

**VIROTECH EBV EA-D IgG ELISA
(EBV EA-D IgG ELISA)**

N.º de pedido:EC202.00 Código de colores: amarillo/rojo

**VIROTECH EBV EBNA1 IgG ELISA
(EBV EBNA1 IgG ELISA)**

N.º de pedido:EC204.00 Código de colores:amarillo/azul claro

**VIROTECH EBV VCA IgG ELISA
(EBV VCA IgG ELISA)**

N.º de pedido:EC205G00 Código de colores:amarillo/naranja

**VIROTECH EBV VCA IgM ELISA
(EBV VCA IgM ELISA)**

N.º de pedido:EC203M00 Código de colores:amarillo/negro

EXCLUSIVAMENTE PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO

**Virotech Diagnostics GmbH
Waldstrasse 23 A2
63128 Dietzenbach, Germany**

**Tel.: +49(0)6074-23698-0
Fax.: +49(0)6074-23698-900
www.goldstandarddiagnostics.com**



Índice

1. Finalidad de la prueba	3
2. Principio de la prueba	3
3. Contenido	3
3.1 Contenido del paquete EBV EA-D, EBV EBNA1, EBV VCA IgG	3
3.2 Contenido del paquete EBV VCA IgM	3
4. Conservación y plazo de caducidad del kit de ensayo y de los reactivos listos para utilizar	3
5. Medidas de precaución y advertencias	4
6. Material adicional necesario (no suministrado)	4
7. Realización de la prueba	4
7.1 Material de muestra	4
7.2 Preparación de los reactivos	4
7.3 Realización de la prueba ELISA de VIROTECH	5
7.4 Empleo de procesadores ELISA	5
8. Valoración del ensayo	5
8.1 Control del funcionamiento del ensayo	6
8.2 Cálculo de las unidades VIROTECH (VE)	6
8.3 Esquema de valoración para IgG e IgM	6
8.4 Significado de los antígenos	6
8.5 Tabla de interpretación	7
8.6 Limitaciones del ensayo	8
9. Literatura	8
10. Esquema de la realización de la prueba	9

1. Finalidad de la prueba

Los EBV EA-D, EBV EBNA1, EBV VCA de ELISA detectan anticuerpos semicuantitativos frente a diferentes marcadores del virus Epstein Barr. Los kits se emplean de forma combinada para la diferenciación y cobertura de seronegatividad, primoinfección e infección pasada.

2. Principio de la prueba

El anticuerpo buscado en el suero humano forma un complejo inmune con el antígeno fijado en la placa de microtitulación. Las inmunoglobulinas no ligadas son eliminadas mediante procesos de lavado. El conjugado enzimático se liga al citado complejo. Las inmunoglobulinas no ligadas son de nuevo eliminadas mediante procesos de lavado. Tras la adición de la solución de sustrato (TMB), la actividad enzimática (peroxidasa) da lugar a un pigmento azul, que adopta un color amarillo después de añadir la solución de paro.

3. Contenido

3.1 Contenido del paquete EBV EA-D, EBV EBNA1, EBV VCA IgG

1. **1 placa de microtitulación**, que consta de 96 be pocillos individuales separables recubiertos con antígeno, liofilizado
2. **Tampón de dilución PBS (azul, listo para utilizar)**, 2x50ml, pH 7,2, con conservante y Tween 20
3. **Tampón de lavado PBS (concentración 20x)**, 50ml, pH 7,2, con conservante y Tween 20
4. **Control negativo para IgG, 2000µl**, suero humano con estabilizadores de proteínas y conservante, listo para utilizar
5. **Control cut-off para IgG, 2000µl**, suero humano con estabilizadores de proteínas y conservante, listo para utilizar
6. **Control positivo para IgG, 2000µl**, suero humano con estabilizadores de proteínas y conservante, listo para utilizar
7. **Conjugado IgG (anti-humano), 11ml**, conjugado de peroxidasa de rábano picante (ovino o cabra) con estabilizadores de proteínas y conservante en tampón Tris, listo para utilizar
8. **Solución de sustrato de tetrametilbencidina (TMB 3,3',5,5')**, 11ml, lista para utilizar
9. **Solución de parada de citrato, 6ml**, contiene una mezcla de ácidos

3.2 Contenido del paquete EBV VCA IgM

1. **1 placa de microtitulación**, que consta de 96 be pocillos individuales separables recubiertos con antígeno, liofilizado
2. **Tampón de dilución PBS (azul, listo para utilizar)**, 2x50ml, pH 7,2, con conservante y Tween 20
3. **Tampón de lavado PBS (concentración 20x)**, 50ml, pH 7,2, con conservante y Tween 20
4. **Control negativo para IgM, 2000µl**, suero humano con estabilizadores de proteínas y conservante, listo para utilizar
5. **Control cut-off para IgM, 2000µl**, suero humano con estabilizadores de proteínas y conservante, listo para utilizar
6. **Control positivo para IgM, 2000µl**, suero humano con estabilizadores de proteínas y conservante, listo para utilizar
7. **Conjugado IgM (anti-humano), 11ml**, conjugado de peroxidasa de rábano picante (ovino o cabra) con FCS y conservante en tampón Tris, listo para utilizar
8. **Solución de sustrato de tetrametilbencidina (TMB 3,3',5,5')**, 11ml, lista para utilizar
9. **Solución de parada de citrato, 6ml**, contiene una mezcla de ácidos

4. Conservación y plazo de caducidad del kit de ensayo y de los reactivos listos para utilizar

Conserve el kit de ensayo a 2-8°C. El plazo de caducidad de cada componente figura en la correspondiente etiqueta; el plazo de caducidad del kit puede consultarse en el certificado de control de calidad.

1. Una vez separados los pocillos individuales necesarios conserve los restantes pocillos / tiras en la bolsa cerrada con desecante a una temperatura de 2-8°C. Los reactivos deben volverse a guardar a 2-8°C inmediatamente después de su uso.
2. El conjugado listo para utilizar y la solución de sustrato TMB son fotosensibles y deben conservarse en la oscuridad. Si la solución de sustrato se tiñe por efecto de la luz, debe desecharse.
3. Extraiga únicamente la cantidad de conjugado listo para utilizar o de TMB necesaria para la prueba. El exceso de conjugado o TMB extraído no debe devolverse, sino que debe ser desechado.

Material	Estado	Almacenamiento	Durabilidad
Muestras de análisis	diluidas	de +2 hasta +8°C	máx. 6h

	sin diluir	de +2 hasta +8°C	1 semana
Controles	tras la apertura	de +2 hasta +8°C	3 meses
Placa de microtitulación	tras la apertura	de +2 hasta +8° (almacenamiento en la bolsa suministrada con bolsita de secante)	3 meses
Absorbente del factor reumatoide	sin diluir, tras la apertura	de +2 hasta +8°C	3 meses
	diluido	de +2 hasta +8°C	1 semana
Conjugado	tras la apertura	de +2 hasta +8°C (protegido contra la luz)	3 meses
Tetrametilbencidina (TMB)	tras la apertura	de +2 hasta +8°C (protegido contra la luz)	3 meses
Solución de parada	tras la apertura	de +2 hasta +8°C	3 meses
Solución de lavado	tras la apertura	de +2 hasta +8°C	3 meses
	dilución final (lista para el uso)	de +2 hasta +25°C	4 semanas

5. Medidas de precaución y advertencias

1. Como sueros de control sólo deben utilizarse sueros que hayan dado resultado negativo en las pruebas de anticuerpos VIH1, anticuerpos VIH2, anticuerpos VHC y antígeno de superficie de la hepatitis B. En cualquier caso, todas las muestras, muestras diluidas, controles, conjugados y tiras de microtitulación deben considerarse como material potencialmente infeccioso y manipularse con las correspondientes precauciones. Deberán seguirse las correspondientes directrices para trabajos de laboratorio.
2. Los componentes que contienen conservante, así como la solución de parada de citrato y la TMB, son irritantes para la piel, los ojos y las mucosas. En caso de contacto, lave inmediatamente la parte afectada con abundante agua y acuda al médico si fuera necesario.
3. Los materiales utilizados deberán eliminarse según la normativa de eliminación de residuos de cada país.

6. Material adicional necesario (no suministrado)

1. Agua destilada/desionizada
2. Pipeta multicanal 50µl, 100µl
3. Micropipetas: 10µl, 100µl, 1000µl
4. Tubos de ensayo
5. Servilletas de celulosa
6. Cubierta para placas ELISA
7. Recipientes para residuos infecciosos
8. Aparato de lavado manual para ELISA o aparato de lavado automático para placas de microtitulación
9. Espectrofotómetro para placas de microtitulación con filtro de 450/620 nm (longitud de onda de referencia 620-690nm)
10. Estufa de incubación

7. Realización de la prueba

El cumplimiento exacto de las instrucciones de VIROTECH Diagnostics es el requisito previo para obtener resultados correctos.

7.1 Material de muestra

Como material de análisis es posible utilizar suero o plasma (sin importar el tipo de anticoagulantes), aunque en el prospecto sólo se mencione el suero.

Las diluciones de pacientes siempre deben prepararse frescas.

Para un almacenamiento más prolongado, los sueros deben congelarse. Evítese una descongelación repetida.

1. Sólo deben utilizarse sueros recientes no inactivados.
2. No deben emplearse muestras hiperlipémicas, hemolíticas o con contaminación microbiana ni sueros que presenten turbidez (riesgo de falsos positivos o negativos).

7.2 Preparación de los reactivos

El sistema de diagnóstico de VIROTECH Diagnostics ofrece una gran flexibilidad al permitir el uso de los mismos tampones de dilución y lavado, TMB, solución de paro de citrato y conjugado para todos los parámetros y lotes. Los controles listos para

utilizar (control positivo, control de nivel de corte, control negativo) son específicos para cada parámetro y deben emplearse exclusivamente con el lote de placas indicado en el certificado de control de calidad.

1. Seleccione una temperatura de 37°C en la estufa y cerciórese de que se ha alcanzado dicha temperatura antes de comenzar la incubación.
2. Deje que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente antes de abrir el envase con las tiras de prueba.
3. Agite bien todos los componentes líquidos antes de su uso.
4. Completar el concentrado de solución de lavado a 1 litro con agua destilada/desionizada (en caso de una eventual formación de cristales en el concentrado, éste debe llevarse a temperatura ambiente antes de la dilución, agitándolo bien antes del uso).
5. Los niveles elevados de IgG o los factores reumáticos pueden interferir en la determinación de anticuerpos IgM y provocar falsos positivos o falsos negativos **Tratar previamente los sueros con RF-SorboTech** (agente de adsorción VIROTECH). En el caso de los controles IgM no es necesaria la adsorción previa.

7.3 Realización de la prueba ELISA de VIROTECH

1. Para cada prueba, pipetee 100µl del tampón de dilución listo para utilizar (valor cero), del control negativo, del control cut-off y del control positivo para IgG y IgM, así como de los sueros de paciente diluidos. Recomendamos ensayar duplicados en cada caso (valor cero, controles y sueros de paciente); en el caso del control cut-off, la preparación de duplicados imprescindible. Dilución de trabajo de los sueros de paciente: 1+100; p.ej. 10µl de suero + 1ml de tampón de dilución.
2. Tras el pipeteado tiene lugar la incubación a 37 °C (con cubierta) durante 30 min.
3. El periodo de incubación finaliza con 4 lavados utilizando cada vez 350-400µl de solución de lavado por cavidad. No deje solución de lavado en los pocillos: retire los últimos restos de líquido sacudiendo sobre una superficie de celulosa.
4. Pipetee en todas las cavidades 100µl del conjugado listo para utilizar.
5. Incubación de los conjugados: 30 min. a 37°C (con cubierta).
6. Finalización de la incubación de los conjugados con 4 lavados (véase el punto 3).
7. Pipetee en cada pocillo 100µl de la solución de sustrato TMB lista para utilizar.
8. Incubación de la solución de sustrato: 30 minutos a 37°C (con cubierta, en la oscuridad).
9. Paro de la reacción de sustrato: pipetee en cada pocillo 50µl de la solución de parada de citrato. Agite cuidadosamente la placa hasta que los líquidos se hayan mezclado por completo y pueda verse un color amarillo uniforme.
10. Mida la absorbancia a 450/620 nm (longitud de onda de referencia 620-690nm). Ajuste el fotómetro de modo que se reste el valor obtenido para el valor cero de todos los demás valores de absorbancia. La medición fotométrica debe realizarse en la hora siguiente a la adición de la solución de paro.

Véase esquema de la realización de la prueba en la última página

7.4 Empleo de procesadores ELISA

Todas las pruebas ELISA de VIROTECH Diagnostics pueden realizarse con ayuda de procesadores ELISA. El usuario está obligado a validar periódicamente el aparato.

VIROTECH Diagnostics recomienda el siguiente procedimiento:

1. Al instalar el aparato, o en caso de reparaciones importantes de su procesador ELISA, VIROTECH Diagnostics recomienda validarlo según las instrucciones del fabricante.
2. Se recomienda comprobar seguidamente el procesador ELISA con el kit de validación (EC250.00). Esta comprobación periódica con el kit de validación debe realizarse al menos una vez al trimestre.
3. En cada ciclo de prueba deben cumplirse los criterios de autorización del certificado de control de calidad del producto. Este modo de procedimiento garantiza la función impecable de su procesador ELISA, sirviendo además para el aseguramiento de calidad del laboratorio.

8. Valoración del ensayo

Los controles listos para utilizar sirven para una determinación semicuantitativa de los anticuerpos específicos IgG e IgM, cuya concentración se indica en unidades VIROTECH (VE). Las fluctuaciones debidas a la realización de la prueba se compensan con el método de cálculo, con lo que se alcanza una elevada reproducibilidad. Para el cálculo del valor VE se emplean los valores medios de las densidades ópticas.

8.1 Control del funcionamiento del ensayo

a) Valores de densidad óptica

El valor de densidad óptica correspondiente al valor cero debe ser inferior a 0,15.

Los valores de densidad óptica (DO) de los controles negativos deben estar por debajo de los valores de DO indicados en el certificado de control de calidad, mientras que los valores de DO de los controles positivos y del cut -off deben estar por encima de los valores de DO indicados en el certificado.

b) Unidades VIROTECH (VE)

Las unidades VIROTECH (VE) de los controles cut-off se definen como 10 VE. Los VE calculados para los controles positivos deben estar dentro de los intervalos indicados en el certificado de control de calidad.

Si no se cumplen estas exigencias (valores de DO, VE), debe repetirse la prueba.

8.2 Cálculo de las unidades VIROTECH (VE)

La absorbancia correspondiente al valor cero (450/620 nm) debe restarse de todos los valores de absorbancia.

$$\begin{aligned} \text{VE}_{(\text{control positivo})} &= \frac{\text{DO}_{(\text{control positivo})}}{\text{DO}_{(\text{control de nivel de corte})}} \times 10 \\ \text{VE}_{(\text{suero del paciente})} &= \frac{\text{DO}_{(\text{suero del paciente})}}{\text{DO}_{(\text{cut - off})}} \times 10 \end{aligned}$$

8.3 Esquema de valoración para IgG e IgM

Resultado (VE)	Valoración
< 9,0	negativo
9,0 - 11,0	zona límite
> 11,0	positivo

1. Si los VE medidos de la muestra se encuentran por encima de los límites del intervalo, las muestras se considerarán positivas.
2. Si los VE medidos se encuentran en los límites marcados del intervalo, no hay presencia de una alta concentración de anticuerpos; por lo que las muestras se considerarán marginales. Para una detección fiable de la infección, es necesario determinar el nivel de anticuerpos de dos muestras de suero. Deben someterse a prueba una muestra de suero del comienzo de la infección y una segunda muestra de 5 a 10 días más tarde (suero convaleciente). El nivel de anticuerpos de ambas muestras debe determinarse de forma paralela, es decir, en un ensayo. No es posible obtener un diagnóstico correcto mediante la evaluación de una única muestra de suero.
3. Si los valores medidos se encuentran por debajo del límite del intervalo, no hay presencia de anticuerpos antígeno-específicos medibles en la muestra. Por lo tanto, las muestras se considerarán negativas.

8.4 Significado de los antígenos

Antígeno / Denominación	Significado de los antígenos	Especificidad de los anticuerpos
EBNA1	El Antígeno Nuclear Epstein-Barr (EBNA) es una proteína viral, que se expresa de forma latente en el núcleo celular de las células infectadas. Los anticuerpos IgG frente al EBNA1 sirven como marcadores fiables ante una infección pasada de EBV. En raros casos excepcionales, puede fallar la respuesta inmunitaria de la IgG frente al EBNA1 (<i>primario o secundario</i>). En pacientes inmunodeprimidos, se reducen considerablemente los títulos de anticuerpos IgG frente al EBNA1 (pérdida de EBNA1 secundario).	IgG: Marcador altamente específico central para una infección <u>pasada</u> de EBV

VCA	Este acrónimo describe diferentes «Antígenos Cápsidos Virales» (VCA). Entre otras, las proteínas gp125 y p18 se consideran inmunodominantes. Por regla general, los anticuerpos IgM frente a VCA-gp125/p18 vuelven a desaparecer algunas semanas después de la infección y los anticuerpos IgG frente a VCA-gp125/p18 se conservan permanentemente. En caso de reactivación, de vez en cuando se reconstituye la reserva de anticuerpos IgM frente a VCA-gp125/p18.	IgG: marcador general altamente específico para infecciones de EBV IgM: altamente específico para una <u>primoinfección</u> de EBV
EA-D	El componente difuso de los antígenos tempranos «Early Antigen-Diffuse» pertenece a los antígenos tempranos que se sintetizan en el ciclo de replicación viral (fase de infección activa). Los anticuerpos IgG e IgM frente al EA-D suelen aparecer simultáneamente con EBNA-IgG negativo en caso de primoinfecciones. Aunque durante la convalecencia, los anticuerpos IgG frente a EA-D desciendan, pueden volver a aumentar considerablemente en caso de reactivación del EBV. No obstante, una declaración acerca de la relevancia clínica de la reactivación de EBV no proporciona este aumento de anticuerpos.	IgG: 1.) específico para <u>primoinfecciones</u> de EBV 2.) marcador serológico para una reactivación de EBV

8.5 Tabla de interpretación

Evaluación	IgM	IgG		
		EBNA1	VCA	EA-D
	VCA	EBNA1	VCA	EA-D
Seronegativo	neg.	neg.	neg.	neg.
Indicación de una infección primaria	pos./neg.	neg.	pos./neg.	pos./neg.
Indicación de una infección pasada	neg.	pos./neg.	pos./neg.	neg./pos.

pos./neg.: por regla general, positivo

neg./pos.: por regla general, negativo

Aplicación del factor diagnóstico:

En ciertas circunstancias, los anticuerpos de VCA IgM pueden persistir a pesar de la respuesta inmunitaria de EBNA1 IgG existente.

En estos casos poco claros, en los que ambos marcadores altamente específicos son positivos, es decir, EBNA1 IgG para infecciones pasadas y VCA IgM para primoinfecciones, el **factor diagnóstico de 1,5** contribuye a proporcionar un diagnóstico claro. Los valores VE de EBNA1 IgG y VCA IgM se comparan y el parámetro que sea como mínimo un factor 1,5 mayor que el otro es el que determina el diagnóstico.

Si EBNA1 IgG y VCA IgM son positivos, entonces se aplica:

- Valor VE de **EBNA1 IgG** $\geq$ **1,5x** valor VE de **VCA IgM** $\Rightarrow$ **infección pasada**
- Valor VE de **VCA IgM** $\geq$ **1,5x** valor VE de **EBNA1 IgG** $\Rightarrow$ **primoinfección**

Ejemplo: VCA IgM: 25VE y EBNA1 IgG: 15VE

Valor VE de **VCA IgM: 25VE** $\geq$ **1,5x** 15 valor VE de **EBNA1 IgG: 22,5VE**
VCA IgM: 25VE $\geq$ **EBNA1 IgG: 22,5VE** $\Rightarrow$ **primoinfección**

Puesto que VCA IgM es como mínimo un factor 1,5 mayor que EBNA1 IgG, se puede establecer un diagnóstico claro de primoinfección.

8.6 Limitaciones del ensayo

1. La interpretación de resultados serológicos debe tener siempre en cuenta el cuadro clínico, los datos epidemiológicos y los otros resultados analíticos que puedan existir.
2. Un resultado negativo de la prueba ELISA no descarta por completo la posibilidad de una infección por EBV.
3. En el diagnóstico diferencial deben tenerse en cuenta gérmenes patógenos que den lugar a un cuadro clínico similar.
4. Se conocen reactividades cruzadas del virus de Epstein Barr contra la familia de los virus del herpes. En caso de resultado positivo de IgM es necesario descartar sobre todo las posibles reactividades cruzadas contra citomegalovirus.
5. Un resultado de IgM negativo no descarta la posibilidad de una infección primaria, ya que en algunos pacientes no desarrollan IgM en caso de infección aguda (7).
6. Al comienzo de una primoinfección, la serología de todos los parámetros puede ser negativa. Ante la sospecha clínica de que exista una infección de EBV con serología negativa, habrá que tomar una segunda muestra de sangre.
7. Un anti-EBNA1 negativo no es obligatoriamente indicativo de una primoinfección. En el caso de pacientes inmunodeprimidos, puede haber una pérdida de anti-EBNA1 secundario y en cerca del 5 % de los infectados por EBV (pacientes que no responden al EBNA1) no se forma anti-EBNA1 (7).
8. Una interpretación precisa de una infección de EBV debe basarse en los anticuerpos principales VCA IgG, VCA IgM y EBNA1 IgG mediante ELISA, Western Blot o Immunoblot. La EA-D IgG puede ofrecer información adicional en el caso de primoinfecciones y reactivaciones serológicas.
9. Antes del análisis, los anticuerpos transmitidos de forma pasiva pueden influir en el resultado serológico de EBV. Por ejemplo, eso es lo que sucede en caso de transfusiones de sangre o anticuerpos maternos transmitidos al bebé.
10. La serología de EBV por sí sola no arroja ninguna declaración fiable acerca de la relevancia clínica de una reactivación (9).

9. Literatura

1. Evans, A.S., J.C. Niedermann, L.C. Cenabre, B. West and V.A. Richards. (1975). A prospective evaluation of heterophile and EBV specific IgM antibody tests in clinical and subclinical infectious mononucleosis. J. Infect. Dis. 132:546-554.
2. Nikoskelainen, J., J. Leikola and E. Klemola. (1974). IgM antibodies specific for EBV in IM without heterophile antibodies. Br. Med. J. Oct 12.4(5936)72-5.
3. Klemola, E., R. von Essen, G. Henle and W. Henle. (1970). Infectious-monomucleosis-like disease with negative heterophil agglutination test. Clinical features in relation to Epstein-Barr virus and cytomegalovirus antibodies. J. Infect. Dis. Jun :121(6) :608-614.
4. Sumaya, C.V. and Y. Ench. (1985). Epstein-Barr virus infectious mononucleosis in children. II. Heterophil antibody and viral-specific responses. Pediatrics Jun: 75(6)1011-9.
5. Schmitz, H., D. Volz, C. Krainick-Riechert and M. Schere. (1972). Acute Epstein-Barr virus infections in children. Med Microbiol Immunol. 158(1):58-63.
6. Inoue, N. et al. (1992). Use of enzyme-linked immunosorbent assays with chimeric fusion proteins to titrate antibodies against Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. J Clin Microbiol. Jun;30(6):1442-8.
7. Bauer, G. (2001). Simplicity through complexity: immunoblot with recombinant antigens as the new gold standard in Epstein-Barr virus serology. Clin Lab. 47(5-6):223-30.
8. Modrow, S. und D. Falke (2010). Das Epstein-Barr Virus. S. 572-577. In: Molekulare Virologie, Spektrum Verlag, ISBN: 978-3-8274-1833-3.
9. Gärtner BC et al. (2000). No correlation in Epstein-Barr virus reactivation between serological parameters and viral load. J Clin Microbiol. Jun;38(6): 2458

Preparación de las muestras de paciente y la solución de lavado

▼ **Solución de lavado:** Añadir agua destilada/desionizada al concentrado hasta alcanzar 1 litro

▼ **Dilución del muestras IgG**
1:101

p.ej.
10 µl de suero/plasma + 1000 µl de tampón de dilución
(El tampón de dilución para suero está listo para utilizar)

▼ **Dilución del muestras IgM**
1:101

**Absorción del factor reumático con RF-
SorboTech**

p.ej.
5 µl de suero/plasma + 450 µl de tampón de dilución
1 gota de RF-SorboTech, incubar 15 min a temp. amb.

Realización de la prueba

