

# HACIA LA ARMONIZACIÓN DE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR: CARGA DE VIRUS EPSTEIN-BARR EN ARGENTINA I - PRIMER ESTUDIO MULTICÉNTRICO

Fellner MD<sup>1</sup>; Durand KA<sup>1</sup>; Rodriguez M<sup>2</sup>; Irazu L<sup>2</sup>; Picconi MA<sup>1</sup> y Red Nacional de Laboratorios de EBV.

<sup>1</sup>Servicio Virus Oncogénicos, Laboratorio Nacional de Referencia de EBV, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas - ANLIS "Carlos G. Malbrán", Argentina

<sup>2</sup>Equipo Operativo Gestión de Calidad, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas - ANLIS "Carlos G. Malbrán", Argentina

[grupoebv.dx@gmail.com](mailto:grupoebv.dx@gmail.com) [mdfellner@anlis.gov.ar](mailto:mdfellner@anlis.gov.ar) [fellnermd@gmail.com](mailto:fellnermd@gmail.com)

**Red Nacional de Laboratorios de EBV:** D. Viale, D. Borgnia (Hospital de Pediatría "Prof. Dr. J. P. Garrahan"); B. Livellara (Htal. Italiano de Buenos Aires); E. Sturba (Laboratorios Stambouljan); M. Zubieta, S. Loudet (Hospital El Cruce); G. Cabral (Hospital Posadas); A. Suarez, M. Gabbarini (IACA Laboratorios); M.A. Baridón, F. Perez (Hospital Rossi, La Plata); M. Sciarra, E. Zubillaga, F. Fay (Laboratorio CIBIC); A.G. Sanchez, T. Alvarellos (Hospital Privado Centro Medico de Cordoba); L. Montoto (Hospital de Pediatría Elizalde); Lilia Mammana, Luciana Tadeo (Hospital Muñiz); M.G. Barbás, G. Castro; A. Cudola (Laboratorio Central de Córdoba); C. Theaux (Hospital Durand); S. Ferrini (Laboratorio Central de Corrientes); S. Lejona (CEMAR).

## INTRODUCCIÓN

Los métodos de cuantificación de virus Epstein-Barr (EBV) son utilizados para el seguimiento y evolución de sus enfermedades asociadas, como los Desórdenes Linfoproliferativos Post-Transplante. Inicialmente se aplicaron metodologías artesanales, luego se fueron incorporando ensayos comerciales, y todavía no hay una estrategia *gold standard*. Dada esta situación se ha sugerido la realización de estudios multicéntricos dirigidos a alcanzar una estandarización metodológica que permita identificar niveles virales indicativos de una conducta médica. Nuestro objetivo fue organizar un estudio multicéntrico para comparar los métodos de carga viral (CV) en uso en Argentina y establecer un marco para iniciar la armonización metodológica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materiales

- Se realizó una convocatoria abierta que fue aceptada por 16 laboratorios del país que disponían de métodos de carga viral aplicados con fines clínicos.
- Paneles: a) Control EBV positivo obtenido de la LC B95-8 (control LNR)  
b) Tres muestras de plasma ( $n=13$  laboratorios) y / o de sangre entera ( $n=6$  laboratorios), siendo una EBV negativa y dos contenían una cantidad de ADN viral con una diferencia de 2 logs.

### Métodos

- La carga de EBV se determinó mediante ensayos de PCR en tiempo real, aplicando: a) procedimiento habitual  
b) control EBV positivo como calibrador.
- Carga viral consenso: media del logaritmo de las cargas virales informadas por todos los laboratorios, luego de eliminar los valores atípicos o outliers (test de Grubbs).
- Variabilidad clínica significativa: media consenso  $\pm 0,5$  log.

## RESULTADOS

### DETERMINACIÓN DE CARGA DE EBV

MÉTODO EXTRACCIÓN	Volumen extracción (µl)	Volumen de elución (µl)				
		PLASMA		SANGRE ENTERA		
		50	100	50	100	200
Blood-mini-QIAGEN	200	---	1	---	---	1
Hi-Pure-Roche	200	4	1	1	---	---
Ma-Pure-Roche	200	1	---	---	1	---
	400	2	---	---	---	---
Ma-Pure-Large-Roche	500	2	---	---	---	---
Mini-QIAGEN	200	---	2	---	1	---
Mini-QIAGEN+ QIAcube	200	---	---	---	1	---
Zymo	100	---	---	---	1	---

MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE EBV	Fragmento Amplificado <sup>2</sup>	MUESTRA CLÍNICA		Total
		Plasma	SE <sup>1</sup>	
LightCycler® EBV Quantification Kit (Roche)	LMP2	6	1	7
LightMix® kit for the detection of EBV (TIB-MOLBIOL-Roche)	EBNA1	1	1	2
EBV Q-PCR Alert kit (Eitestech Nanogen)	EBNA1	3	3	6
Artesanal	BNRF1	1	0	1
Artesanal	EBNA1	1	0	1
Artesanal	EBNA1	1	1	2
<b>Total</b>		<b>13</b>	<b>6</b>	<b>19</b>

Tabla 1 (arriba) y Tabla 2 (abajo). Se utilizaron una amplia variedad de procedimientos de extracción de ADN y cuantificación de EBV.

<sup>1</sup>Sangre entera

### CURVAS DE CALIBRACIÓN DE LOS ENSAYOS DE CARGA VIRAL

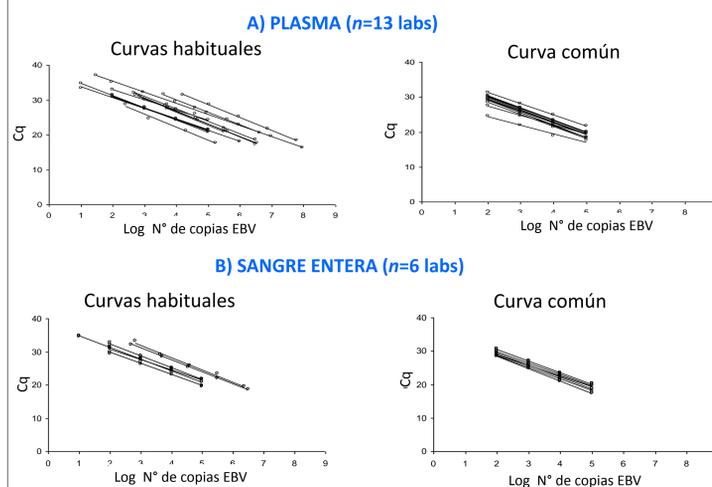


Figura 1. Curvas de calibración. Se observa una relación lineal entre el logaritmo de la concentración de EBV y los ciclos umbral (Cq), así como una amplia variabilidad en las pendientes, ordenadas al origen.

### VARIABILIDAD INTRA-LABORATORIO

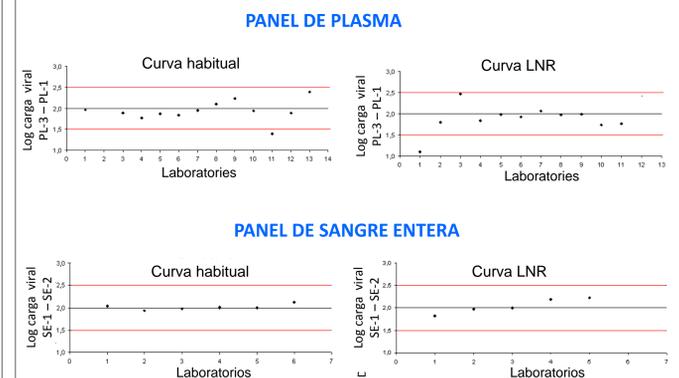


Figure 4. Variabilidad intra-laboratorio. Se estimó la diferencia entre las cargas virales de las muestras EBV positivas de cada panel (PL-1 y PL-3; SE-1 y SE-2) obtenidas por cada laboratorio, respecto del valor esperado (2 logs). Se observa que todos los laboratorios mostraron una variabilidad intra-laboratorio comprendida dentro del rango deseable, tanto los que analizaron paneles de plasma como de sangre entera. El valor esperado se indica en negro —; la variabilidad clínica significativa deseable en rojo —. PL: muestras de plasma. SE: muestras de sangre entera.

### CARGA DE EBV Y VARIABILIDAD INTER-LABORATORIO

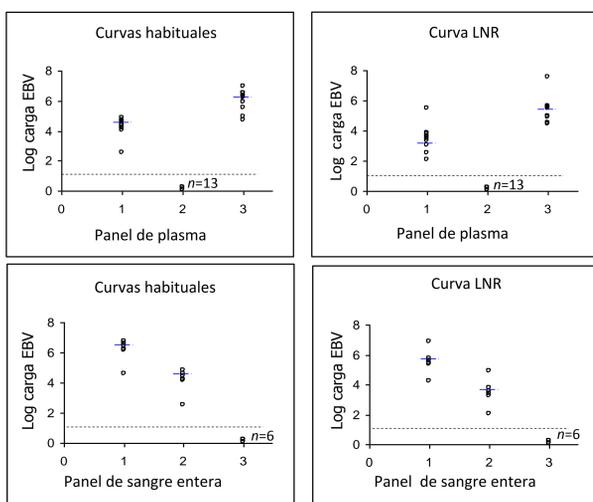


Figura 2. Carga viral inter-laboratorio. Se describe la dispersión de los valores de carga viral informados para cada una de las muestras de ambos paneles. Se observa que la variabilidad inter-laboratorio resultó mayor de  $\pm 0,5$  logs, al ser cuantificadas aplicando las curvas habituales o LNR. Respecto de la detección cualitativa, todos los participantes hallaron positivas a las muestras que contenían EBV (PL-1 y PL-3; SE-1 y SE-2), mientras que informaron negativas a las que no contenían ADN viral (PL-2 y SE-3). Umbral de detección: ---; Carga viral consenso: - - - - -

### CARGA DE EBV Y MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN

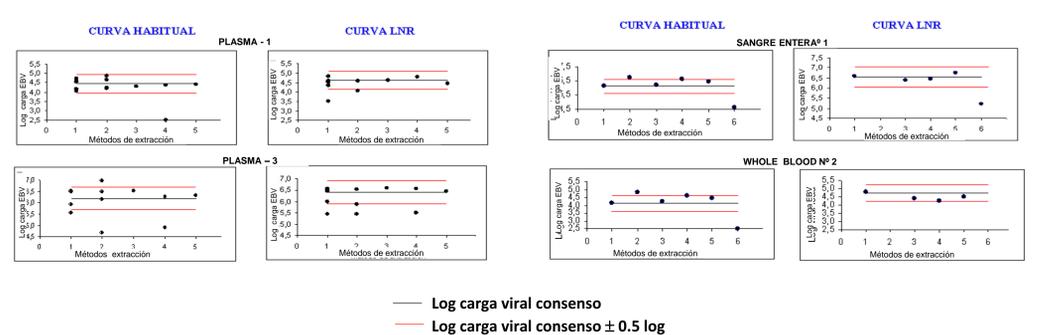


Figure 3. Variabilidad inter-laboratorio en la carga de EBV según métodos de extracción de ADN. Se muestra la dispersión de las cargas virales determinadas por los participantes con las curvas habituales y LNR para las muestras positivas de ambos paneles, en relación a los métodos de extracción de ADN utilizados. La variabilidad inter-laboratorio observada no puede asociarse con un método de extracción en particular. Métodos de extracción: 1: Blood mini QIAGEN, 2: Hi Pure Roche, 3: MagNA (Roche), 4: MagNA Large (Roche), 5: DNA Mini (QiaGen), 6: Zymo Research.

## CONCLUSIONES

- Las variaciones de la carga de EBV intra-laboratorio se ajustaron a los fines de aplicación clínica ( $<0,5$  logs), a diferencia de las inter-laboratorio ( $>0,5$  logs). Por lo tanto, el seguimiento intra-laboratorio es adecuado, mientras que las CV inter-lab no son comparables.
- La introducción de un calibrador único no logró reducir la variabilidad cuantitativa a niveles clínicamente no significativos ( $<0,5$  logs). Será necesario continuar con la armonización metodológica con el fin de establecer un consenso en el diagnóstico molecular de EBV.
- **PERSPECTIVAS:** Calibrar en unidades internacionales las metodologías para cuantificar EBV que se utilizan en los laboratorios clínicos de Argentina.