuban la placa. El conjugado reaccionará con el anticuerpo de tipo IgG inmovilizado en la fase sólida del paso 1. Se lavan los micropocillos para eliminar el conjugado que no haya reaccionado.
3. Los micropocillos que contienen conjugado de peroxidasa inmovilizado se incuban con solución de sustrato de peroxidasa. La hidrólisis del sustrato por la peroxidasa produce un cambio de color. Transcurrido un tiempo, se detiene la reacción y se mide fotométricamente la intensidad del color de la solución. La intensidad del color de la solución depende de la concentración de anticuerpos en la muestra original analizada.

COMPONENTES DEL SISTEMA DE PRUEBAS

Materiales suministrados:

Cada sistema de pruebas contiene los siguientes componentes en cantidad suficiente para realizar el número de pruebas indicado en la etiqueta del envase. **NOTA: los siguientes componentes contienen como conservante azida de sodio a una concentración de <0,1% (p/v): controles, calibrador y SAVE Diluent®.**

Componente	Σ_{96}	Σ_{480}	Descripción
PLATE	1	5	Placa: 96 micropocillos distribuidos en doce tirillas de 1x8 micropocillos recubiertos con el antígeno desactivado del ACV del virus de Epstein-Barr. Las tirillas se suministran envasadas en un soporte y selladas en un sobre con desecante.
CONJ	1	5	Conjugado: anti-IgG humana de cabra conjugada con peroxidasa de rábano (específica de la cadena Fc) en frasco(s) de 15 ml con tapón blanco. Listo para usar.
CONTROL +	1	2	Control positivo (suero humano): vial(es) de 0,35 ml con tapón rojo.
CAL	1	4	Calibrador (suero humano): vial(es) de 0,5 ml con tapón azul.
CONTROL -	1	2	Control negativo (suero humano): vial(es) de 0,35 ml con tapón verde.

DIL	SPE	1	4	Diluyente SAVe Diluent®: frasco(s) de 30 ml con tapón verde con Tween 20, albúmina sérica bovina y solución salina tamponada con fosfato. Listo para usar. NOTA: El diluyente SAVe Diluent® cambiará de color cuando se combine con suero.
SOLN	TMB	1	5	TMB: frasco(s) de 15 ml de color ámbar con tapón ámbar que contiene 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). Listo para usar.
SOLN	STOP	1	3	Solución para detener la reacción: frasco(s) de 15 ml con tapón rojo con H ₂ SO ₄ 1 M y HCl 0,7 M. Listo para usar.
WASHBUF	10X	1	5	Tampón de lavado concentrado (10X): diluir 1 parte del concentrado + 9 partes de agua desionizada o destilada. Frasco(s) de 100 ml con tapón transparente que contiene solución salina tamponada con fosfato concentrada 10X y Tween 20 (solución azul). NOTA: la solución 1X tendrá un pH de 7,2 ± 0,2.

NOTAS:

- Los siguientes componentes no dependen del número de lote del sistema de pruebas y se pueden usar indistintamente con cualquier sistema de pruebas ELISA de ZEUS: TMB, solución para detener la reacción y tampón de lavado. El diluyente SAVe Diluent® se puede usar indistintamente con cualquier sistema de pruebas ELISA de ZEUS utilizando el n.º de producto 005CC.
- El sistema de pruebas también contiene una etiqueta de componentes que contiene información específica de lote dentro de la caja del sistema de pruebas.

PRECAUCIONES

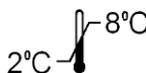
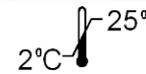
- Para uso diagnóstico *in vitro*.
- Se deben seguir las precauciones normales que se utilizan para manipular reactivos de laboratorio. En caso de contacto con los ojos, enjuague inmediatamente con abundante agua y busque asistencia médica. Utilice ropa de protección adecuada, guantes y protección para la cara/ojos. No inhale los vapores. Deshágase de los desechos observando todas las normativas locales, regionales y nacionales.
- Los micropocillos de la placa ELISA no contienen microorganismos viables. No obstante, considere las tirillas **material con potencial riesgo biológico** y manipúlelas de manera acorde.
- Los controles son **material con potencial riesgo biológico**. Los materiales a partir de los cuales se obtuvieron estos productos resultaron negativos para el antígeno del VIH-1, el HBsAg y para anticuerpos contra el VHC y el VIH por métodos de prueba homologados. Sin embargo, dado que ningún método de prueba puede ofrecer una garantía total de que no hay agentes infecciosos, estos productos deberán manipularse con un Nivel de bioseguridad 2, tal como se recomienda para cualquier muestra de sangre o suero humano potencialmente infeccioso en el manual de Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos) de los Centros para el Control de Enfermedades / Institutos Nacionales de la Salud: última edición; y en la Norma de la OSHA sobre Patógenos que se transmiten en la sangre (28).
- Para lograr resultados precisos, es esencial cumplir estrictamente los tiempos y temperaturas de incubación especificados. **Se debe dejar que todos los reactivos alcancen temperatura ambiente (20-25 °C) antes de comenzar el ensayo.** Los reactivos no utilizados deben devolverse a temperatura de refrigeración inmediatamente después de su uso.
- Un lavado inadecuado podría ocasionar resultados de falsos positivos o falsos negativos. Debe reducirse al mínimo la cantidad de solución de lavado residual (p. ej., mediante secado o aspiración) antes de añadir el conjugado o el sustrato. No permita que los pocillos se sequen entre una incubación y la siguiente.
- El diluyente SAVe Diluent®, los controles, y el calibrador contienen azida sódica en una concentración de <0,1% (p/v). Se ha descrito la formación de azidas de plomo o cobre a partir de la azida de sodio en tuberías de laboratorio, lo cual puede causar explosiones al martillar las tuberías. Para evitarlo, enjuague bien el lavado con agua después de eliminar las soluciones que contengan azida de sodio.
- La solución para detener la reacción es TÓXICA por inhalación, por contacto con la piel o en caso de ingestión. Provoca quemaduras. En caso de accidente o si se siente mal, solicite asistencia médica inmediatamente.
- La solución de TMB es NOCIVA. Irritante para los ojos, el sistema respiratorio y la piel.
- La solución concentrada del tampón de lavado es IRRITANTE. Irritante para los ojos, el sistema respiratorio y la piel.
- Limpie el fondo de la placa de todo residuo de líquido o huellas de los dedos que puedan alterar las lecturas de la densidad óptica (DO).
- La dilución o adulteración de estos reactivos puede generar resultados erróneos.
- No utilice reactivos de otro origen o fabricante.
- La solución de TMB debe ser incolora o de color amarillo muy claro, verde muy claro o azul muy claro al utilizarla. La contaminación de TMB con el conjugado u otros oxidantes hará que la solución cambie de color prematuramente. No utilice la solución de TMB si tiene un color azul intenso.
- Nunca pipetee con la boca. Evite el contacto de los reactivos y las muestras de pacientes con la piel y las membranas mucosas.
- Evite la contaminación microbiana de los reactivos. Esto puede ocasionar resultados incorrectos.
- La contaminación cruzada de reactivos y/o muestras podría ocasionar resultados erróneos.
- Los instrumentos de vidrio reutilizables se deben lavar y enjuagar cuidadosamente para eliminar cualquier residuo de detergente.
- Evite las salpicaduras o la formación de aerosoles.
- No exponga los reactivos a la luz intensa durante el almacenamiento o la incubación.
- Permita que las tirillas de micropocillos y su soporte alcancen la temperatura ambiente antes de abrir el sobre protector, a fin de evitar la condensación en los micropocillos.
- Recoja la solución de lavado en un lavabo de eliminación. Trate la solución de desecho con desinfectante (es decir: 10 % de lejía de uso doméstico - 0,5 % de hipoclorito de sodio) Evite la exposición de los reactivos a los vapores de la lejía.
- Precaución: neutralice cualquier desecho líquido con pH ácido antes de agregarlo a la solución de lejía.
- No utilice la placa ELISA si la tirilla indicadora del sobre de desecante ha cambiado de azul a rosado.
- No permita que el conjugado entre en contacto con recipientes o instrumentos que hayan podido contener previamente una solución que utilice azida de sodio como conservante. Los residuos de azida de sodio pueden destruir la actividad enzimática del conjugado.
- No exponga ninguno de los reactivos a soluciones que contengan lejía o a ningún olor fuerte de soluciones que contengan lejía. Los restos de lejía (hipoclorito de sodio), incluso a nivel de trazas, pueden destruir la actividad biológica de muchos de los reactivos incluidos en este sistema de pruebas.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Lector de micropocillos ELISA capaz de leer a una longitud de onda de 450 nm. **NOTA: Se podrá usar un lector de longitud de onda única (450 nm) o doble (450/620 - 650 nm). Es preferible la longitud de onda doble, puesto que el filtro de referencia adicional está configurado para disminuir posibles interferencias derivadas de anomalías capaces de absorber luz.**
- Pipetas capaces de dispensar con exactitud entre 10 y 200 µl.
- Pipeta multicanal capaz de dispensar con exactitud entre 50 y 200 µl.
- Depósitos de reactivos para pipetas multicanal.
- Frasco de lavado o sistema de lavado de micropocillos.
- Agua destilada o desionizada.
- Probeta graduada de un litro.
- Pipetas serológicas.
- Puntas de pipeta desechables.
- Toallas de papel.
- Cronómetro de laboratorio para controlar las etapas de incubación.

12. Recipiente para desechos y desinfectante (es decir: 10 % de lejía de uso doméstico - 0,5 % de hipoclorito de sodio)

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

	Tirillas de micropocillos revestidos: vuelva a sellar inmediatamente las tirillas sobrantes con el secante y devuélvalas al lugar adecuado de almacenamiento. Una vez abiertas, las tirillas son estables durante 60 días siempre y cuando las tirillas indicadoras del envase del desecante permanezcan de color azul.
	Conjugado: NO CONGELAR.
	Sistema de pruebas, calibrador, control positivo, control negativo, TMB y diluyente SAVE Diluent® sin abrir
	Solución para detener la reacción: 2 - 25°C Tampón de lavado (1X): hasta 7 días entre 20 y 25 °C o durante 30 días entre 2 y 8 °C. Tampón de lavado (10X): 2 - 25°C

RECOGIDA DE LAS MUESTRAS

- ZEUS Scientific recomienda que el usuario realice la recolección de muestras conforme al documento M29 del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI): Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease (Protección de los trabajadores de laboratorio frente a las enfermedades infecciosas).
- Ningún método de prueba puede ofrecer una garantía completa de que las muestras de sangre humana no transmitirán infecciones. Por lo tanto, todos los derivados de la sangre deben considerarse potencialmente infecciosos.
- Con este ensayo solamente deben utilizarse sueros recién extraídos y debidamente refrigerados que se hayan obtenido mediante procedimientos homologados de venopunción aséptica (27, 28). No los utilice si se han agregado anticoagulantes o conservantes. Evite utilizar sueros hemolizados, lipémicos o contaminados con bacterias.
- Almacene la muestra a temperatura ambiente durante un lapso no superior a las 8 horas. Si la prueba no se realiza dentro de las 8 horas, el suero puede almacenarse a entre 2 - 8 °C, durante un lapso no superior a las 48 horas. Si tiene previsto retrasar la realización de la prueba, conserve los sueros de la prueba a -20 °C o a temperaturas inferiores. Evite múltiples ciclos de congelación/descongelación que puedan ocasionar la pérdida de actividad de los anticuerpos y dar lugar a resultados erróneos. Es responsabilidad del laboratorio individual usar todas las referencias disponibles o sus propios estudios para determinar los criterios de estabilidad para su laboratorio (32).

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

- Retire los componentes individuales del kit del almacenamiento y permita que alcancen la temperatura ambiente (20 - 25 °C).
- Determine el número de micropocillos necesarios. Calcule seis determinaciones de control o calibrador (un blanco de reactivo, un control negativo, tres calibradores y un control positivo) por serie. En cada prueba se debe analizar un blanco de reactivo. Compruebe que las configuraciones de controles y calibrador sean correctas en los requisitos del programa y del lector. Devuelva las tirillas no usadas a la bolsa resellable con desecante, séllela y devuélvala a su almacenamiento entre 2 y 8 °C.

EJEMPLO DE CONFIGURACIÓN DE LA PLACA		
	1	2
A	Blanco	Paciente 3
B	Control negativo	Paciente 4
C	Calibrador	etc.
D	Calibrador	
E	Calibrador	
F	Control positivo	
G	Paciente 1	
H	Paciente 2	

- Prepare una dilución 1:21 (por ejemplo: 10 µl de suero + 200 µl de diluyente SAVE Diluent®) del control negativo, del calibrador, del control positivo y de cada suero de paciente. **NOTA: el diluyente SAVE Diluent® sufrirá un cambio de color, lo cual confirma que la muestra se ha combinado con el diluyente.**
- A cada micropocillo se añaden 100 µl de cada control diluido, calibrador y muestra de paciente. Compruebe que las muestras estén bien mezcladas. Utilice una punta de pipeta diferente para cada muestra.
- Añada 100 µl de diluyente SAVE Diluent® al micropocillo A1 como blanco de reactivo. Compruebe que la configuración del micropocillo del blanco de reactivo sea correcta en los requisitos del programa y del lector.
- Incube la placa a temperatura ambiente (20 - 25 °C) durante 25 ± 5 minutos.
- Lave las tirillas de micropocillos 5 veces.
 - Procedimiento de lavado manual:**
 - Agite la placa para eliminar el líquido de todos los micropocillos.
 - Llene cada micropocillo con solución tampón de lavado. Asegúrese de que no queden burbujas de aire atrapadas en los micropocillos.
 - Repita los pasos 1. y 2. para un total de 5 lavados.
 - Agite la placa para eliminar la solución de lavado de todos los micropocillos. Invierta la placa sobre una toalla de papel y dele unos golpes secos para eliminar cualquier residuo de solución de lavado de los micropocillos. Inspeccione visualmente la placa para asegurarse de que no queden residuos de la solución de lavado. Recoja la solución de lavado en un recipiente desechable y trátela con desinfectante al final de la jornada de trabajo.
 - Procedimiento de lavado automático:**
Si está utilizando un sistema automático de lavado, ajuste el volumen dispensado en 300-350 µl/micropocillo. Ajuste el ciclo de lavado para 5 lavados, sin interrupción entre los mismos. En caso necesario, se puede extraer la placa de micropocillos del lavador, invertirla sobre una toalla de papel y golpearla con firmeza para eliminar cualquier residuo de solución de lavado de los micropocillos.
- Agregue 100 µl de conjugado a cada micropocillo, incluido el micropocillo del blanco de reactivo, a la misma velocidad y en el mismo orden en que se agregaron las muestras.
- Incube la placa a temperatura ambiente (20 - 25 °C) durante 25 ± 5 minutos.
- Lave los micropocillos siguiendo el procedimiento descrito en el paso 7.
- Agregue 100 µl de TMB a cada micropocillo, incluido el micropocillo del blanco de reactivo, a la misma velocidad y en el mismo orden en que se agregaron las muestras.
- Incube la placa a temperatura ambiente (20 - 25 °C) entre 10 y 15 minutos.
- Detenga la reacción añadiendo 50 µl de la solución para detener la reacción a cada micropocillo, incluido el micropocillo del blanco de reactivo, a la misma velocidad y en el mismo orden en que se agregó la TMB. Las muestras positivas cambiarán de azul a amarillo. Después de agregar la solución para detener la reacción, dé unos cuantos golpes secos a la placa para asegurarse de que las muestras estén bien mezcladas.
- Ajuste la longitud de onda del lector de micropocillos a 450 nm y mida la densidad óptica (DO) de cada micropocillo con respecto al blanco de reactivo. Lea la placa en los 30 minutos posteriores a la adición de la solución para detener la reacción.

PROCEDIMIENTO DE PRUEBA ABREVIADO

1. Diluya el suero 1:21.
2. Añada la muestra diluida al micropocillo - 100 µl/micropocillo.
3. → Incube durante 25 ± 5 minutos.
4. Lave.
5. Añada el conjugado - 100 µl/micropocillo.
6. → Incube durante 25 ± 5 minutos.
7. Lave.
8. Añada la TMB - 100 µl/micropocillo.
9. → Incube durante 10 - 15 minutos.
10. Añada la solución para detener la reacción - 50 µl/micropocillo - Mezcle.
11. LEA en el transcurso de 30 minutos.

CONTROL DE CALIDAD

1. El calibrador se debe analizar por triplicado cada vez que se realiza esta prueba. También se deben incluir un blanco de reactivo, el control negativo y el control positivo.
2. Calcule la media de los micropocillos de los tres calibradores. Si alguno de los tres valores difiere de la media más del 15%, deséchelo y calcule la media de los dos valores restantes.
3. El valor medio de la DO del calibrador, del control negativo y del control positivo deben quedar dentro de los intervalos siguientes:

	<u>Intervalo de DO</u>
Control negativo	≤ 0,250
Calibrador	≥ 0,300
Control positivo	≥ 0,500

- a. El valor de la DO para el control negativo dividido entre la media de la DO del calibrador debe ser ≤ 0,9.
 - b. El valor de la DO para el control positivo dividido entre la media de la DO del calibrador debe ser ≥ 1,25.
 - c. Si no se cumplen las condiciones anteriores, la prueba no se debe considerar válida y se debe repetir.
4. Los controles negativo y positivo sirven para verificar fallos sustanciales de los reactivos, pero no aseguran la precisión en el límite de referencia de la prueba.
 5. Es posible analizar controles adicionales siguiendo las directrices o los requisitos de las normativas locales, regionales o nacionales, o de las organizaciones acreditadas.
 6. Consulte el documento C24 del CLSI: Statistical Quality Control for Quantitative Measurement Procedures (Control de calidad estadístico para procedimientos de determinación cuantitativa) para obtener información sobre las prácticas de control de calidad apropiadas.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

1. Cálculos

- a. *Factor de corrección:* El fabricante ha determinado un valor de DO como límite de referencia para las muestras positivas y lo ha correlacionado con el calibrador. El factor de corrección (FC) permite calcular el límite de referencia de las muestras positivas. Asimismo, permite corregir las pequeñas variaciones cotidianas de los resultados de las pruebas. El factor de corrección se determina para cada lote de componentes del kit y está impreso en la etiqueta de componentes que se encuentra en la caja del sistema de pruebas.
- b. *Límite de referencia de la DO:* Para obtener el límite de referencia de la DO, multiplique el FC por la media de la DO del calibrador determinado anteriormente.
(FC x media de DO del calibrador = límite de referencia de la DO)
- c. *Valores índice/cocientes de DO:* Calcule el valor índice/cociente de DO de cada muestra dividiendo su valor de DO por el límite de referencia de la DO del paso b.

Ejemplo:	DO media del calibrador	=	0,793
	Factor de corrección (FC)	=	0,25
	Límite de referencia de la DO	=	0,793 x 0,25 = 0,198
	DO de muestra desconocida	=	0,432
	Valor índice/cociente de DO de la muestra	=	0,432/0,198 = 2,18

2. **Interpretaciones:** Los valores índice/cocientes de DO se interpretan como se indica a continuación:

	<u>Valor índice/cociente de DO</u>
Muestras negativas	≤0,90
Muestras dudosas	0,91 a 1,09
Muestras positivas	≥1,10

- a. Un cociente de DO ≤ 0,90 indica que no se ha detectado una cantidad significativa de anticuerpos de tipo IgG contra ACV-VEB. Un resultado negativo indica que no hay, ni hubo, una infección anterior por VEB. Se presupone que tales individuos son susceptibles de sufrir una infección primaria.
- b. Un cociente de DO ≥ 1,10 indica que se han detectado anticuerpos de tipo IgG específicos contra ACV-VEB. Un resultado positivo de la prueba indica una infección activa o anterior por VEB.
- c. Las muestras con cociente de DO en el margen de resultado dudoso (0,91-1,09) deberán volver a analizarse por duplicado. Documente cualesquiera dos de los tres resultados que concuerden. Repita la evaluación de las muestras dudosas utilizando un método serológico alternativo y/o repita la evaluación extrayendo otra muestra entre una y tres semanas más tarde.
- d. No existe un patrón internacional para IgG de ACV-VEB, por lo que el valor de asignación de los calibradores y controles se basó en un preparado interno de referencia.

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

1. La mayoría (80%) de los individuos con MI presentan títulos pico anti-ACV tipo IgG antes de consultar a un médico (4). Por lo tanto, en la mayoría de los pacientes con MI no resulta útil analizar por pares sueros agudos y sueros de convalecientes para detectar cambios significativos en los niveles de anticuerpos (4).
2. El título de anticuerpos de una sola muestra de suero no se puede usar para determinar una infección reciente. Los resultados de la prueba de anti-ACV se deben interpretar de forma conjunta con la evaluación clínica y con los resultados de las pruebas de anticuerpos para otros antígenos del VEB (por ejemplo, ANEB, AT e IgM anti-ACV).

RESULTADOS ESPERADOS

Toda persona inmunocompetente infectada por el VEB produce anticuerpos frente al ACV (6). Ambos anticuerpos IgM e IgG frente al ACV aparecen rápidamente después de la infección y alcanzan los títulos máximos entre tres y cuatro semanas (4). Los títulos de anticuerpo IgG frente al ACV disminuyen lentamente después de alcanzar un pico y persisten indefinidamente (15). La infección aguda primaria por VEB está indicada por la presencia de anticuerpos IgG contra el ACV acoplados con anti-AT o IgM anti-ACV y la ausencia de anticuerpos contra ANEB (4,11). La presencia de IgG anti-ACV y anti-ANEB indica que la infección no es reciente (4,11). La incidencia de infección por VEB varía con la edad y el estado socioeconómico (6). En los países subdesarrollados, las personas adquieren el VEB en la primera infancia y la infección es habitualmente asintomática (2,4). En un estudio desarrollado en los Estados Unidos, aproximadamente el 50% de los estudiantes nuevos de una Sistema de pruebas EBV-VCA IgG

facultad fue positivo al VEB (30). En un estudio realizado por técnicos de ZEUS Scientific con 135 muestras normales procedentes del sudeste de los Estados Unidos, 134/135 muestras fueron positivas con el sistema de pruebas ELISA EBV-VCA IgG de ZEUS y con el sistema de pruebas IFA EBV-VCA IgG de ZEUS. En otro estudio realizado con 32 muestras pediátricas normales, 32/32 muestras fueron negativas tanto con el sistema de pruebas ELISA EBV-VCA IgG de ZEUS como con el sistema de pruebas IFA EBV-VCA IgG de ZEUS. El número de sujetos con anticuerpos IgG contra el ACV-VEB varía con la edad y el nivel socioeconómico. ZEUS Scientific recomienda que cada laboratorio establezca sus propios valores esperados según el tipo de población que estudie habitualmente.

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

1. Estudio comparativo

Se ha realizado un estudio para comparar el sistema de pruebas ELISA EBV-VCA IgG de ZEUS con otro sistema de pruebas ELISA comercial para la detección de anticuerpos IgG contra el ACV-VEB. Se obtuvo un total de 199 muestras de suero de dos centros de donantes de plasma y de un laboratorio de referencia. Los resultados se resumen a continuación.

Tabla 1: Comparación entre el sistema de pruebas ELISA EBV-VCA IgG de ZEUS y un EBV-VCA IgG ELISA comercial

		Sistema de pruebas ELISA EBV-VCA IgG de ZEUS			Total
		Positivo	Negativo	Dudoso*	
ELISA EBV-VCA IgG comercial	Positivo	104	8**	3	115
	Negativo	10**	46	4	60
	Dudoso*	11	12	1	24
	Total	125	66	8	199

Sensibilidad relativa: $104/112 = 92,9\%$

Especificidad relativa: $46/56 = 82,1\%$

Porcentaje de concordancia: $150/168 = 89,3\%$

*Las muestras dudosas no se incluyeron en los cálculos.

**Resultados discrepantes.

En la Tabla 2 siguiente se incluyen los resultados de la repetición del análisis de las muestras discrepantes mediante el sistema de pruebas IFA EBV-VCA IgG de ZEUS:

Tabla 2: Análisis de los resultados discrepantes

ID de la muestra	Sistema de pruebas ELISA EBV-VCA IgG de ZEUS	VCA-IgG ELISA comercial	Sistema de pruebas IFA EBV-VCA IgG de ZEUS
26	0,251	1,16	-
29	0,261	1,00	-
38	0,358	1,00	-
39	0,368	1,13	-
41	0,391	1,30	-
53	0,582	1,05	-
63	0,767	1,10	+
34	0,797	1,30	+
81	1,243	0,65	+
83	1,270	0,70	+
89	1,399	0,73	+
93	1,449	0,39	-
101	1,614	0,57	+
111	1,859	0,60	+
133	2,216	0,48	+
137	2,254	0,75	+
139	2,320	0,77	+
152	2,730	0,20	+

Resumen:

- Ocho muestras fueron negativas con el método ELISA de ZEUS y positivas con el método VCA IgG ELISA comercial. Se confirmó que seis de estas muestras eran negativas con el método IFA de ZEUS.
- Diez muestras fueron positivas con el método ELISA de ZEUS y negativas con el método VCA IgG ELISA comercial. Se confirmó que nueve de estas muestras eran positivas con el método IFA de ZEUS.
- Según la resolución de las muestras discrepantes por IFA, se volvió a calcular la sensibilidad relativa, especificidad relativa y concordancia porcentual. Estos resultados se recogen en la Tabla 3:

Tabla 3: Nuevo cálculo de sensibilidad relativa, especificidad y porcentaje de concordancia

Sensibilidad relativa:	$113/115 = 98,3\%$
Especificidad relativa	$52/53 = 98,1\%$
Porcentaje de concordancia:	$165/168 = 98,2\%$

2. Reproducibilidad

Para evaluar la variabilidad del procedimiento de prueba intraensayo e interensayos, técnicos analizaron cinco muestras de suero que iban desde positivo hasta negativo usando dos lotes maestros diferentes del producto. En cada uno de los tres días, un técnico analizó cada muestra una vez al día, ocho veces cada una, en cada lote maestro. Un responsable calculó el cociente de DO medio y el coeficiente de variación de los datos resultantes. Los resultados intraensayo e interensayos se ilustran en la Tabla 4 (Lote A) y en la Tabla 5 (Lote B). La Tabla 6 resume la variabilidad global de la prueba combinando los datos de comparación entre lotes y entre días.

Tabla 4: Resumen del análisis de variabilidad de la prueba ELISA EBV-VCA IgG de ZEUS intraensayo e interensayos

Lote A	Día 1			Día 2			Día 3			Cociente medio	DE	% CV
	Cociente medio	DE	% CV	Cociente medio	DE	% CV	Cociente medio	DE	% CV			
1. Dudoso	0,96	0,04	4,2	0,77	0,04	5,2	0,99	0,04	4,0	0,91	0,10	11,0
2. Positivo bajo	1,53	0,12	7,8	1,29	0,11	8,5	1,51	0,07	4,6	1,44	0,15	10,4
3. Positivo bajo	1,33	0,11	8,3	1,12	0,10	8,9	1,25	0,04	3,2	1,23	0,12	9,8
4. Positivo bajo	1,52	0,12	7,9	1,12	0,09	8,0	1,43	0,12	8,4	1,36	0,21	15,4
5. Negativo	0,15	0,03	20,0	0,11	0,02	18,2	0,15	0,02	13,3	0,14	0,03	21,4

Tabla 5: Resumen del análisis de variabilidad de la prueba ELISA EBV-VCA IgG de ZEUS intraensayo e interensayos

Lote B	Día 1			Día 2			Día 3			Cociente medio	DE	% CV
	Muestra	Cociente medio	DE	% CV	Cociente medio	DE	% CV	Cociente medio	DE			
1. Dudoso	1,03	0,06	5,8	0,97	0,06	6,2	1,11	0,07	6,3	1,04	0,08	7,7
2. Positivo bajo	1,38	0,09	6,5	1,38	0,03	2,2	1,29	0,08	6,2	1,35	0,09	6,7
3. Positivo bajo	1,48	0,10	6,8	1,44	0,02	1,4	1,34	0,05	3,7	1,42	0,09	6,3
4. Positivo bajo	1,69	0,14	8,3	1,55	0,12	7,7	1,49	0,10	6,7	1,58	0,15	9,5
5. Negativo	0,28	0,02	7,1	0,22	0,02	9,1	0,24	0,03	12,5	0,25	0,03	12,0

Tabla 6: Resumen del estudio de variabilidad de la prueba ELISA EBV-VCA IgG de ZEUS combinando los lotes A y B (n= 48)*

Muestra	Cociente medio	DE	% CV
1. Dudoso	0,97	0,11	11,9
2. Positivo bajo	1,40	0,13	9,5
3. Positivo bajo	1,32	0,14	10,9
4. Positivo bajo	1,47	0,21	14,5
5. Negativo	0,19	0,06	32,2

*La variabilidad se estudió analizando ocho pocillos por muestra de dos lotes diferentes en tres días distintos. Estos datos representan una recopilación de los datos de las Tablas 4 y 5.

3. Reactividad cruzada

Se han realizado estudios para evaluar interferencias en el sistema de pruebas ELISA EBV-VCA IgG de ZEUS utilizando sueros negativos para anticuerpos contra el ACV-VEB y positivos contra los antígenos nucleares (n= 9) y los siguientes virus herpes:

VHS-1 IgG	(n=8)
VHS-2 IgG	(n=6)
VZV IgG	(n=10)
CMV IgG	(n=6)

Estos estudios indican que la interferencia del procedimiento de la prueba con las reactividades enumeradas anteriormente es mínima.

REFERENCIAS

- Rapp CE, and Heweston JF: Infectious mononucleosis and the Epstein-Barr virus. *Am. J. Dis. Child.* 132:78, 1978.
- Biggar RJ, Henle W, Fleisher G, Bocker J, Lennette ET, and Henle G: Primary Epstein-Barr virus infections in African infants. I: Decline of maternal antibodies and time of infection. *Int. J. Cancer.* 22:239, 1978.
- Fry J: Infectious mononucleosis: Some new observations from a 15 year study. *J. Fam. Prac.* 10:1087, 1980.
- Lennette ET: Epstein-Barr virus. In: *Manual of Clinical Microbiology*, 4th edition. Lennette ET, Balows A, Hausler WJ, Shadomy HJ, eds. Washington DC, American Society for Microbiology, p. 326, 1987.
- Fleisher G, Henle W, Henle G, Lennette ET, and Biggar RJ: Primary infection with Epstein-Barr virus in infants in the United States: Clinical and Serological Observations. *J. Infect. Dis.* 139:553, 1979.
- Merlin TL: Chronic mononucleosis: Pitfalls in the laboratory diagnosis. *Hum. Path.* 17:2, 1986.
- Sixbey JW, Nedrud JG, Raab-Traub N, Hanes RA, Pagano JS: Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells. *New Eng. J. Med.* 310:1225, 1984.
- Chang RS, Lewis JP, Reynolds RD, Sullivan MJ, Neuman J: Oropharyngeal excretion of Epstein-Barr virus by patients with lymphoproliferative disorders and by recipients of renal homografts. *Ann. Intern. Med.* 88:34, 1978.
- Jones JF, Ray G, Minnich LL, Hicks MJ, Kibler R, Lucus DO: Evidence of active Epstein-Barr virus infection in patients with persistent, unexplained illness. Elevated anti-early antigen antibodies. *Ann. Intern. Med.* 102:1, 1985.
- Evans AS, Neiderman JC, Cenabre LC, West B, and Richards VA: A prospective evaluation of heterophile and Epstein-Barr virus-specific IgM antibody tests in clinical and subclinical infectious mononucleosis: Specificity and sensitivity of the tests and persistence of antibody. *J. Infect. Dis.* 132:546, 1975.
- Henle W, Henle GE, and Horowitz CA: Epstein-Barr virus specific diagnostic tests in infectious mononucleosis. *Hum. Path.* 5:551, 1974.
- Lennette ET, and Henle W: Epstein-Barr virus infections: Clinical and serological features. *Lab Management.* p. 23, June, 1987.
- Reedman BM, and Klein G: Cellular localization of an Epstein-Barr virus (EBV) associated complement-fixing antigen in producer and non-producer lymphoblastoid cell lines. *Int. J. Cancer* 11:499, 1973.
- Henle G, Henle W, and Horowitz CA: Antibodies to Epstein-Barr virus-associated nuclear antigen in infectious mononucleosis. *J. Infect. Dis.* 130:231, 1974.
- Horowitz CA, Henle W, Henle G, Rudnick H, and Lutts E: Long-term serological follow-up of patients for Epstein-Barr virus after recovery from infectious mononucleosis. *J. Infect. Dis.* 151:1150, 1985.
- Horowitz CA, Henle W, Henle G, and Schmitz H: Clinical evaluation of patients with infectious mononucleosis and development of antibodies to the R component of the Epstein-Barr virus-induced early antigen complex. *Am. J. Med.* 58:330, 1975.
- Sumaya CV: Endogenous reactivation of Epstein-Barr virus infections. *J. Infect. Dis.* 135:374, 1977.
- Joncas J, Lapointe N, Gervais F, Leyritz M, and Wills A: Unusual prevalence of antibodies to Epstein-Barr virus early antigen in ataxia telangiectasia. *Lancet* 1: 1160, 1977.
- Akaboshi I, Jamamoto J, Katsuki T, and Matsuda I: Unique pattern of Epstein-Barr virus specific antibodies in recurrent parotitis. *Lancet* 2:1049, 1983.
- Larson PD, Bloomer LC, and Brag PF: Epstein-Barr nuclear antigen and viral capsid antigen antibody titers in multiple sclerosis. *Neurology* 35: 435, 1985.
- Henle W, Ho H-C, Henle G, and Kwan HC: Antibodies to Epstein-Barr virus related antigens in nasopharyngeal carcinoma. Comparison of active cases with long-term survivors. *J. Natl. Cancer Inst.* 51:361, 1973.
- Henle W, and Henle G: Epstein-Barr virus-specific serology in immunologically compromised individuals. *Cancer Res.* 41:4222, 1981.
- Fleisher G, and Bolognese R: Persistent Epstein-Barr virus infection and pregnancy. *J. Infect. Dis.* 147:982, 1983.
- Engvall E and Perlman P: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochem.* 8:871-874, 1971.

25. Engvall E and Perlman P: Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen coated tubes. J. Immunol. 109:129-135, 1972.
26. Voller A, Bartlett A, and Bidwell DE: Enzyme immunoassays with special reference to ELISA technique. J. Clin. Pathol. 31:507-520, 1978.
27. Hopkins RF, Witmer TJ, Neubauer RH, and Rabin H: Detection of antibodies to Epstein-Barr virus antigens by enzyme-linked immunosorbent assay. J. Infect. Dis. 146:734-740, 1982.
28. Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture. Second Edition; Approved Standard (1984). Published by National Committee for Clinical Laboratory Standards.
29. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens. NCCLS Document H18-A, Vol. 10, No. 12. Approved Guideline 1990.
30. Hallee TJ, Evans AS, Neiderman JC, Brooks CM and Boegtly: Infectious mononucleosis at the United States Military Academy, a prospective study of a single class over four years. Yale J. Biol. Med. 47:182-192, 1974.
31. U.S. Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration: Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens. Final Rule, Fed. Register 56:64175-64182, 1991.
32. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests; Approved Guidelines – 4th Edition (2010). CLSI Document GP44-A4 (ISBN 1-56238-724-3). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, PA 19087.




ZEUS Scientific, Inc.
 200 Evans Way, Branchburg, New Jersey, 08876, USA
 Toll Free (U.S.): 1-800-286-2111, Opción 2
 International: +1 908-526-3744
 Fax: +1 908-526-2058
 Website: www.zeusscientific.com
 ZEUS ELISA y SAve Diluent* son marcas registradas de ZEUS Scientific, Inc.

Para Asistencia al cliente en EE. UU., comuníquese con su distribuidor local.
 Para Asistencia técnica en EE. UU., comuníquese con ZEUS Scientific: llame al número gratuito o escriba un e-mail support@zeusscientific.com.
 Para consultas a Asistencia al cliente y Asistencia técnica fuera de EE. UU., comuníquese con su distribuidor local.
 ©2017 ZEUS Scientific, Inc. Todos los derechos reservados.

EC	REP	EMERGO EUROPE Prinsessegracht 20 2514 AP The Hague The Netherlands
-----------	------------	--