



# Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original breve

## Evaluación del sistema VIDAS para estudio de marcadores serológicos de infección por el virus Epstein Barr

Fernando De Ory<sup>a,\*</sup>, María Eulalia Guisasola<sup>a</sup>, Juan Carlos Sanz<sup>b</sup> e Isabel García-Bermejo<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Servicio de Microbiología Diagnóstica, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, España

<sup>b</sup> Unidad de Microbiología Clínica, Laboratorio Regional de Salud Pública de la Comunidad de Madrid, Madrid, España

<sup>c</sup> Servicio de Microbiología, Hospital Universitario de Getafe, Getafe, Madrid, España

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

#### Historia del artículo:

Recibido el 24 de octubre de 2011

Aceptado el 11 de junio de 2012

On-line el 31 de julio de 2012

#### Palabras clave:

Virus Epstein-Barr

Ensayo fluorescente ligado a enzima

Inmunofluorescencia

### R E S U M E N

Se han evaluado ensayos de fluorescencia ligada a enzima (VIDAS EBV VCA IgM, VIDAS EBV VCA/EA IgG y VIDAS EBV EBNA IgG (Biomérieux, Francia) para la determinación de marcadores de infección por el virus Epstein Barr, así como para el establecimiento de perfiles de anticuerpos, comparándolos con ensayos de inmunofluorescencia como referencia. Los ensayos evaluados han mostrado buenas características de sensibilidad, especificidad y coincidencia porcentual de resultados, lo que les hace adecuados para su aplicación en laboratorios de diagnóstico clínico.

© 2011 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

### Performance of the VIDAS automated immunoassay for the determination of Epstein-Barr virus serological status

#### A B S T R A C T

Enzyme linked fluorescent assays (VIDAS EBV VCA IgM, VIDAS EBV VCA/EA IgG and VIDAS EBV EBNA IgG (Biomérieux, France) were evaluated to determine markers for infection of Epstein Barr virus, as well as to establish antibody profiles, compared with immunofluorescence assays as reference. The assays evaluated showed good values for sensitivity, specificity and agreement, making them useful for their application in clinical laboratories.

© 2011 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

#### Keywords:

Epstein Barr virus

Enzyme linked fluorescent assay

Immunofluorescence

### Introducción

La mononucleosis infecciosa (MI) es un síndrome producido fundamentalmente por el virus Epstein Barr (VEB), aunque otros agentes también pueden causarlo, y entre estos el más importante es el citomegalovirus (CMV)<sup>1</sup>. Clásicamente el diagnóstico serológico de la MI se realiza mediante la detección de anticuerpos heterófilos. Sin embargo, la sensibilidad de este marcador es baja, especialmente en niños pequeños, grupo en el que son más frecuentes las infecciones por VEB. La determinación de IgM, marcador de elección en la mayoría de las infecciones virales, se complica en las infecciones por VEB debido a la reacción cruzada con CMV<sup>2</sup>, así como por la estimulación policlonal de linfocitos de memoria, que sucede frecuentemente en los casos de MI, y que puede dar lugar

a una amplia reactividad IgM<sup>3</sup>. Por estas razones, es muy útil establecer perfiles de anticuerpos, combinando el estudio de IgG e IgM frente al antígeno de la cápside del virus (VCA) y anticuerpos frente al antígeno nuclear (EBNA), mediante técnicas de inmunofluorescencia. Estas técnicas son laboriosas, de difícil automatización, y su interpretación es subjetiva. En los últimos años se han desarrollado métodos automatizados para la determinación de marcadores serológicos de infección por el VEB, de ELISA, y de inmunoquimoluminiscencia (IQL), que han sido recientemente comparados<sup>4,5</sup>. El objetivo de este estudio fue la evaluación del sistema VIDAS, basado en ensayo fluorescente ligado a enzima, para la determinación de anticuerpos frente a diferentes antígenos del VEB.

### Material y método

#### Muestras

Se han estudiado 50 muestras de suero pertenecientes a otros tantos casos de MI. Estas muestras procedían de una colección

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: fory@isciii.es (F. De Ory).

previamente utilizada en la evaluación de métodos serológicos para el diagnóstico de infección por el VEB<sup>5</sup>. Empleando como criterios de referencia ensayos serológicos de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para IgG e IgM anti-VCA e inmunofluorescencia anti-complemento (IFAC) para anticuerpos frente a EBNA, como se describe más adelante, 43 casos fueron clasificados en relación con el EBV como infección reciente (25 casos), como infección pasada (10 casos) o como negativos (ausencia de infección previa) (8 casos). Los casos de infección reciente mostraron presencia de IgM e IgG anti-VCA en ausencia de anticuerpos anti-EBNA (18 casos), o presencia de los 3 marcadores simultáneamente (5 casos) en ausencia de IgM anti-CMV, o presencia exclusiva de IgG anti-VCA (2 casos). Los casos de infección pasada mostraron resultado positivo de IgG anti-VCA y de anticuerpos anti-EBNA, y se definieron los casos como negativos, indicando por tanto ausencia de infección previa, cuando los 3 marcadores fueron negativos. Estos casos fueron utilizados para la evaluación de los ensayos para determinación de IgM anti-VCA, de IgG anti-VCA/EA y de IgG anti-EBNA, así como para establecer los diferentes perfiles en el sistema VIDAS.

Los 7 casos restantes procedían de infecciones primarias por CMV, documentados por detección de IgM específica y por presencia de IgG de baja avididad, y fueron empleados para valorar aspectos de especificidad en los ensayos para determinación de IgM, como marcador de infección reciente por VEB.

### Métodos serológicos

Las determinaciones de IgM e IgG frente a VCA se realizaron por IFI, empleando reactivos comerciales (Merifluor EBV VCA IgM IFA y Merifluor EBV VCA IgG IFA, Meridian Bioscience Inc., EE. UU.). La IgM se ensayó después de eliminar la IgG de la muestra, mediante un antisuero anti-IgG humana (RF Absorbens, Siemens, Alemania). El estudio de anticuerpos anti-EBNA se llevó a cabo mediante IFAC (Merifluor EBV NA test, Meridian Bioscience Inc.).

La IgM frente a CMV se determinó por ELISA indirecto (Enzygnost anti-CMV IgM, Siemens) y ELISA de captura (CMV-IgM-ELA Test PKS, Medac, Alemania), y la caracterización de la avididad de IgG específica se ha realizado por ELISA (Citomegalovirus IgG Avidity EIA Well, Radim, Italia).

Se han evaluado los métodos VIDAS EBV VCA IgM, VIDAS EBV VCA/EA IgG y VIDAS EBV EBNA IgG (Biomérieux, Francia). El ensayo de IgM utiliza el antígeno p18 del antígeno VCA; el ensayo de IgG emplea el antígeno p18 de VCA y el antígeno p54 del antígeno temprano (EA), y el de EBNA emplea el antígeno p72. Las determinaciones se han llevado a cabo en la plataforma Mini VIDAS (Biomérieux). Para los cálculos de coincidencia porcentual de resultados, sensibilidad, especificidad y coeficiente de probabilidad positivo y negativo los resultados indeterminados han sido considerados en las condiciones más adversas: si el resultado en el ensayo de referencia era positivo se consideraron negativos, y viceversa.

### Resultados y discusión

Los resultados obtenidos por los ensayos en evaluación se han comparado con los de la técnica de referencia (IFI para IgM e IgG, e IFAC para anticuerpos anti-EBNA). Los valores de coincidencia porcentual de resultados, sensibilidad y especificidad de las determinaciones de IgM anti-VCA, IgG anti-VCA/EA e IgG anti-EBNA fueron del 82, del 78,6 y del 86,4%; del 93, del 91,4 y del 100%; y del 86, del 85,7 y del 86,7%, respectivamente (tabla 1).

En lo que se refiere a los perfiles de anticuerpos, la combinación de los 3 métodos evaluados ha permitido identificar como infecciones primarias 22 de las 25 analizadas, excluyéndose la infección primaria en 16/18 estudiadas (tabla 2). Dos casos de infección

**Tabla 1**

Comparación de los ensayos VIDAS para la determinación de IgM anti-VCA, IgG anti-VCA/EA e IgG anti-EBNA con ensayos de referencia

IgM VCA	Inmunofluorescencia indirecta	
	Positivo, n = 28	Negativo, n = 22
<b>VIDAS</b>		
Positivo	22	2
Indeterminado	2	1
Negativo	4	19
Coincidencia de resultados: 82% (IC 95%, 68,1-91,0)		
Sensibilidad: 78,6% (IC 95%, 58,5-91,0)		
Especificidad: 86,4% (IC 95%, 64,0-96,4)		
Coeficiente de probabilidad positivo: 5,76 (IC 95%, 1,98-16,79)		
Coeficiente de probabilidad negativo: 0,25 (IC 95%, 0,12-0,51)		
IgG VCA/EA	Inmunofluorescencia indirecta	
	Positivo, n = 35	Negativo, n = 8
<b>VIDAS</b>		
Positivo	32	0
Indeterminado	2	0
Negativo	1	8
Coincidencia de resultados: 93% (IC 95%, 79,9-98,2)		
Sensibilidad: 91,4% (IC 95%, 75,8-97,8)		
Especificidad: 100% (IC 95%, 59,8-100)		
Coeficiente de probabilidad positivo: No aplicable		
Coeficiente de probabilidad negativo: 0,09 (IC 95%, 0,03-0,25)		
IgG EBNA	Inmunofluorescencia anti-complemento	
	Positivo, n = 15	Negativo, n = 28
<b>VIDAS</b>		
Positivo	13	2
Indeterminado	1	2
Negativo	1	24
Coincidencia de resultados: 86% (IC 95%, 71,4-94,2)		
Sensibilidad: 86,7% (IC 95%, 58,4-97,7)		
Especificidad: 85,7% (IC 95%, 66,4-95,3)		
Coeficiente de probabilidad positivo: 6,07 (IC 95%, 2,40-15,36)		
Coeficiente de probabilidad negativo: 0,16 (IC 95%, 0,04-0,57)		

IC 95%: intervalo de confianza del 95%.

pasada, de acuerdo con los criterios de referencia, mostraron en el sistema VIDAS perfil indicativo de infección primaria. Así la sensibilidad y la especificidad del sistema para el establecimiento de perfiles de anticuerpos han sido del 88 y del 88,9%, respectivamente.

Recientemente se ha documentado que el sistema VIDAS es una alternativa adecuada a los ensayos de inmunofluorescencia para el diagnóstico de infecciones por el VEB<sup>6</sup>. En el presente estudio la sensibilidad del ensayo para IgM ha sido mayor que la obtenida en ensayos de ELISA y de IQL que emplean igualmente el antígeno p18, aunque la especificidad ha sido menor<sup>5</sup>. En lo que se refiere al ensayo de IgG VCA/EA, el método evaluado mejora la sensibilidad de ensayos que emplean el antígeno p18 (inmunofiltración, IQL y ELISA), manteniendo una buena especificidad<sup>5</sup>. Este aumento en la sensibilidad puede ser debido a que el ensayo VIDAS incorpora un recombinante del EA. En tercer lugar, el ensayo para anti-EBNA muestra similares características de funcionamiento cuando se compara a otros ensayos automatizados<sup>5</sup>. Una posible causa que justifique las discrepancias en los ensayos para detectar respuestas frente a EBNA pueden ser que IFAC detecta anticuerpos frente a los distintos tipos de antígeno EBNA, en tanto que el VIDAS solo frente a EBNA-1. Es conocido que la positividad frente a EBNA-2 es más temprana que frente a EBNA-1, aunque se ha documentado que la respuesta anti-EBNA-2 solo es detectable a partir de los 2 meses<sup>7</sup>. Por último, en lo que respecta a los perfiles de anticuerpos que definen presencia de infección primaria, infección pasada o ausencia de infección, los valores de sensibilidad y especificidad de los métodos evaluados han sido similares a los obtenidos

**Tabla 2**  
Evaluación de perfiles de anticuerpos obtenidos por el sistema VIDAS

	Referencia		
	Primaria	Pasada	Negativa
<b>VIDAS</b>			
Primaria	22	2	0
Pasada	2	8	0
Negativa	1	0	8
Sensibilidad: 88% (IC 95%, 67,7-96,8)			
Especificidad: 88,9% (IC 95%, 63,9-98,1)			
Coeficiente de probabilidad positivo: 7,92 (IC 95%, 2,13-29,49)			
Coeficiente de probabilidad negativo: 0,14 (IC 95%, 0,05-0,40)			

IC 95%: intervalo de confianza del 95%.

previamente en otros ensayos, tanto automatizados como manuales<sup>5</sup>. Independientemente del tipo de ensayo empleado, con cierta frecuencia se obtienen perfiles «indeterminados», basados bien en la presencia única de IgM específica (situación inusual en la práctica clínica, en el caso de las infecciones por VEB), bien en la presencia única de IgG (por fallo en la producción de IgM o en su detección), o bien por presencia de los 3 marcadores<sup>8</sup>, debido a la presencia de anticuerpos anti-EBNA-2, de emergencia más temprana<sup>7</sup>, que son detectables por IFAC pero no por las técnicas que emplean antígeno EBNA-1. En los 2 últimos supuestos resulta de gran utilidad la identificación de la IgG de baja avided<sup>8</sup>, que permite la confirmación de los casos como infección primaria.

De acuerdo con esto, se procesaron con un ensayo previamente descrito para la caracterización de la avided de IgG anti-VCA<sup>9</sup> las 2 muestras de infección pasada de acuerdo con el criterio de referencia que mostraban perfil de infección reciente en VIDAS (tabla 2); ambas mostraron IgG de alta avided, confirmándose de esta manera la infección pasada.

Aunque el reducido número de muestras estudiadas constituye una limitación de este estudio, los ensayos evaluados parecen ser aceptables para la determinación de marcadores serológicos de infección por EBV, así como para el establecimiento de perfiles serológicos del virus, haciéndose evidente la necesidad de mantener ensayos de referencia que permitan la correcta identificación de perfiles atípicos.

### Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

### Bibliografía

- Hurt C, Tammaro D. Diagnostic evaluation of mononucleosis like illnesses. *Am J Med.* 2007;120:e1–8.
- Balachandran N, Oba DE, Hutt-Fletcher LM. Antigenic cross-reactions among herpes simplex virus types 1 and 2, Epstein-Barr virus, and cytomegalovirus. *J Virol.* 1987;61:1125–35.
- Haukenes G, Viggen B, Boye B, Kalvenes MB, Flo R, Kalland KH. Viral antibodies in infectious mononucleosis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1994;8:219–24.
- Berth M, Bosmans E. Comparison of three automated immunoassay methods for the measurement of Epstein Barr virus specific immunoglobulin M. *Clin. Vaccine Immunol.* 2010;17:559–63.
- De Ory F, Guisasola ME, Sanz JC, García-Bermejo I. Evaluation of four commercial systems for the diagnosis of Epstein Barr Virus primary infections. *Clin Vaccine Immunol.* 2011;18:444–8.
- Koidl C, Riedl R, Schweighofer B, Fett S, Bozic M, Marth E. Performance of new enzyme-linked fluorescent assays for detection of Epstein-Barr virus specific antibodies in routine diagnostics. *Wien Klin Wochenschr.* 2011;123:230–4.
- Henle W, Henle G, Andersson J, Ernberg I, Klein G, Horwitz CA, et al. Antibody responses to Epstein-Barr virus-determined nuclear antigen (EBNA)-1 and EBNA-2 in acute and chronic Epstein-Barr virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84:570–4.
- Hess RD. Routine Epstein Barr virus diagnostics from the laboratory perspective: still challenging after 35 years. *J Clin Microbiol.* 2004;42:3381–7.
- de Ory F, Antonaya J, Fernández MV, Echevarría JM. Application of low avidity immunoglobulin G studies to diagnosis of Epstein-Barr virus infectious mononucleosis. *J Clin Microbiol.* 1993;31:1669–71.