

**IVD**

Manual de instrucciones (Español)

**1 Finalidad**

La *recomLine EBV IgG [avidéz] [IgA]*, IgM es una prueba cualitativa para la detección de anticuerpos IgG, IgA e IgM, así como para determinar la avidéz de anticuerpos IgG contra el virus de Epstein-Barr (EBV) en suero o plasma humano. Para determinar el IgA anti EBV se puede solicitar por separado conjugado IgA. Para la determinación de la avidéz de los anticuerpos IgG se puede solicitar por separado el reactivo de la avidéz.

**2 Campo de aplicación**

El *recomLine EBV IgG [avidéz] [IgA]*, IgM es un inmunoensayo lineal que se basa en antígenos recombinantes del virus de Epstein-Barr. Debido a la alineación separada de los antígenos individuales, el principio de la prueba permite la identificación de anticuerpos específicos frente a las distintas clases de antígenos del virus, comparado con la prueba ELISA, de manera que se puede registrar en un tira de ensayo el espectro completo de reactividad. Esto facilita la asignación a los diferentes estadios posibles de una infección por EBV.

La *recomLine EBV IgG*, IgM se puede emplear como prueba de confirmación para el esclarecimiento de resultados de screening poco claros; también es posible su empleo como ensayo de screening.

**3 Principio de la prueba**

Unos antígenos recombinantes de EBV altamente purificados se fijan en tiras de ensayo con una membrana de nitrocelulosa. Las tiras de la *recomLine EBV IgG [avidéz] [IgA]* y las tiras de la prueba *recomLine EBV IgM* tienen una carga de antígenos diferente:

*recomLine EBV IgG [avidéz] [IgA]*: EBNA-1, p18 (VCA), p23 (VCA) BZLF1 (IEA), p138 (EA), p54 (EA)  
*recomLine EBV IgM*: p23 (VCA) ZEBRA (IEA), p138 (EA), p54 (EA)

Las tiras de ensayo se incuban con una muestra diluida del suero o plasma. Se añaden anticuerpos específicos en los antígenos del agente en la tira de ensayo.

1. Los anticuerpos no ligados se aclaran a continuación.
2. En un segundo paso, las tiras se incuban con anticuerpos de inmunoglobulina (IgG, IgA o IgM) anti-humanos que se han conjugado con peroxidasa de rábano.
3. Los anticuerpos conjugados no ligados se aclaran a continuación.
4. Con una reacción de color catalizada por la peroxidasa se comprueban los anticuerpos específicos ligados. Si ocurre una reacción antígeno-anticuerpo, aparecerá una barra oscura en el lugar correspondiente en la tira.

En el extremo superior de la tira de ensayo se encuentran las barras de control:

- a) El control de reacción, bajo el número de la tira, tiene que mostrar una reacción en cada suero o muestra de plasma.
- b) Los controles de conjugado (IgG, IgA, IgM) sirven para comprobar la clase de anticuerpos detectada. Si p. ej. se utiliza la tira de ensayo para la detección de anticuerpos IgG, la barra de control de conjugado IgG muestra claramente una barra.
- c) "Control de corte": la intensidad de esta barra permite evaluar de la reactividad de cada una de las barras de antígenos (véase 9.2 Evaluación).

**4 Reactivos**

**4.1 Contenido del paquete**

Los reactivos del paquete tienen una capacidad para 20 (200) determinaciones.

Cada juego de reactivos contiene:

<b>WASHBÜF A (10 X)</b>	100 ml (10x100ml) de buffer de lavado A (diez veces concentrado) Contiene buffer de fosfato, NaCl, KCl, detergente, conservantes: MIT (0,1%) y Oxyprion (0,2%)
<b>SUBS TMB</b>	40 ml (10x40ml) de sustrato cromógeno tetrametilbencidina (TMB, listo para el uso)
<b>MILKPOW</b>	5 g (10x5 g) de leche en polvo desnatada
<b>INSTRU</b>	1 manual de instrucciones
<b>EVALFORM</b>	1 (10) formulario de evaluación

**4.1.1 *recomLine EBV IgG [avidéz] [IgA]***

Además de los componentes indicados en el punto 4.1, cada juego de reactivos contiene lo siguiente:

<b>TESTSTR</b>	2 (20) tubitos con 10 tiras de ensayo numeradas
<b>CONJ IgG</b>	500 µl (10x500 µl) de conjugado IgG anti-humano (cien veces concentrado, tapón verde) de conejo, contiene NaN3 (<0,1%), MIT (<0,1%) y cloroacetamida (<0,1%)

*Determinación de la avidéz*

Para determinar la avidéz de los anticuerpos IgG de EBV se puede suministrar también, a petición, el reactivo de la avidéz con la Manual de instrucciones correspondiente.

<b>AVIDI</b>	1 reactivo de la avidéz (sólido 25g) para 60 ml de solución lista para el uso
--------------	---

*Determinación de IgA*

Para la determinación de anticuerpos IgA, además de la *recomLine EBV IgG* se puede pedir

<b>CONJ IgA</b>	500 µl de conjugado IgA anti-humano (cien veces concentrado, tapón incoloro) De conejo, contiene NaN3 (<0,1%), MIT (<0,1%) y cloroacetamida (<0,1%)
-----------------	--

**4.1.2 *recomLine EBV IgM***

Además de los componentes indicados en el punto 4.1, cada juego de reactivos contiene lo siguiente:

<b>TESTSTR</b>	2 (20) tubitos con 10 tiras de ensayo numeradas
<b>CONJ IgM</b>	500 µl (10x500 µl) de conjugado IgM anti-humano (cien veces concentrado, tapón lila) De conejo, contiene NaN3 (<0,1%), MIT (<0,1%) y cloroacetamida (<0,1%)

**4.2 Reactivos, materiales y aparatos necesarios adicionales**

- Cajas de incubación (se pueden pedir a MIKROGEN si fuera necesario)
- Agua desionizada (calidad alta)
- Pinzas de plástico
- Mesa vibratoria
- Mezclador Vortex u otro tipo de rotador
- Bomba de vacío u otro aparato correspondiente
- Probeta graduada, 50 ml y 1000 ml
- Micro pipetas con puntas de uso único, 20 µl y 1000 µl
- Pipeta de 10 ml o dispensador
- Temporizador
- Papel absorbente
- Guantes de protección de uso único
- Recipiente para sustancias biológicas peligrosas

**5 Durabilidad y uso**

- ♣ Almacene los reactivos antes y después de su uso a +2°C - 8°C, **no congelar**.
- ♣ Antes de comenzar con la prueba, deje templar todos los componentes a temperatura ambiental (+18°C - 25°C) durante 30 minutos como mínimo. La prueba debe llevarse a cabo a temperatura ambiental.
- ♣ Tampón de Lavado, Leche en Polvo, tampón de dilución, Conjugado y TMB se pueden intercambiar entre los diferentes sistemas de prueba *recomBlot* y *recomLine*, si estos componentes llevan los mismos símbolos. Considere la vida útil de estos componentes.
- ♣ Antes del uso, mezcle bien los reactivos concentrados y los sueros de los pacientes. Evite la generación de espuma.
- ♣ Abra los tubitos y las tiras de ensayo justo antes del uso para evitar la generación de agua condensada. Las tiras no necesarias se mantienen en el tubito y se siguen almacenando a +2°C - 8°C (cierre bien el tubito; las tiras de ensayo no se deben mojar antes del comienzo de la prueba).
- ♣ Las tiras se marcan con una numeración correlativa, así como con la abreviación de la prueba.
- ♣ Los paquetes llevan una fecha de expiración. Al llegar a dicha fecha no se puede garantizar la calidad de los productos.
- ♣ Proteja de la luz solar directa los componentes del kit durante todo el proceso de prueba. La solución de sustrato (TMB) es especialmente sensible a la luz.

- ⌘ La prueba sólo debe llevarse a cabo por un personal especializado cualificado y autorizado.
- ⌘ Al realizar cambios sustanciales en el producto o en la prescripción de su uso, puede que dicho uso no se corresponda con la finalidad determinada por MIKROGEN.
- ⌘ Una contaminación cruzada de las muestras de los pacientes o de los conjugados puede llevar a resultados de prueba incorrectos. Añada las muestras de los pacientes, las tiras de ensayo y la solución del conjugado de forma cuidadosa. Cuide de que las soluciones de incubación no entren en otras concavidades. Decante el líquido cuidadosamente.
- ⌘ Las tiras deben estar mojadas y sumergidas durante todo el proceso.
- ⌘ Es posible automatizar el proceso; para obtener más información, consulte con MIKROGEN.

## 6 Advertencias y medidas de seguridad

- ⌘ Utilizar sólo para el diagnóstico *in-vitro*.
- ⌘ Todos los productos de sangre deben tratarse como potencialmente infecciosos.
- ⌘ Las tiras de ensayo se fabricaron con lisados de células enteras inactivadas y / o recombinantes producidos por antígenos bacterianos, virales o parasitarios.
- ⌘ Después de añadir el material de paciente o de control, la tira debe considerarse como potencialmente infecciosa y tratarla correspondientemente.
- ⌘ Durante todo el proceso de prueba deben utilizarse guantes de uso único.
- ⌘ Los reactivos contienen la sustancia antimicrobica y conservante azida sódica, MIT (metilisotiazolinona), Oxyprion, cloroacetamida y peróxido de hidrógeno. Debe evitarse el contacto con la piel o la mucosa. La azida sódica puede formar azidas explosivas al contacto con metal pesado como cobre y plomo.
- ⌘ Todos los líquidos succionados deben recogerse. Todos los recipientes colectores deben contener desinfectantes adecuados para la inactivación de virus patógenos humanos y otros agentes patógenos. Todos los reactivos y materiales que han tenido contacto con muestras potencialmente infecciosas deben tratarse con un desinfectante adecuado o eliminarse correspondiente a sus normas de higiene. Deben tenerse en cuenta las indicaciones de concentrado y los tiempos de incubación de los fabricantes.
- ⌘ Las cajas de incubación deben utilizarse una sola vez.
- ⌘ Trate las tiras cuidadosamente con una pinza de plástico.
- ⌘ No sustituya o mezcle los reactivos con los reactivos de otros fabricantes.
- ⌘ Antes de llevar a cabo la prueba, lea atentamente el manual de instrucciones completo y siga las instrucciones debidamente. El no seguir el protocolo de prueba del manual de instrucciones puede llevar a resultados incorrectos.

## 7 Toma de muestras y preparación de reactivos

### 7.1 Material de muestra

El material de muestra puede ser suero o plasma (ácido etilendiaminotetraacético, citrato, heparina, CPD) que debe separarse rápidamente del coágulo sanguíneo después de la toma de muestras para evitar una hemólisis. Debe evitarse la contaminación microbiana de la muestra. Las sustancias no solubles deben eliminarse de la muestra antes de la incubación.

No se recomienda la utilización de muestras inactivadas por calor, ictericas, hemolizadas, lipémicas o empañadas.

#### ¡Atención!

**Si las determinaciones no se van a realizar inmediatamente, es posible guardar el material de muestra hasta dos semanas a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C. Las pruebas se pueden almacenar de forma prolongada a - 20 °C o menos. No se recomienda la congelación y descongelación repetida de la muestra debido al peligro de resultados incorrectos. Evitar más de 3 ciclos de congelación y descongelación.**

### 7.2 Preparación de las soluciones

#### 7.2.1 Preparación del buffer de lavado A listo para el uso

Este buffer se necesita para la dilución del suero y del conjugado, así como los pasos de lavado.

Antes de diluir, debe determinarse el volumen del buffer de lavado A para el número correspondiente de pruebas que se van a realizar.

La leche en polvo desnatada se disuelve previamente en el concentrado de buffer de lavado A. Esta mezcla se completa posteriormente con agua desionizada hasta el volumen final (dilución:

1 + 9). Las cantidades necesarias para un número definido de tiras de ensayo se calculan según la siguiente fórmula (no se tiene en cuenta el volumen muerto específico del aparato):

Reactivo	Fórmula	Ejemplo: 5 tiras
Leche en polvo desnatada [g]	= número de tiras x 0,1	0,5 g
Concentrado de buffer de lavado A [ml]	= número de tiras x 2	10 ml
Agua desionizada [ml]	= número de tiras x 18	90 ml
Buffer de lavado A listo para el uso [ml]	= número de tiras x 20	100 ml

El buffer de lavado A listo para el uso puede almacenarse durante **cuatro semanas a 2 °C – 8 °C**. El buffer de lavado A listo para el uso es inodoro y está ligeramente empañado.

#### 7.2.2 Preparación de las soluciones de conjugado

La solución de conjugado debe prepararse **justo antes del uso**; no es posible un almacenamiento de la solución de conjugado lista para el uso.

Una parte del concentrado de conjugado se diluye con 100 partes de buffer de lavado A listo para el uso (1 + 100).

Las cantidades necesarias para un número definido de tiras de ensayo se calculan según la siguiente fórmula:

Reactivo	Fórmula	Ejemplo: 5 tiras
Concentrado de conjugado [µl]	= número de tiras x 20	100 µl
Buffer de lavado A listo para el uso [ml]	= número de tiras x 2	10 ml

Las cantidades del conjugado se han calculado sin volumen muerto.

Dependiendo del procesamiento (manualmente o con un aparato) debe prepararse la solución de conjugado para entre 1 y 3 tiras.

## 8 Procedimiento de prueba

N.º	Realización	Notas
1	Antes de comenzar con la prueba, deje templar todos los reactivos a 18°C - 25°C (temperatura ambiental) durante 30 minutos como mínimo.	La prueba debe llevarse a cabo a temperatura ambiental.
2	<b>Preparación de las tiras de ensayo</b> Moje las tiras en 2 ml de <b>buffer de lavado A</b> listo para el uso.  <b>Importante:</b> Las tiras de IgG e IgM no son intercambiables!	No toque las tiras con las manos: utilice unas pinzas. El número de la tira debe apuntar hacia arriba. Por cada tira se necesita una concavidad en una caja de incubación (véase 4.2). Las tiras deben sumergirse por completo.
3	<b>Incubación de muestras</b> a) Se pipetea 20 µl de una muestra no diluida (suero humano o plasma) por cada bloque de incubación en la tira de ensayo. (dilución 1 + 100) b) <b>Incuba durante 1 hora</b> agitando ligeramente	Pipetea la muestra en un extremo de la tira sumergida en el buffer de lavado A y mezcle cuanto antes agitando cuidadosamente la charola de incubación. Cubra la caja de incubación con una tapa de plástico y póngala en el mezclador.
4	<b>Lavar</b> a) Retire cuidadosamente la tapa de plástico de la caja de incubación. b) Succione cuidadosamente la dilución de suero de las concavidades. c) Pipetea 2 ml de <b>buffer de lavado A</b> listo para el uso en cada concavidad, lave durante 5 minutos agitando ligeramente y a continuación succione el buffer de lavado A.	Realice los pasos de lavado 8.4a-8.4c tres veces. Evite la contaminación cruzada  En caso de procesamiento con un aparato, deben tenerse en cuenta los avisos del fabricante.
5	<b>Incubación con conjugado</b> Añada 2 ml de la <b>solución de conjugado</b> lista para el uso e incuba durante 45 minutos agitando ligeramente.	Cubra la caja de incubación con la tapa de plástico y póngala en el mezclador.
6	<b>Lavado</b> véase el apartado 8.4	Realice los pasos de lavado tres veces (véase 8.4a-8.4c)
7	<b>Reacción de sustrato</b> Añada 1,5 ml de la <b>solución de sustrato</b> e incúbela durante 8 minutos agitándola ligeramente.	
8	<b>Interrumpir la reacción</b> Lave brevemente 3 veces como mínimo con <b>agua desionizada</b> .	
9	<b>Secar las tiras</b> Seque las tiras antes de la evaluación durante 2 horas entre dos capas de papel absorbente.	Retire las tiras cuidadosamente del agua con unas pinzas de plástico. Guarde las tiras protegiéndolas ante la luz.
<b>¡Atención!</b> <b>Las soluciones de incubación no deben entrar en otras concavidades. Deben evitarse chispas especialmente al abrir y cerrar la tapa.</b>		

## 9 Resultados

### Atención:

No utilice la interpretación automática sin seguir las indicaciones descritas a continuación en cuanto a la interpretación.

### 9.1 Validación y control de calidad

Se puede proceder al análisis de una prueba siempre que se cumplan los siguientes criterios:

1. Barra de control de reacción (línea superior) claramente teñida, barra oscura
2. Clase de anticuerpos:  
Tiras de LEBG (segunda y tercera barra): la barra de control de conjugado correspondiente debe aparecer teñida en un color diferente. En la tira de ensayo, la otra barra de control de conjugado puede desarrollar una coloración débil inespecífica.  
Tira de LEBM (segunda barra): la barra de control de conjugado debe aparecer teñida en un color diferente.
3. Control de corte (LEBG: cuarta barra, LEBM: tercera barra): teñida en un color más débil pero visible

### 9.2 Evaluación

La evaluación de las tiras de ensayo se puede realizar de forma visual o informatizada con el software de supervisión y escaneo de tiras de ensayo *recom*. El software para escaneo *recom* está diseñado para el apoyo de la interpretación de las tiras de ensayo. Para obtener más información y unas instrucciones adecuadas acerca de la evaluación asistida por computador, consulte con MIKROGEN. Las instrucciones siguientes hacen referencia a la evaluación visual.

#### 9.2.1 Valoración de la intensidad de la barra

1. Anote en el formulario de evaluación adjunto la fecha y el número de lote, así como las categorías de anticuerpos detectadas.
2. Escriba los números de identificación de las muestras en el formulario de evaluación.
3. Pegue con pegamento las tiras de ensayo pertenecientes en el campo correspondiente del formulario de evaluación. Para ello, ajuste las tiras de ensayo con las barras de control de reacción en las rayas marcadas. A continuación, fije con una cinta adhesiva transparente las tiras de ensayo a la izquierda de las rayas marcadas (no pegue barras de control de reacción encima de otras). Extienda el pegamento en una capa uniforme por toda la tira de ensayo o de lo contrario, la cinta adhesiva modificará la coloración.
4. Identifique las barras de las tiras de ensayo desprendidas mediante la cinta de control impresa del formulario de evaluación y anótelas en el formulario de evaluación. Para ello, efectúe mediante la Tabla 1 la evaluación de la intensidad de las barras presentadas separadas por la categoría de inmunoglobulina correspondiente.

**Tabla 1:** Valoración de la intensidad de la barra con respecto a la barra de corte

Intensidad de color de las barras	Valoración
Sin reacción	-
Intensidad muy débil (menor que la barra de corte)	+/-
Intensidad débil (correspondiente a la barra de corte)	+
Intensidad fuerte (más fuerte que la barra de corte)	++
Intensidad muy fuerte	+++

### ¡Atención!

En la detección de IgG, IgA e IgM con la *recomLine* EBV, las barras pueden mostrar distintas intensidades. Es posible que la *recomLine* EBV IgG muestre unas barras más sólidas y oscuras que la *recomLine* EBV IgM o *recomLine* EBV IgA. La intensidad de las barras de proteínas depende de la concentración de los anticuerpos específicos para EBV.

Valoración de la avidez: véase el capítulo 9.5.

### 9.3 Interpretación de los resultados de la prueba

- La detección de IgG es necesaria en todos los casos.
- Un suero se puede calificar de reactivo EBV en cuanto aparece en las tiras como mínimo una barra de antígeno en la intensidad "+".
- Se produce un resultado negativo si no aparece ninguna barra o aparecen barras aisladas en la intensidad "±".

Para realizar una evaluación del estado inmunológico de EBV es siempre necesario considerar en conjunto los resultados de la detección de IgG y de IgM.

En la mayoría de los casos, el estado de EBV se caracteriza por reactividades de anticuerpos contra diversos antígenos clave y la aparición de las situaciones típicas de las barras de antígenos. Estos antígenos de EBV y su importancia en la determinación del estado de

infección por EBV están resumidos en la Tabla 2. Sin embargo, debido a la biología del EBV y la respuesta inmune individual, no se pueden aplicar especificaciones estrictas a los modelos de reactividad exigibles para todos los antígenos en la división por estadios. Las situaciones de las barras de antígenos que aparecen con frecuencia se muestran en Tabla 3.

**Tabla 2:** Antígenos clave de los diferentes estadios de la infección

Antígeno	Clasificación	Valoración del estado de EBV
EBNA-1	Antígeno-1 nuclear de Epstein-Barr p72	Importancia diagnóstica elevada, marcador central para infecciones anteriores, EBNA-1 IgG confirma una infección pasada y excluye una infección primaria aguda
p18	VCA (antígeno de la cápside viral)	p18 <sup>Mikrogen</sup> es un p18 modificado, los títulos de IgG son un segundo marcador central para infecciones de EBV pasadas
p23	VCA (antígeno de la cápside viral)	Los anticuerpos suelen ser ya detectables al principio de una infección en IgG e IgM. Los anticuerpos IgG se mantienen detectables en caso de infecciones anteriores.
ZEBRA	IEA (antígeno temprano inmediato); Secuencia parcial inmunodominante de la proteína ZEBRA	Buen marcador de IgM para la detección de una infección aguda por EBV
BZLF1	IEA (immediate early antigen; antígeno temprano inmediato); Proteína ZEBRA completa	Anticuerpos IgG e IgA detectables en la fase temprana, la reactividad de IgG se encuentra frecuentemente en caso de infecciones anteriores
p138 p54	EA (early antigens; antígenos tempranos)	Reactividad en IgG, IgM e IgA probable en el caso de infección aguda en todas las clases de anticuerpos

**Tabla 3:** Interpretación de las reactividades - Modelos de reacción típicos

IgG: EBNA-1 y p18 negativo (p23, BZLF1, p138, p54 posible) IgM: ZEBRA, EA (p54 y/o p138) positivo, p23 posible	<b>Primera infección - Mononucleosis infecciosa</b>
IgG: EBNA-1 y/o p18 positivo, p23 y BZLF1 frecuentemente positivo; posibilidad de títulos EA débiles IgM: negativo	<b>Infección pasada</b>
IgG: como en el caso de infección pasada; además, reacción débil con antígenos EA IgM: reactividad débil contra EA y/o ZEBRA y/o p23	<b>Reactivación secundaria (no relevante clínicamente)</b>
IgG: reacción intensa con todos los antígenos; excepcionalmente, pérdida de anti EBNA IgM: son posibles reactividades débiles IgA: reactividades claras con EA y/o BZLF1 y/o VCA	<b>Reactivación*</b>
Cuadro serológico como en la reactivación (títulos IgA elevados)	<b>Linfomas asociados a NPC y EBV</b>
Ausencia de barras específicas de EBV en la determinación de IgG, IgM e IgA	<b>EBV negativo</b>
IgG/IgM/IgA: aparición aislada de barras (excepto EBNA-1 de IgG o VCA de IgG) en solo una clase de anticuerpos, si son negativas todas las demás clases	<b>Estado de EBV poco claro</b> (conviene repetir la prueba en el transcurso del tiempo, aprox. 2-3 semanas)

\* Por reactivación de EBV se entiende la reanudación de una reproducción lítica en una persona con infección latente. La magnitud de esta reproducción puede ser muy reducida y de corta duración, p. ej. en caso de trastorno breve del sistema inmunológico por otras infecciones o por otras causas; pero también de larga duración y masiva, p. ej., en pacientes con trastorno inmunológico o bajo los efectos de inmunosupresores; en tales casos existe el riesgo de linfomas asociados al EBV. Son posibles todos los estadios intermedios. Una reproducción de EBV durante un tiempo breve, no relevante clínicamente, se considera "reactivación secundaria".

### 9.4 Importancia de los anticuerpos IgG contra el antígeno p18 de MIKROGEN

Para la interpretación de la validez del antígeno r-p18 se han realizado nuevas evaluaciones exhaustivas. Los resultados se pueden resumir del siguiente modo:

- Los anticuerpos IgG anti p18 positivos no se pueden detectar hasta como mínimo 3 semanas después del inicio de la enfermedad.
- Por medio de la detección de anticuerpos IgG anti EBNA-1 y/o anti p18 se pueden comprobar inequívocamente infecciones por EBV anteriores.

- El IgG anti p18 es, con el IgG anti EBNA 1, un segundo marcador central en la serología del EBV. Su ventaja decisiva consiste en que los pacientes con falta de formación de anticuerpo anti EBNA-1 tras infección por EBV o pérdida secundaria de anti EBNA-1 presentan estos marcadores, y de este modo se pueden valorar correctamente como infección por EBV post aguda o anterior. Estos casos se han descrito en pacientes con inmunosupresión e inmunodeficiencia, entre otros.

### 9.5 Ampliación del diagnóstico mediante determinación de la avidéz

Los anticuerpos IgG pasan por una maduración; los anticuerpos de la fase temprana son poco ávidos, mientras que los anticuerpos de la infección pasada presentan una avidéz elevada. Los anticuerpos poco ávidos se pueden lavar en lugar de fijación en la tira por medio de un reactivo de la avidéz, mientras que los anticuerpos altamente ávidos no se pueden desprender. El procesamiento paralelo de 2 pruebas de IgG, una de las cuales ha de ser tratada con el reactivo de la avidéz, permite determinar si se trata de anticuerpos IgG de avidéz baja (suceso agudo) o de avidéz alta (infección pasada).

#### 9.5.1 Principio y realización de la prueba

La avidéz de los anticuerpos IgG de EBV se puede determinar con el reactivo de la avidéz, artículo nº 11010. Para realizar la prueba utilice la información de uso del reactivo de la avidéz.

#### 9.5.2 Evaluación e interpretación de la avidéz en la recomLine EBV IgG

- Realizar la determinación de la avidéz únicamente en caso de hallazgo total de IgG positivo.
- Las barras de las tiras de IgG que en cuanto a su reactividad son inferiores a la de corte no se tienen en cuenta al determinar la avidéz.
- Compare las intensidades de las barras correspondientes en las dos tiras de ensayo (tira de IgG y tira de avidéz) que se han incubado con la misma muestra del paciente. Observe con atención si han variado las intensidades.
- Una disminución de la intensidad de las barras VCA (p18, p23) en más del 60% puede considerarse como avidéz reducida; una disminución de entre el 40 y el 60%, como intermedia.
- Con una avidéz alta, la intensidad de la barra de la tira de avidéz disminuye en menos del 40%; los anticuerpos IgG se consideran altamente ávidos.
- Una disminución selectiva de la intensidad de las barras de EA o IEA (p54, p138 y BZLF1) no es indicio de una infección reciente, porque la maduración de estos anticuerpos no permite llegar con seguridad a una conclusión sobre el estado de la infección. En el curso de una reactivación o reactivación secundaria se pueden volver a formar anticuerpos con avidéz reducida.
- De forma general se considera que para la valoración de la avidéz no se pueden establecer reglas absolutas. En algunos casos individuales debe tenerse en cuenta que no se pueden descartar tampoco avidéces bajas en casos de infecciones anteriores, porque es posible un retraso en la maduración. La avidéz se ha interpretar siempre en relación con todos los resultados del examen.

**Tabla 4:** Indicaciones de interpretación para evaluar el estado de infección en la determinación de la avidéz Valoración de la avidéz de las barras VCA p18 y p23.

IgG Modelos de reacción	IgG Determinación de la avidéz	Estado de infección por EBV Interpretación
negativo	no aplicable	no hay indicio serológico de una infección
positivo BZLF1, p138, p54	La avidéz de los anticuerpos contra BZLF1, p54, p138 no permite extraer conclusiones para la determinación del estado de la infección	Sospecha de infección aguda
positivo p23, BZLF1, p138, p54	p23: baja/intermedia	Sospecha de infección aguda
positivo p23, BZLF1, p138, p54	p23: alta	Sospecha de infección reciente
positivo p18, p23, BZLF1, p138, p54	p18: baja-intermedia p23: alta	Sospecha de infección reciente
positivo p18, p23, BZLF1, p138, p54	p18: alta p23: alta	Infección anterior
positivo EBNA-1, p18, p23, BZLF1, p138, p54	p18: alta p23: alta	Infección anterior

## 10 Límites y restricciones del método

- Los resultados de las pruebas de serología se han de contemplar siempre en relación con otras evaluaciones médicas de pacientes. Las consecuencias terapéuticas de los hallazgos en serología están relacionadas con los datos clínicos que se van a observar.
- Una respuesta serológica tras una infección vírica se caracteriza por una variabilidad elevada. En la serología del EBV se presenta este problema debido a la combinación de diversos marcadores. En estos casos tiene una importancia primordial el anti EBNA-1: un anti EBNA-1 positivo descarta con seguridad una infección aguda por EBV. Un anti-EBNA-1 negativo puede indicar una infección reciente o ser negativo secundario (p. ej., debido a una pérdida de anti EBNA-1 en caso de inmunosupresión). Además, aprox. el 5% de los infectados por EBV no forman anti EBNA-1 al término de la infección, por lo que simulan una infección reciente.
- Estas lagunas diagnósticas se pueden cubrir por medio de un segundo marcador, antígeno VCA p18 de Mikrogen. Los datos de la evaluación mostraron que los anticuerpos IgG contra p18 excluyen una infección reciente. Por lo tanto el anti p18 es similar a la respuesta a EBNA-1, pero con la ventaja decisiva de que las personas con pérdida de anti EBNA-1 no suelen perder este marcador posterior, y de este modo se pueden valorar serológicamente de forma correcta (véase también la sección 9.4).
- En base a estos datos siempre se puede descartar una infección reciente si son detectables en el anticuerpo IgG contra EBNA-1 y/o p18.
- Un resultado de la prueba poco claro se obtiene en caso de que solo se pueda reconocer la aparición aislada de una barra en el IgG o IgM (exceptuando los marcadores EBNA-1 y VCA) y sean negativas todas las demás clases de anticuerpos. Aquí se podría tratar de un inicio de reacción en una primera infección, pero también de una reacción cruzada. Es conveniente repetir la prueba con una nueva toma de suero al cabo de una, dos o hasta tres semanas.
- Un resultado negativo no excluye la posibilidad de una infección por EBV. Si las muestras de suero se han tomado muy poco después de una infección, es posible que el resultado sea un falso negativo.
- Tira de ensayo oscura:** Algunas muestras de los pacientes pueden provocar un color oscuro, general o irregular, en todas las cintas de nitrocelulosa (por ejemplo, en sueros de pacientes con alergia a las lactoproteínas). Son varios los factores responsables de los sueros de los pacientes correspondientes. La evaluación de estas cintas sólo es posible, por regla general, con ciertas restricciones. Por ejemplo, las barras "inversas" (barras blancas en un fondo oscuro) se consideran negativas. El suero correspondiente debe comprobarse en todo caso mediante otro método de serología.

## 11 Características de potencia

### 11.1 Sueros de la rutina de EBV

Se examinaron 252 sueros del diagnóstico rutinario en la recomLine EBV IgG/M/A. Los sueros se habían enviado planteando la sospecha de una infección aguda por EBV. Las muestras de suero se preseleccionaron en parte con ayuda de los resultados de screening en infecciones agudas y EBV negativas.

**Tabla 5:** Valoración de las muestras de rutina de EBV

recomLine EBV Interpretación	Screening EBV-ELISA Estado de EBV n (%)			Total
	Negativo	Agudo <sup>1</sup>	Anterior <sup>2</sup>	
Negativo	64 (26%)	0 (0%)	0 (0%)	64 (26%)
Dudoso	8 (3%)	5 (2%)	0 (0%)	13 (5%)
Aguda/reciente	2 (1%)	115 (46%)	0 (0%)	117 (47%)
Anterior	3 (1%)	10 (4%)	45 (18%)	58 (23%)
<b>Total</b>	<b>77 (31%)</b>	<b>130 (52%)</b>	<b>45 (18%)</b>	<b>252</b>

<sup>1</sup>Resultados de ELISA EBV: IgG de EBNA-1: negativo, VCA-G: positivo/en valores límite/negativo, VCA-M: positivo

<sup>2</sup>Resultados de ELISA EBV: IgG de EBNA-1: positivo/en valores límite, VCA-G: positivo, VCA-M: negativo/en valores límite

En las pruebas de screening se valoraron 15/130 muestras con sospecha de una infección primaria, que luego no se confirmó en la recomLine EBV. Diez de estos sueros se clasificaron como infecciones ya pasadas (EBNA-1 negativo, pero reactividad p18 intensa, altamente ávida, en IgG). Cinco sueros se hubieron de clasificar como EBV-dudoso, porque solo había reaccionado un antígeno en una clase de inmunoglobulina.

En otros 13 sueros clasificados como negativo en el ELISA tipo screening no se pudo confirmar el hallazgo previo. Tres muestras se caracterizaron con la recomLine EBV como infección ya pasada (EBNA-1 negativo, pero reactividad p18 intensa, altamente ávida, en el IgG e IgM negativo). Dos muestras se reconocieron como infección por EBV aguda o reciente, y ocho muestras tenían un estado de EBV poco claro, porque en la recomLine EBV solo había reaccionado un antígeno en una clase de inmunoglobulina. Para aclarar estos resultados dudosos es conveniente repetir la prueba pasadas de dos a tres semanas.

### 11.2 Sueros de desarrollos agudos de la infección por EBV

Se examinaron un total de cinco desarrollos de infecciones por EBV supuestamente agudas, constituidos en cada caso por 6-9 exclusiones (n= 38 exclusiones de suero de cinco desarrollos). En dos desarrollos se utilizaron muestras de suero antes de la infección, que se reconocieron como EBV-negativo. En todos los desarrollos ya se podía reconocer a partir de la primera exclusión de la infección primaria una respuesta de IgG clara. Los antígenos tempranos BZLF1, p138 y p54 reaccionan claramente de forma positiva; solo en un desarrollo no se detectaron anticuerpos contra BZLF1 hasta un mes después de la primera exclusión. La reactividad de IgM fue claramente positiva desde el principio en todos los desarrollos (ZEBRA y p54, en parte p138 y p23). En el desarrollo ulterior de la infección se formaron anticuerpos IgG contra p23, p18 y, finalmente, contra EBNA-1. La avidéz de IgG contra p23, p18 y EBNA-1 aumentó paulatinamente, disminuyendo paralelamente la reactividad IgM.

### 11.3 Infestación

recomLine EBV IgG [IgA], IgM Infestación	Donantes de sangre (n=100)		
	IgG	IgM	IgA
	93 %	8 %	26 %

El estado inmunológico de EBV teniendo en cuenta los resultados de todas las clases de anticuerpos se clasificó en 93 muestras como infección pasada de EBV, y en siete como EBV negativo.

### 11.4. Avidéz

Se sometieron a ensayo dos paneles (30 donantes de sangre seropositivos, 35 infecciones agudas/recientes) con la *recomLine EBV IgG*.

En el panel de donantes de sangre (infecciones pasadas), los anticuerpos contra EBNA-1 y/o p18 y/o p23 eran altamente ávidos en 29/30 muestras. En las infecciones agudas/recientes, la avidéz de los anticuerpos anti p23 y anti p18 fue de baja a intermedia.

En estudios anteriores de gran alcance con sueros de rutina (n=1577) de la serología se examinó a fondo la avidéz de los anticuerpos contra EBNA-1, p18 y p23 con ayuda de la versión anterior de la *recomLine EBV*. 90/1577 (5,7%) fueron seronegativos, 7/1577 (0,4%) presentaron un resultado dudoso y 1480/1577 (93,8%) fueron positivos en la *recomLine EBV IgG*.

1156/1480 de las muestras de pacientes positivas mostraron en la *recomLine EBV IgG* una infección anterior clásica. En las restantes 324 muestras de los resultados IgG positivos se realizó una determinación de la avidéz y se determinaron las siguientes reactividades:

Infecciones recientes por EBV (42 de 324 muestras):

En la mayoría de los casos estaban presentes anticuerpos anti EA (p138 y p54) con diferente grosor de barra y maduración de la avidéz. En 2/3 de los casos había presentes anticuerpos anti p23 en el IgG de poco ávidos a medianamente ávidos, no había presencia de marcadores tardíos (anti p18, anti EBNA-1).

Infecciones recientes (12 de 324 muestras):

No se detectaron anticuerpos contra EBNA-1 de poco ávidos a medianamente ávidos contra p18 y anticuerpos altamente ávidos contra p23.

Infecciones antiguas por EBV (270 de 324 muestras):

Las muestras de este grupo mostraron para los marcadores posteriores (EBNA-1, p18) y p23 diferentes combinaciones con intensidades de barra negativas, débilmente positivas (+) y claramente positivas (2+). Los marcadores existentes mostraron siempre una avidéz elevada y aseguraron la valoración como infección anterior.

### 11.4 Especificidad analítica

La especificidad analítica se define como la capacidad de la prueba y analíticas para determinar con exactitud dependiendo de la disponibilidad de los factores de interferencia potenciales en la matriz de la muestra (por ejemplo, anticoagulantes, hemólisis, efecto del procedimiento de la prueba) o reacciones cruzadas con los anticuerpos de interferencia potenciales.

a) Interferencias: Estudios de control de los factores de interferencia potencial muestran que el rendimiento de la prueba no se ve influida por anticoagulantes (citrato de sodio, ácido etilendiaminotetraacético, heparina), hemólisis (hasta 1000 mg/dl de hemoglobina), lipemia, bilirrubinemia (hasta 20 mg/dl de bilirrubina) o tres ciclos de solidificación o descongelación.

b) Reacciones cruzadas: En los estudios de control se han analizado las interferencias potenciales de anticuerpos contra otros organismos que pudieran producir síntomas clínicos parecidos a los de una infección por el virus de Epstein-Barr Virus (p. ej., CMV, HSV). Además se han comprobado otras condiciones que se deben a la actividad atípica del sistema inmunológico, como el factor reumatoide No se ha comprobado ninguna reactividad cruzada. Un colectivo de muestras de pacientes ANA positivo produjo una reactividad de anticuerpos IgG de EA e IGA, sin perjuicio del hallazgo como infección anterior por EBV.

## 12 Bibliografía

- Epstein, M.A. (et al.), The Epstein-Barr Virus. Editorial Springer, Nueva York, 1979
- Ewig, S. (et al.), "Das "chronische Müdigkeitssyndrom" ("Chronic fatigue Syndrome)", Klin. Wochenschr. 68: 789-796 (1990)

- Gorgievski-Hrisoho, M. (et al.), "Serodiagnosis of Infectious Mononucleosis by using recombinant Epstein-Barr Virus Antigens and Enzyme-linked immunosorbent assay technology", J. Clin. Microbiol. 28, 2305-2311 (1990)
- Nebel-Schickel, H., Hinderer, W., Saavedra, C., Schmutzler, R., Horn, J., Vomhagen, R., Sonneborn, H.-H., "Anti-EBNA-1 (Carboxy-Half) IgG Antibodies as a seroepidemiological marker for Epstein-Barr Virus Infection", Transfusionsmedizin 32: 134-137 (1994)
- Jilg, W. (et al.), "Diagnostic significance of antibodies to the Epstein-Barr virus-specific membrane antigen gp 250", J. Infect. Dis. 152, 222-225 (1985)
- Motz, M. (et al.), "Expression of proteins encoded by Epstein-Barr Virus", en New Approaches to Immunisation. Cold Spring Harbor Laboratory (1986)
- Bauer, G., "Die Aussagemöglichkeiten der Epstein-Barr-Virusdiagnostik", Internist 33: 586-592 (1992)
- Schubert J., Zens W., Weißbrich B., "Comparative evaluation of the use of immunoblots and of IgG avidity assays as confirmatory tests for the diagnosis of acute EBV infections", J. Clin. Virol. 11: 161-72 (1998)
- Bauer, G, EBV-Reaktivierung und Serologie
- Pottgiesser T, Wolfarth B, Schumacher YO, Bauer G., "Epstein-Barr virus serostatus: no difference despite aberrant patterns in athletes and control group", Med Sci Sports Exerc. oct. de 2006; 38(10):1782-91

Le enviamos más información a petición suya sobre el diagnóstico del EBV.

## 13 Explicación de los símbolos

	Contenido suficiente para <n> pruebas Número de pruebas
<b>WASHBUF A 10 X</b>	Buffer de lavado A (diez veces concentrado)
<b>SUBS TMB</b>	Substrato cromógeno tetrametilbencidina
<b>MILKPOW</b>	Leche en polvo desnatada
<b>TESTSTR</b>	Tiras de ensayo
<b>CONJ IgG</b>	Conjugado IgG anti-humano
<b>AVIDI</b>	Reactivo de la avidéz
<b>ADD</b>	Reactivo adicional disponible bajo petición
<b>CONJ IgA</b>	Conjugado IgA anti-humano
<b>CONJ IgM</b>	Conjugado IgM anti-humano
<b>EVALFORM</b>	Formulario de evaluación
<b>INSTRU</b>	Manual de instrucciones
	Ver manual de instrucciones
<b>CONT</b>	Contenido, contiene
<b>IVD</b>	Prueba in vitro
<b>LOT</b>	Número de lote
	No congelar
<b>REF</b>	Número de pedido
	Utilizado por Fecha de caducidad
	Almacenamiento de °C a y°C
	Fabricante

## 14 Datos del fabricante y versión

<b>recomLine EBV IgG [avidéz] [IgA]</b>	Artículo n° 4572 (4576)
<b>recomLine EBV IgM</b>	Artículo n° 4573 (4577)
<b>Manual de instrucciones</b>	GARLEB014ES
válido desde	2015-06
	<b>MIKROGEN GmbH</b> Floriansbogen 2-4 82061 Neuried Alemania Tel. +49 89 54801-0 Fax +49 89 54801-100 Correo elect. mikrogen@mikrogen.de Internet www.mikrogen.de



GARLEB014ES