

APLICACIÓN

El sistema de pruebas ELISA Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen-1 (EBNA-1) IgG de ZEUS permite la detección cualitativa de los anticuerpos IgG contra el antígeno nuclear-1 del virus Epstein-Barr (ANEB-1) en suero humano. Cuando se realiza según se describe en este documento, los resultados de esta prueba, junto con los de otras pruebas (prueba de heterófilo y pruebas EBV-VCA IgG e IgM) pueden ayudar a diagnosticar y a obtener información sobre la mononucleosis infecciosa (MI), información que puede resultar de gran ayuda en la gestión y en el tratamiento de pacientes. Esta prueba es para uso diagnóstico *in vitro*.

IMPORTANCIA Y ASPECTOS GENERALES

El virus Epstein-Barr (VEB) causa mononucleosis infecciosa (MI), una enfermedad linfoproliferativa autolimitada (1). El VEB es un virus humano ubicuo. 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, 4 y 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). Las publicaciones recientes sugieren que el VEB puede causar el síndrome de fatiga crónica en algunas personas (9-12).

La prueba de Paul-Bunell-Davidson para anticuerpo heterófilo es altamente específica para MI (13). 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 (14). 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, 13 - 15). 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. El IgM anti-ACV disminuye rápidamente y generalmente deja de detectarse transcurridas 12 semanas. Los títulos de IgG anti-ACV disminuyen lentamente después de alcanzar un pico y duran por tiempo indefinido. Los anticuerpos contra el componente D del antígeno temprano (AT) pueden aparecer de forma transitoria y duran hasta tres meses durante la fase aguda de la MI en el 85% de los pacientes (15). Los anticuerpos contra el componente R del AT pueden aparecer transitoriamente durante la fase tardía de la convalecencia (15). Los títulos de anticuerpos contra el AT, habitualmente contra el componente R, pueden asociarse con la reactivación de un estado de portador latente del virus (9, 15 - 20).

A diferencia de los anticuerpos contra el ACV y el AT, los anticuerpos frente al antígeno nuclear del VEB (ANEB) raramente están presentes durante la fase aguda de la MI, pero se desarrollan durante la convalecencia (15, 21). El título de los anticuerpos frente al ANEB aumenta gradualmente y, transcurridos de 3 meses a 1 año, alcanza una meseta que puede persistir durante toda la vida en la mayoría de los sujetos (15, 21). Por lo tanto, la presencia de anticuerpos contra el ANEB indica que la infección por VEB no fue reciente.

Aunque se ha utilizado el ensayo clásico de inmunofluorescencia anticomplementaria (IFAC) (27) para medir los anticuerpos contra el ANEB en suero humano, ya existen métodos ELISA para este fin. Los métodos ELISA utilizan antígenos ANEB purificados, los cuales tienen títulos superiores a los ensayos IFAC y son indetectables por métodos IFAC en determinados pacientes de MI (28, 29 y 30).

FUNDAMENTO DE LA PRUEBA

El sistema de pruebas ELISA EBNA-1 IgG de ZEUS está diseñado para detectar anticuerpos de tipo IgG contra el antígeno nuclear del 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 ANEB-1. El procedimiento de la prueba 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 incuba 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 péptido recombinante ANEB-1. 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	SAVE: 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:

1. 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.
2. El sistema de pruebas también contiene una etiqueta de componentes que contiene información específica de lote dentro de la caja del sistema de pruebas.

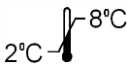
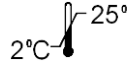
PRECAUCIONES

1. Para uso diagnóstico *in vitro*.
2. 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.
3. 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.
4. 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 (30).
5. 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.
6. 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.
7. 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 lavabo con agua después de eliminar las soluciones que contengan azida de sodio.
8. 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.
9. La solución de TMB es NOCIVA. Irritante para los ojos, el sistema respiratorio y la piel.
10. La solución concentrada del tampón de lavado es IRRITANTE. Irritante para los ojos, el sistema respiratorio y la piel.
11. 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).
12. La dilución o adulteración de estos reactivos puede generar resultados erróneos.
13. No utilice reactivos de otro origen o fabricante.
14. 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.
15. Nunca pipetee con la boca. Evite el contacto de los reactivos y las muestras de pacientes con la piel y las membranas mucosas.
16. Evite la contaminación microbiana de los reactivos. Esto puede ocasionar resultados incorrectos.
17. La contaminación cruzada de reactivos y/o muestras podría ocasionar resultados erróneos.
18. Los instrumentos de vidrio reutilizables se deben lavar y enjuagar cuidadosamente para eliminar cualquier residuo de detergente.
19. Evite las salpicaduras o la formación de aerosoles.
20. No exponga los reactivos a la luz intensa durante el almacenamiento o la incubación.
21. 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.
22. 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.
23. Precaución: neutralice cualquier desecho líquido con pH ácido antes de agregarlo a la solución de lejía.
24. No utilice la placa ELISA si la tirilla indicadora del sobre de desecante ha cambiado de azul a rosado.
25. 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.
26. 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

1. 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.**
2. Pipetas capaces de dispensar con exactitud entre 10 y 200 µl.
3. Pipeta multicanal capaz de dispensar con exactitud entre 50 y 200 µl.
4. Depósitos de reactivos para pipetas multicanal.
5. Frasco de lavado o sistema de lavado de micropocillos.
6. Agua destilada o desionizada.
7. Probeta graduada de un litro.
8. Pipetas serológicas.
9. Puntas de pipeta desechables.
10. Toallas de papel.
11. 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 revestidas: 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 (28, 29). 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 (31).

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.
- Incuba 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.
- Incuba 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.
- Incuba 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

- Diluya el suero 1:21.
- Añada la muestra diluida al micropocillo - 100 µl/micropocillo.
- Incube durante 25 ± 5 minutos.
- Lave.
- Añada el conjugado - 100 µl/micropocillo.
- 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 - 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 ANEB-1. 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 ANEB-1, lo que señala una infección 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.

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

1. No se debe emitir un diagnóstico que se base exclusivamente en los resultados de la prueba anti-ANEB. Interprete los resultados de prueba anti-ANEB de forma conjunta con los resultados de pruebas de anticuerpos contra otros antígenos específicos del VEB, anticuerpos IgG e IgM anti-ACV, y anticuerpos tempranos (AT).
2. Interprete los resultados de la prueba de forma conjunta con la evaluación clínica y los resultados de otros procedimientos de diagnóstico.
3. Los pacientes con compromiso inmune importante pueden mostrar resultados negativos de anticuerpos contra el ANEB incluso en el caso de que haya anticuerpos contra el ACV (28). Asimismo, una respuesta anti-ANEB puede no desarrollarse en pacientes que tienen una inmunodeficiencia o una inmunosupresión (22, 26).
4. Este ensayo detecta los anticuerpos contra el antígeno ANEB-1 y no los anticuerpos contra ningún otro ANEB.
5. Las características de funcionamiento de este ensayo no se han establecido para el linfoma de Burkitt, carcinoma nasofaríngeo y trastornos linfoproliferativos. Su funcionamiento se ha establecido en su contribución al diagnóstico de la MI asociada al VEB.

RESULTADOS ESPERADOS

En la MI clásica asociada al VEB, tanto los anticuerpos IgG como los IgM anti ACV suelen desarrollarse rápidamente desde que surge la enfermedad, y alcanzan picos de títulos al mismo tiempo que los síntomas clínicos. Los anticuerpos contra el ANEB están normalmente ausentes durante la fase aguda de la MI o están en títulos muy bajos (14, 15). Los anticuerpos contra el ANEB alcanzan los títulos máximos entre los 3 y 12 meses tras el inicio de la MI y persisten durante toda la vida en la mayoría de los sujetos (21). Los títulos pueden variar dependiendo de los métodos utilizados. Los anticuerpos contra el ANEB, junto a los anticuerpos IgG contra el ACV y a la ausencia de anticuerpos IgM contra el ACV, indican una infección pasada por VEB (14, 25). La infección aguda primaria por VEB está indicada por la presencia de anticuerpos IgG contra el ACV, anticuerpos anti-EA o IgM anti-ACV y la ausencia de anticuerpos contra ANEB. Aunque durante los 3 primeros meses de la MI se dirigen principalmente contra el ANEB-2, la mayoría de los casos de MI también están asociados con el ANEB-1, con raras excepciones (31). Los anticuerpos contra el ANEB-1 aparecen más adelante en el desarrollo de la enfermedad y persisten durante años. Casi todos los sueros humanos que contienen anticuerpos contra el ANEB reconocen el antígeno ANEB-1 (30,31). La presencia de anticuerpos anti-ANEB en población general varía con la edad. Las infecciones primarias por VEB ocurren antes de los 3 años de edad o durante la adolescencia (entre 13 y 20 años), principalmente en función de las condiciones socioeconómicas. La incidencia de la infección entre las edades de 3 y 13 años es esporádica, y rara una vez alcanzados los 30 años de edad. La prevalencia de los anticuerpos contra ANEB es prácticamente del 100% a la edad de 30 años (33). Se ha realizado un estudio con el fin de determinar los índices de reactividad utilizando dos poblaciones

asintomáticas (n = 72 y n = 85) en el sureste de Estados Unidos. Los índices positivos fueron del 97,2% y 91,8% respectivamente. Además, la Figura 1 muestra una distribución de frecuencia de los resultados de la investigación clínica que se describen a continuación.

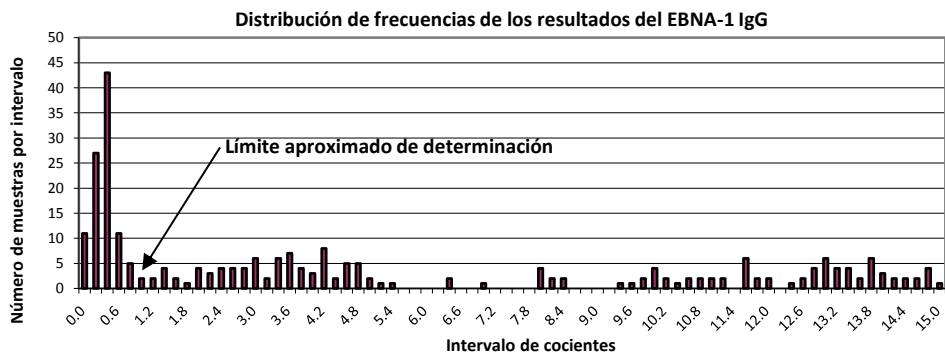


Figura 1: Distribución de frecuencia de los resultados de la investigación clínica.

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

1. Estudio comparativo

Se han realizado estudios comparativos para demostrar la equivalencia del sistema de pruebas ELISA EBNA-1 IgG de ZEUS con otros sistemas de prueba ELISA comerciales en dos laboratorios clínicos. Se sometieron a análisis 271 muestras, 144 en el laboratorio uno y 127 en el laboratorio dos. Las muestras sometidas a prueba en el laboratorio 1 incluían 124 muestras que se enviaron a un laboratorio de referencia para serología VEB rutinaria, así como 20 muestras pediátricas de un repositorio que se habían caracterizado anteriormente como negativas para ANEB. Las muestras que se sometieron a prueba en el laboratorio dos incluían 100 muestras para serología de VEB rutinaria, 7 muestras caracterizadas anteriormente como positivas para IgM anti-ACV-VEB y 20 muestras que se habían caracterizado anteriormente como negativas para el VEB. Los resultados de este estudio comparativo se resumen en la Tabla 1. La Tabla 2 destaca la subpoblación positiva al heterófilo en este estudio clínico. En la tabla también se incluyen resultados para IgG anti-ACV-VEB y para IgM anti-ACV-VEB. Se indican los resultados de ANEB-1 tanto para la prueba ELISA de ZEUS como para la prueba EBNA-1 IgG ELISA comercial.

Tabla 1: Resumen de la sensibilidad y especificidad iniciales

		Sistema de pruebas ELISA EBNA-1 IgG de ZEUS			Total
		Positivo	Negativo	Dudoso*	
Sistema de pruebas EBNA ELISA comercial	Positivo	169	10*	3	182
	Negativo	1*	86	0	87
	Dudoso*	0	2	0	2
	Total				271

*Resultados dudosos y discrepantes. Todos los porcentajes se expresan como intervalo de confianza de 95%, calculado según el método exacto.

Sensibilidad relativa = $169/179 = 94,4$ (de 90,0% a 97,3%)

Especificidad relativa = $86/87 = 98,9\%$ (de 93,8% a 100%)

% concordancia = $225/226 = 99,5$ (de 92,7% a 97,9%)

Análisis de los resultados discrepantes

Trece muestras fueron positivas en la prueba ELISA comercial, y negativas con la prueba ELISA de ZEUS (n= 10) o dudosas (n= 3). Cuatro de 13 se confirmaron como discrepantes, y se descubrió que eran negativas para ANEB mediante métodos de inmunofluorescencia anticomplementaria (IFAC). Cuatro de 13 se confirmaron como discrepantes, y se descubrió que eran positivas para ANEB mediante IFAC. Dos de 14 ofrecieron resultados dudosos iniciales con la prueba ELISA de ZEUS; sin embargo, la repetición de las pruebas produjo un resultado final positivo mediante la prueba ELISA de ZEUS. Una de 14 ofreció resultados dudosos de forma repetida con la prueba ELISA de ZEUS, y se excluyó de los cálculos finales por este motivo. Dos de 14 no se resolvieron por ser su volumen insuficiente, y por este motivo se excluyeron de los cálculos finales. Una muestra fue negativa en la prueba ELISA comercial, y positiva con la prueba ELISA de ZEUS. Esta muestra se confirmó como discrepante, y se descubrió que era negativa para ANEB mediante IFAC. Dos muestras se consideraron dudosas inicialmente en la prueba ELISA comercial y 1 de 2 muestras concordó tras repetir la prueba y no fue necesario realizar la prueba mediante IFA. Una de dos se confirmó como discrepante, y se descubrió que era positiva para ANEB mediante IFAC. **NOTA: La resolución de las muestras discrepantes resultó en un total de 176 muestras positivas en el sistema de pruebas comercial, de las cuales 171 también fueron positivas en el sistema de pruebas ELISA EBNA-1 IgG de ZEUS.** Noventa y dos muestras fueron negativas en el sistema de pruebas comercial, de las cuales 91 también fueron negativas en el sistema de pruebas ELISA EBNA-1 IgG de ZEUS. El resultado es que hubo concordancia entre los dos sistemas de prueba en 262 de las 268 muestras.

Tabla 2: Resultados de todas las muestras positivas para heterófilo en el estudio clínico

ELISA EBNA-1 IgG de ZEUS	EBNA ELISA comercial	ELISA VCA IgG de ZEUS	Resultados para heterófilos	VCA IgM ELISA comercial
Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Dudoso
Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
Dudoso ^a	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
Negativo ^b	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo
Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
Negativo ^c	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo
Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
Negativo ^d	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo
Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
Positivo	Positivo	Dudoso	Positivo	Positivo

^a Muestra dudosa de forma repetida

^b Positiva para el ANEB por IFAC a 1:5

^c Negativa para el ANEB por IFAC

^d Negativa para el ANEB por IFAC

2. Reproducibilidad

La reproducibilidad se evaluó según se describe en el documento número EP5-T2: Evaluation of precision Performance of Clinical Chemistry Devices - Second Edition (Evaluación de la precisión funcional de los dispositivos químicos clínicos - Segunda edición), según ha publicado el Instituto nacional para homologación de normas de laboratorio (CLSI), Villanova, PA, EE. UU. Los estudios de reproducibilidad se llevaron a cabo en los dos laboratorios clínicos, además de en ZEUS Scientific, en Raritan, NJ, EE. UU. Se analizaron seis muestras, dos de las cuales eran muy claramente positivas, dos eran moderadamente positivas y dos negativas. Cada muestra fue analizada por duplicado, dos veces por día (mañana y tarde), durante 20 días consecutivos. Los datos resultantes se utilizaron para calcular la precisión dentro de un mismo análisis, el cálculo de precisión total, y el coeficiente de variación donde correspondiera. Se eliminaron los resultados diarios que incluían cocientes resultantes de posibles errores técnicos y se volvieron a calcular las estadísticas anteriores. Estos resultados se resumen en la Tabla 3. La Tabla 4 muestra la reproducibilidad de los tres duplicados de calibrador en el estudio de reproducibilidad de 20 días. El calibrador se analizó por triplicado en cada serie. Para cada serie, la DO del calibrador se convirtió en un valor índice. Se representan los valores índice más altos y más bajos de los 60 valores de DO diferentes, el mayor y el menor CV de las tres réplicas de las 20 series, y el CV total de los 60 valores índice del calibrador.

Tabla 3: Resumen de la prueba de reproducibilidad

ID	Laboratorio	Cociente medio	DE ^a	S ₁ ^b	Días de prueba	% CV	Observaciones totales
Positivo fuerte 1	(1)	3,59	0,23	0,52	19	14,54	76
	(2)	4,08	0,19	0,36	20	8,71	80
	(3)	4,01	0,23	0,41	20	10,23	80
Positivo fuerte 2	(1)	3,66	0,36	0,59	19	16,18	76
	(2)	4,17	0,20	0,35	20	8,35	80
	(3)	3,98	0,15	0,32	19	8,18	76
Positivo débil 1	(1)	2,37	0,09	0,35	19	14,81	76
	(2)	2,67	0,14	0,21	20	7,76	80
	(3)	1,88	0,17	0,20	18	10,67	72
Positivo débil 2	(1)	2,12	0,18	0,30	19	14,08	76
	(2)	2,32	0,15	0,20	20	8,71	80
	(3)	2,18	0,11	0,17	16	7,69	64
Negativo 1	(1)	0,03	0,03	0,05	19	N/A	76
	(2)	0,01	0,02	0,02	20	N/A	80
	(3)	0,02	0,02	0,04	20	N/A	80
Negativo 2	(1)	0,14	0,05	0,08	19	N/A	76
	(2)	0,27	0,02	0,04	20	N/A	80
	(3)	0,18	0,03	0,06	20	N/A	80

^a Estimación puntual de la desviación estándar de la precisión dentro de un mismo ensayo.
^b Estimación puntual de la desviación estándar de la precisión total.

Tabla 4: Reproducibilidad del calibrador por triplicado

Laboratorio	Cociente alto	Cociente bajo	%CV alto	%CV bajo	%CV global
Laboratorio 1, 20 series AM	2,46	1,98	7,92	0,99	4,25
Laboratorio 1, 20 series PM	2,54	1,87	12,26	0,37	4,44
Laboratorio 2, 20 series AM	2,49	1,85	12,07	1,62	6,66
Laboratorio 2, 20 series PM	2,68	1,93	14,67	1,56	6,01
ZEUS, 20 series AM	2,44	1,94	9,19	0,55	4,22
ZEUS, 20 series PM	2,46	2,01	7,43	0,45	3,49

3. Reactividad cruzada

Se han realizado estudios para evaluar interferencias en el sistema de pruebas ELISA EBNA-1 IgG de ZEUS utilizando sueros negativos para anticuerpos contra ANEB y ACV-VEB, y que demostraron tener anticuerpos contra los siguientes:

VHS-1	n = 5
VHS-2	n = 4
VZV	n = 5
CMV	n = 2
Anticuerpos antinucleares	n = 5

Este estudio de los 21 sueros incluidos en la lista anterior no detectó reactividad cruzada con los diferentes anticuerpos IgG ni con el sistema de pruebas ELISA EBNA-1 IgG de ZEUS.

REFERENCIAS

- Rapp CE and Hewetson JF: Infectious mononucleosis and the Epstein-Barr virus. Am. J. Dis. Child., 132:78-86, 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. Ing. J. Cancer, 22:239-234, 1978.
- Fry J: Infectious Mononucleosis: Some new observations from a 15 year study. J. Family Prac., 10:1087-1089, 1980.
- Lennette ET: Epstein-Barr virus, In: Manual of Clinical Microbiology, 4th Edition, Lennette EH, Balows A, Hausler WJ, Shadomy HJ (eds.). American Society for Microbiology, Washington, DC, 1985.
- 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 Serologic observations. J. Infect. Dis., 139:553-558, 1979.
- Merlin TL: Chronic mononucleosis: Pitfalls in the laboratory diagnosis. Human Path., 17:2-8, 1986.
- Sixbey JW, Nedrud JG, Raab-Traub N, Hanes RA, and Pagano JS: Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells. N. Engl. J. Med. 310:1225-1230, 1984.
- Chang RS, Lewis JP, Reynolds RD, Sullivan MJ and Neuman J: Oropharyngeal excretion of Epstein-Barr virus by patients with lymphoproliferative disorders and by recipients of renal homografts. Annals of Intern. Med. 88:34-40, 1978.
- Jones JF, Ray G, Minnich LL, Hicks MJ, Kibler R, and Lucas DO: Evidence of active Epstein-Barr virus infection in patients with persistent, unexplained illness: Elevated anti-early antigen antibodies. Annals of Intern. Med. 102:1-6, 1985.
- DuBois RE, Seeley JK, Brus I, Sakamoto K, Ballow M, Harada S, Bechtold TA, Pearson G, and Purtilo DT: Chronic mononucleosis syndrome. South. Med. J. 77:1376-1382, 1984.
- Straus SE, Tosato G, Armstrong G, Lawley T, Preble OT, Henle W, Davey R, Pearson G, Epstein J, Brus I, and Blaese M: Persisting illness and fatigue in adults with evidence of Epstein-Barr virus infection. Annals of Intern. Med. 102:7-16, 1985.

12. Tobi M, Ravid Z, Feldman-Weiss V, Ben-Chetrit E, Morag A, Chowder I, Michaeli V, Shalit M, and Knobler H: Prolonged atypical illness associated with serological evidence of persistent Epstein-Barr virus infection. *Lancet*, 1:61-63, 1982.
13. 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.*, 132:546-554, 1975.
14. Henle W, Henle GE, and Horwitz CA: Epstein-Barr virus specific diagnostic tests in infectious mononucleosis. *Human Path.*, 5:551-565, 1974.
15. Lennette ET and Henle W: Epstein-Barr Virus Infections: Clinical and serological features. *Lab Mgmt.* 23-28, June, 1987.
16. Fleisher G and Bolognese R: Persistent Epstein-Barr virus infection and pregnancy. *J. Infect. Dis.* 147:982-986, 1983.
17. Sumaya CV: Serological testing for Epstein-Barr virus: Developments in interpretation. *J. Infect. Dis.* 151:984-987, 1985.
18. Horwitz 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.* 151:1150-1153, 1985.
19. Horwitz 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.* 58:330-338, 1975.
20. Sumaya CV: Endogenous reactivation of Epstein-Barr virus infections. *J. Infect. Dis.* 135:374-379, 1977.
21. Henle G, Henle W, and Horwitz CA: Antibodies to Epstein-Barr virus-associated nuclear antigen in infectious mononucleosis. *J. Infect. Dis.* 130:231-239, 1974.
22. Henle W and Henle G: Epstein-Barr virus-specific serology in immunologically compromised individuals. *Cancer Res.* 41:4222-4225, 1981.
23. Henle W, Ho H-C, Henle G, and Kwan HC: Antibodies to Epstein-Barr virus-related antigen in nasopharyngeal carcinoma. Comparison of active cases with long-term survivors. *J. Nat'l. Cancer Inst.* 51:361-369, 1973.
24. Larson PD, Bloomer LC, and Brag PF: Epstein-Barr nuclear antigen and viral capsid antigen antibody titers in multiple sclerosis. *Neurology*, 35:435-438, 1985.
25. Akaboshi I, Jamamoto J, Katsuki T, and Matsuda I: Unique pattern of Epstein-Barr virus (EBV)-associated complement fixing antigen in producer and non-producer lymphoblastoid cell lines. *Int. J. Cancer*, 11:499-520, 1973.
26. 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.
27. 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*, 11:499-520, 1973.
28. Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture. 2nd 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. U.S. Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration: Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens. Final Rule. Fed. Register 56:64175-64182, 1991.
31. 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.

