

APLICACIÓN

El sistema de pruebas ELISA Epstein Barr Virus Early Antigen (EBV-EA) IgG de ZEUS está diseñado para la detección cualitativa de anticuerpos de tipo IgG contra el antígeno temprano (EA) del virus de Epstein-Barr (VEB) en suero humano. El sistema de pruebas está diseñado para ayudar en el diagnóstico de la mononucleosis infecciosa (MI) cuando se utiliza de forma conjunta con otras serologías del VEB. No se han establecido las características de rendimiento como ayuda en el diagnóstico de la MI aguda. Esta prueba está concebida exclusivamente para uso diagnóstico *in vitro*.

IMPORTANCIA Y ASPECTOS GENERALES

El virus Epstein-Barr (VEB) causa mononucleosis infecciosa, 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).

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 y 14). 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 anticuerpos 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 (AN-VEB) detectados mediante inmunofluorescencia anticomplemento se desarrollan entre 1 y 6 meses después de la infección y, al igual que los anticuerpos ACV, persisten de forma indefinida (15, 16). Los anticuerpos contra el AN-VEB indican que la infección por VEB no fue reciente (14).

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. (17) Los anticuerpos contra los AT pueden aparecer de forma transitoria y duran hasta tres meses o más durante la fase aguda de la MI en el 85% de los pacientes (28). 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 puede producir anticuerpos contra los componentes R (14). Se puede hacer un diagnóstico definitivo de una infección primaria por VEB con el 95% de los sueros de fase aguda según los títulos de anticuerpo contra el ACV, AN-VEB y AT (28).

Los anticuerpos frente al AT, habitualmente contra el componente R, junto con los anticuerpo contra el AN-VEB y títulos altos de IgG anti-ACV, pueden asociarse con la reactivación de un estado de portador latente del virus (19, 20). La serología positiva del VEB asociada con la reactivación del VEB se encuentra en el suero de pacientes con inmunodeficiencias (21), pacientes con parotiditis recurrente (22), pacientes inmunosuprimidos (8,23), mujeres embarazadas (24) y personas de edad avanzada (20). Los anticuerpos contra el componente R pueden encontrarse en títulos moderados o altos en pacientes con linfoma de Burkitt (4). Por el contrario, los pacientes con carcinoma nasofaríngeo pueden producir títulos altos de anticuerpo contra el componente D (18).

Pueden detectarse niveles elevados de anti-AT e IgG anti-ACV en pacientes con enfermedad crónica o recurrente en la que se sospeche el VEB como causa (1-12, 21, 27). Sin embargo, el diagnóstico de infección crónica por el VEB no se basará en la presencia de anticuerpo contra AT, ya que también se pueden encontrar títulos altos anti-AT en pacientes con otras enfermedades y en sujetos sanos con infecciones pasadas por VEB (6, 20, 25, 26 y 28).

FUNDAMENTO DE LA PRUEBA

El sistema de pruebas ELISA EBV-EA IgG de ZEUS está diseñado para detectar anticuerpos de tipo IgG contra el antígeno temprano 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 AT-VEB. 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®.**

PLATE	1.	Placa: 96 micropocillos distribuidos en doce tirillas de 1x8 micropocillos recubiertos con antígeno AT-VEB desactivado derivado de células de Raji inducidas. Las tirillas se suministran envasadas en un soporte y selladas en un sobre con desecante.
CONJ	2.	Conjugado: anti-IgG humana (específica de la cadena Fc) de cabra conjugada con peroxidasa de rábano. Un vial de 15 ml con tapón blanco. Listo para usar.
CONTROL +	3.	Control positivo (suero humano): un vial de 0,35 ml con tapón rojo.
CAL	4.	Calibrador (suero humano): un vial de 0,5 ml con tapón azul.
CONTROL -	5.	Control negativo (suero humano): un vial de 0,35 ml con tapón verde.
DIL SPE	6.	Diluyente SAVe Diluent®: un frasco 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
------	-----

7. TMB: un frasco de 15 ml de color ámbar con tapón ámbar que contiene 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). Listo para usar.

SOLN	STOP
------	------

8. Solución para detener la reacción: un frasco de 15 ml con tapón rojo con H₂SO₄ 1 M y HCl 0,7 M. Listo para usar.

WASHBUF	10X
---------	-----

9. Tampón de lavado concentrado (10X): diluir 1 parte del concentrado + 9 partes de agua desionizada o destilada. Un frasco 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.

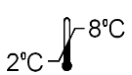
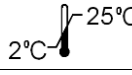
PRECAUCIONES

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 (31).
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 informado que la azida sódica forma azidas de plomo o cobre en las cañerías del laboratorio, lo que puede ocasionar explosiones al golpear con un martillo. 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 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

1. 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).
2. 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.
3. Con este ensayo solamente deben utilizarse sueros recién extraídos y debidamente refrigerados que se hayan obtenido mediante procedimientos homologados de venopunción aséptica (29, 30). No los utilice si se han agregado anticoagulantes o conservantes. Evite utilizar sueros hemolizados, lipémicos o contaminados con bacterias.
4. 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).

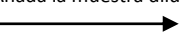
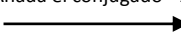
PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

1. Retire los componentes individuales del kit del almacenamiento y permita que alcancen la temperatura ambiente (20 - 25 °C).
2. 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	

3. 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.**
4. 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.
5. 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.
6. Incube la placa a temperatura ambiente (20 - 25 °C) durante 25 ± 5 minutos.
7. Lave las tirillas de micropocillos 5 veces.
 - a. **Procedimiento de lavado manual:**
 1. Agite la placa para eliminar el líquido de todos los micropocillos.
 2. Llene cada micropocillo con solución tampón de lavado. Asegúrese de que no queden burbujas de aire atrapadas en los micropocillos.
 3. Repita los pasos 1. y 2. para un total de 5 lavados.
 4. 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.
 - b. **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.
8. 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.
9. Incube la placa a temperatura ambiente (20 - 25 °C) durante 25 ± 5 minutos.
10. Lave los micropocillos siguiendo el procedimiento descrito en el paso 7.
11. 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.
12. Incube la placa a temperatura ambiente (20 - 25 °C) entre 10 y 15 minutos.
13. 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.
14. 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. $\xrightarrow{\hspace{2cm}}$ 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 AT-VEB.
- b. Un cociente de DO ≥ 1,10 indica que se han detectado anticuerpos de tipo IgG específicos contra AT-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 el sistema de pruebas ELISA EBV-EA IgG de ZEUS. Interprete los resultados de la prueba para anti-AT-VEB de forma conjunta con la evaluación clínica y los resultados de otros procedimientos de diagnóstico. Tenga en cuenta los resultados de la prueba para el ACV y el ANEB a la hora de evaluar el estado serológico del VEB a partir de las muestras de paciente.
2. Esta prueba detecta tanto la presencia de componentes R como de componentes D de AT. El sistema de pruebas no está diseñado para distinguir anticuerpos contra los componentes R y D.
3. Evite el uso de muestras hemolíticas, lipémicas, contaminadas con bacterias o inactivadas por el calor. Esto puede ocasionar resultados erróneos.
4. Las características de funcionamiento del ensayo no se han establecido para otras matrices que no sean suero.
5. La magnitud del resultado medido por encima del límite de referencia no es indicativo de la cantidad total de anticuerpos presente y no puede correlacionarse con títulos de procedimiento IFA.
6. Las características de funcionamiento no se han establecido para mediciones visuales de los resultados.
7. Actúe con precaución cuando evalúe muestras obtenidas de pacientes inmunosuprimidos.
8. La prevalencia del analito afecta al valor predictivo del ensayo.
9. 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 mononucleosis infecciosa asociada al VEB.

RESULTADOS ESPERADOS

Para establecer o calcular el índice esperado de reactividad, científicos analizaron 250 muestras en dos laboratorios clínicos. Se trataba de dos grupos de muestras; 150 muestras clínicas que se enviaron al laboratorio para someterlas a análisis serológico rutinario de EBV, y 100 muestras al azar de donantes normales. Respecto a la población clínica, 43/150 (28,7%) fueron positivas, 101/150 (67,3%) fueron negativas y 6/150 (4,0%) ofrecieron resultados dudosos. Respecto a la población normal, 18/100 (18%) fueron positivas, 76/100 (76%) fueron negativas y 6/100 (6%) ofrecieron resultados dudosos.

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

1. Estudio comparativo

Se ha realizado un estudio comparativo para demostrar la equivalencia del sistema de pruebas ELISA EBV-EA IgG de ZEUS respecto al sistema de pruebas IFA EBV-EA de ZEUS en la evaluación de pruebas remitidas para diagnóstico de MI. El funcionamiento del sistema de pruebas ELISA EBV-EA IgG de ZEUS se evaluó en una investigación desarrollada en tres laboratorios clínicos. Se sometieron a análisis un total de 273 muestras; 125 en el laboratorio 1, 125 en el laboratorio 2 y

23 en el laboratorio 3. Las muestras clínicas analizadas en los laboratorios uno y dos estaban formadas por una mezcla de muestras rutinarias que se enviaron a un laboratorio de referencia en el suroeste de EE.UU. para análisis serológico de VEB normal, así como muestras de donantes normales. En el laboratorio 3 se analizaron muestras de un repositorio. Estas muestras ya habían sido sometidas a prueba y dieron resultados positivos para el anticuerpo contra el AT-VEB. Las muestras con resultados dudosos se excluyeron de otros análisis. La Tabla 1 que figura a continuación muestra los resultados del laboratorio uno. La Tabla 2 muestra los resultados del laboratorio dos. Los resultados del laboratorio tres no se indican por separado, sino que se incluyen en la Tabla 3, donde se muestran los resultados combinados de los tres laboratorios.

Tabla 1: Cálculo de sensibilidad relativa, especificidad y concordancia; laboratorio uno

		Sistema de pruebas ELISA EBV-EA IgG de ZEUS			
		Positivo	Negativo	Dudoso	Total
Sistema de pruebas IFA EBV-EA IgG de ZEUS	Positivo	22	9	2	33
	Negativo	2	73	3	78
	Dudoso	5	5	4	14
	Total	29	87	9	125

Sensibilidad relativa = $22/31 = 71\%$ (Intervalo de confianza de 95%* = de 55 a 87%)

Especificidad relativa = $73/75 = 97\%$ (Intervalo de confianza de 95%* = de 94 a 100%)

Concordancia relativa = $95/106 = 90\%$ (Intervalo de confianza de 95%* = de 84 a 95%)

* Los intervalos de confianza de 95% se calcularon según el método exacto.

Tabla 2: Cálculo de sensibilidad relativa, especificidad y concordancia; laboratorio dos

		Sistema de pruebas ELISA EBV-EA IgG de ZEUS			
		Positivo	Negativo	Dudoso	Total
Sistema de pruebas IFA EBV-EA IgG de ZEUS	Positivo	25	6	4	35
	Negativo	7	83	0	90
	Dudoso	0	0	0	0
	Total	32	89	4	125

Sensibilidad relativa = $25/31 = 81\%$ (Intervalo de confianza de 95%* = de 67 a 94%)

Especificidad relativa = $83/90 = 92\%$ (Intervalo de confianza de 95%* = de 87 a 98%)

Concordancia relativa = $108/121 = 89\%$ (Intervalo de confianza de 95%* = de 84 a 95%)

* Los intervalos de confianza de 95% se calcularon según el método exacto.

Tabla 3: Cálculo de sensibilidad relativa, especificidad y concordancia; los tres laboratorios combinados

		Sistema de pruebas ELISA EBV-EA IgG de ZEUS			
		Positivo	Negativo	Dudoso	Totales
Sistema de pruebas IFA EBV-EA IgG de ZEUS	Positivo	67	15	7	89
	Negativo	11	156	3	170
	Dudoso	5	5	4	14
	Totales	83	176	14	273

Sensibilidad relativa = $67/82 = 82\%$ (Intervalo de confianza de 95%* = de 67 a 94%)

Especificidad relativa = $156/167 = 93\%$ (Intervalo de confianza de 95%* = de 90 a 97%)

Concordancia relativa = $223/249 = 90\%$ (Intervalo de confianza de 95%* = de 86 a 93%)

* Los intervalos de confianza de 95% se calcularon según el método exacto.

En la Tabla 3 hubo un total de 26 muestras discrepantes. Hubo un total de 11/273 (4,0%) muestras que fueron positivas en la prueba ELISA y negativas en la prueba por IFA. Hubo un total de 15/273 (5,6%) muestras que fueron negativas en la prueba ELISA y positivas en la prueba por IFA. Dentro de este grupo de 15 muestras, 1/15 tuvo un título final de 1:160 mediante IFA, 4/15 muestras tuvieron un título final de 1:20, y las muestras restantes (10/15) tuvieron un título de punto final de 1:10 mediante IFA. **NOTA: Tenga en cuenta que el término relativo se refiere a la comparación de los resultados de este ensayo con los de un ensayo similar.** No se ha intentado correlacionar los resultados del ensayo con la ausencia o la presencia de enfermedad. No se puede juzgar la precisión del ensayo comparado para predecir la existencia de enfermedad.

La totalidad de las 273 muestras sometidas a prueba durante el estudio clínico también se sometieron a pruebas de anticuerpos IgG anti-ACV-VEB, IgM anti-ACV-VEB, IgG anti ANEB-1 y heterófilo. Los resultados de estas pruebas suplementarias se ilustran en la Tabla 4.

Tabla 4: Resultados de la prueba ELISA EBV-EA IgG por categoría del estado serológico del VEB

		Agudo	Seropositivo	Seronegativo
		Positivo para IgM anti-ACV Positivo para heterófilo Negativo para ANEB	Positivo para IgG anti-ACV Positivo para ANEB Negativo para IgM anti-ACV Negativo para heterófilo	Negativo para IgG anti-ACV Negativo para IgM anti-ACV Negativo para ANEB Negativo para heterófilo
Resultados del ELISA EBV-EA IgG de ZEUS	Positivo	0	54	1
	Negativo	2	106	29
	Dudoso	0	10	1
	Total	2/273	170/273	31/273

2. Reproducibilidad

La reproducibilidad se evaluó según se describe en el documento de directrices de la Agencia Estadounidense de Alimentación y Medicina (FDA); Revised Criteria for In Vitro Diagnostic Devices for Detection of IgM antibodies to Viral Antigens (Revisión de criterios de los dispositivos de diagnóstico *in vitro* para la detección de anticuerpos IgM contra antígenos virales). Se han realizado estudios de reproducibilidad en ambos laboratorios clínicos con las mismas muestras. Se analizaron seis muestras: dos relativamente fuertes para positivo, dos cercanas al límite de referencia y otras dos que eran claramente negativas. Además, los controles negativo y positivo del kit se incluyeron como componentes adicionales del panel en el laboratorio uno, en un total de ocho muestras. Durante cada día de las pruebas, cada una de estas ocho muestras se sometió a ensayo en ocho pocillos replicados. Las pruebas se realizaron durante un total de tres días en cada uno de los laboratorios. La Tabla 5 que aparece a continuación resume los datos de esta investigación.

Tabla 5: Resumen de pruebas de precisión realizadas en los laboratorios uno y dos

Muestra	Laboratorio	Cociente medio	Resultado	Desviación estándar	% CV global
1	1	3,46	Positivo	0,55	16,0
	2	3,06		0,31	10,0
2	1	2,78	Positivo	0,60	21,7
	2	2,76		0,30	10,9
3	1	1,81	Cerca del límite	0,34	18,7
	2	1,69		0,28	16,6
4	1	1,15	Cerca del límite	0,19	16,5
	2	1,13		0,26	23,0
5	1	0,27	Negativo	0,06	24,0
	2	0,37		0,07	17,8
6	1	0,28	Negativo	0,08	30,1
	2	0,75		0,10	13,5
Control positivo	1	3,71	Positivo	1,00	27,0
	2	3,49		0,47	13,4
Control negativo	1	0,28	Negativo	0,06	23,6
	2	0,28		0,03	12,2

3. Reactividad cruzada

Se realizó un estudio para investigar la posibilidad de reactividad cruzada con otros virus. En este estudio se evaluaron diez muestras. Dos de ellas mostraron una reacción fuerte a la rubeola, dos al sarampión, dos al VHS-1, dos al VHS-2 y dos al CMV. Ninguna de las diez muestras reaccionó al sistema de pruebas ELISA EBV-EA IgG de ZEUS, lo que indica que existe poco potencial de reactividad cruzada con muestras de este tipo de pacientes.

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 at time of infection. *Int. J. Cancer* 22:239-243, 1978.
- Fry J: Infectious Mononucleosis: Some new observations from a 15 year study. *J. Family Pract.* 10:1087-1089, 1980.
- Lennette ET: Epstein-Barr virus IN: Manual of Clinical Microbiology, 46th 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. *New 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 Putilo 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.
- Tobi M, Ravid Z, Feldman-Weiss V, Ben-Chetrit E, Morag A, Chowers 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.
- 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.
- Henle W, Henle GE, and Horwitz CA: Epstein-Barr virus specific diagnostic tests in infectious mononucleosis. *Human Path.* 5:551-565, 1974.
- 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.
- 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.
- Henle G, Henle W, and Klein G: Demonstration of two distinct components in the early antigen complex of Epstein-Barr virus-infected cells. *Int. J. Cancer* 8:272-282, 1971.
- 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. Nat'l. Cancer Inst.* 51:361-369, 1973.
- 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.
- Sumaya CV: Endogenous reactivation of Epstein-Barr virus infections. *J. Infect. Dis.* 135:374-379, 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* 2:1049-1051, 1983.
- Henle W, and Henle G: Epstein-Barr virus infection and pregnancy. *J. Infect. Dis.* 147:982-986, 1983.
- Fleisher G, and Bolognese R: Persistent Epstein-Barr virus infection and pregnancy. *J. Infect. Dis.* 147:982-986, 1983.
- Sumaya CV: Serological testing for Epstein-Barr virus; Developments in interpretation. *J. Infect. Dis.* 151:984-987, 1985.
- 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.
- Chang RS, Thompson H, and Pomerantz S: Epstein-Barr virus infection in homosexual men with chronic persistent generalized lymphadenopathy. *J. Infect. Dis.* 151:459, 1985.
- Lennette ET, and Henle W: Epstein-Barr virus infections: Clinical and Serologic features. *Lab Mgmt.* 23-28, June, 1987.
- Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture - Second Edition; Approved Standard (1984). Published by National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens. NCCLS Document H18-A, Vol. 10, No. 12, Approved Guideline, 1990.

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

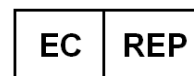
ZEUS ELISA y SAVE Diluent* son marcas registradas de ZEUS Scientific, Inc.

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.



EMERGO EUROPE
Prinsessegracht 20
2514 AP The Hague
The Netherlands