



Sífilis

ELISA recombinante v.4.0

Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la detección de anticuerpos anti-*Treponema pallidum*

SIGNIFICACION CLINICA

La sífilis es una enfermedad venérea causada por una bacteria denominada *Treponema pallidum*, que invade las mucosas intactas o la piel en áreas de abrasiones. El contacto sexual es la forma más común de transmisión. Sin embargo, puede transmitirse a través de la barrera placentaria de la madre al feto, o mediante transfusión sanguínea.

La detección o tratamiento de la enfermedad en sus estadios tempranos es fundamental a fin de evitar complicaciones graves como sífilis cardiovascular, neurosífilis o sífilis congénita.

El diagnóstico de esta enfermedad se ve obstaculizado por la carencia de un método para cultivar el microorganismo en medios de laboratorio y la dificultad para detectarlo en estadios de la enfermedad en los que no se observan lesiones directas. El mismo puede realizarse:

- a través de métodos de detección de anticuerpos no-específicos (que utilizan antígenos no-treponémicos) cuya interpretación es visual;
- por métodos inmunoenzimáticos (ELISA) que detectan la presencia de anticuerpos específicos contra el *Treponema pallidum* en muestras de pacientes que se encuentran en diferentes estadios de la enfermedad.

FUNDAMENTOS DEL METODO

Los pocillos de la policubeta están recubiertos con antígenos recombinantes de la bacteria *Treponema pallidum* (p15, p17 y p47). La muestra diluida se incuba en los pocillos. Si los anticuerpos contra la bacteria están presentes en la muestra, éstos se unen a los antígenos del pocillo. El material no unido es removido por lavado. En el paso siguiente se agrega el conjugado, que consiste en un anticuerpo monoclonal anti-IgG humana conjugado con peroxidasa. Este se une a los complejos antígeno-anticuerpo, formados previamente. El conjugado no unido se remueve por lavado. Posteriormente, se agrega una solución conteniendo tetrametilbencidina y peróxido de hidrógeno. Las muestras reactivas desarrollan color celeste que vira al amarillo cuando se detiene la reacción con ácido sulfúrico.

REACTIVOS PROVISTOS

Policubeta sensibilizada: policubeta de tiras recortables, con 96 pocillos recubiertos con antígenos recombinantes de *Treponema pallidum*.

Diluyente de Muestra: buffer salino con tensioactivo. Color violeta.

Conjugado Concentrado: anticuerpo monoclonal anti-IgG humana conjugado con peroxidasa (10x). Color rojo.

Diluyente de Conjugado: buffer salino con proteínas.

Revelador: solución de tetrametilbencidina y peróxido de hidrógeno.

Stopper: ácido sulfúrico 2 N.

Buffer de Lavado Concentrado: buffer salino con tensioactivo (25x). Color verde.

Control Positivo: suero humano inactivado conteniendo anticuerpos anti-*Treponema pallidum*. Color naranja.

Control Negativo: suero humano no reactivo inactivado. Color amarillo.

REACTIVOS NO PROVISTOS

Agua destilada o desionizada

MATERIAL REQUERIDO (no provisto)

- Micropipetas para medir los volúmenes indicados
- Tips descartables
- Material volumétrico para preparar las diluciones indicadas
- Estufa a 37°C
- Papel absorbente
- Guantes descartables
- Reloj alarma o cronómetro
- Hipoclorito de sodio
- Sistema de lavado de policubetas (manual o automático)
- Espectrofotómetro para lectura de policubetas

PRECAUCIONES

- Los reactivos son para uso diagnóstico "in vitro".
- Todas las muestras de pacientes deben manipularse como si fueran capaces de transmitir infección.
- Los sueros controles han sido examinados para antígeno de superficie de Hepatitis B (HBsAg) y anticuerpos contra el virus de inmunodeficiencia humana (HIV) y Hepatitis C (HCV), encontrándose no reactivos. Sin embargo, se recomienda manipularlos con las precauciones requeridas para muestras potencialmente infecciosas.
- Al descartar los materiales empleados en el ensayo se deben tratar de manera de asegurar la inactivación de agentes patógenos. El método recomendado para este procedimiento es autoclavar durante 1 hora a 121°C. Los líquidos de descarte pueden ser desinfectados con hipoclorito de sodio (concentración final 5%) durante por lo menos 60 minutos.
- No intercambiar reactivos de distintos lotes.
- No emplear reactivos de otro origen.
- Evitar tocar las paredes de los pocillos con los tips.
- No utilizar elementos metálicos que puedan entrar en contacto con los reactivos.

- Las policubetas deben incubarse en estufa. Debe evitarse abrir la estufa durante este proceso. No usar baño de agua.
- Evitar que los vapores de hipoclorito provenientes de los recipientes para desechos biológicos u otras fuentes entren en contacto con los reactivos, ya que el hipoclorito afecta la reacción.
- Evitar contacto del ácido sulfúrico (Stopper) con piel y mucosas. R36/38: irrita los ojos y la piel. R34: provoca quemaduras. S24/25: evítase el contacto con los ojos y la piel. S26: en caso de contacto con los ojos, lávese inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico. S28: en caso de contacto con la piel, lávese inmediata y abundantemente con agua. S37/39: usar guantes adecuados y protección para los ojos/la cara.
- Evitar el derrame de líquidos y formación de aerosoles.
- No pipetear con la boca. Usar guantes descartables y protección en los ojos durante la manipulación de las muestras y reactivos del ensayo.
- Todos los reactivos y las muestras deben descartarse de acuerdo a la normativa vigente.

PREPARACION DE LOS REACTIVOS

Es importante que todo el material utilizado para la preparación de los reactivos esté limpio y libre de detergente e hipoclorito.

Buffer de Lavado: a baja temperatura los componentes del reactivo concentrado pueden precipitar. En tal caso, llevar la solución a 37°C hasta disolución completa. Para la obtención del buffer de lavado listo para usar, diluir una parte de Buffer de Lavado Concentrado (25x) con 24 partes de agua destilada o desionizada. Ej.: 20 ml con 480 ml para una policubeta completa.

Conjugado: diluir una parte de Conjugado Concentrado (10x) con 9 partes de Diluyente de Conjugado (ej.: ver tabla siguiente con volumen requerido de Conjugado Concentrado y Diluyente de Conjugado):

Nº de pocillos	Conjugado Concentrado	Diluyente de Conjugado
8	100 ul	0,9 ml
16	200 ul	1,8 ml
24	300 ul	2,7 ml
32	400 ul	3,6 ml
96	1200 ul	10,8 ml

Diluyente de Muestra, Diluyente de Conjugado, Revelador, Stopper, Control Positivo y Control Negativo: listos para usar.

ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

Los Reactivos Provisos son estables en refrigerador (2-10°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja. No congelar.

Buffer de Lavado Concentrado y Stopper: se pueden conservar a una temperatura entre 2 y 25°C.

Buffer de lavado (1x): una vez diluido es estable 3 meses a temperatura ≤ 25°C.

Conjugado: una vez diluido es estable 6 horas a temperatura ≤ 25°C.

Policubeta sensibilizada: no abrir el envoltorio hasta el momento de usar, ni antes que haya tomado temperatura ambiente, de lo contrario se favorecerá la condensación de humedad sobre la superficie de los pocillos. Las tiras no utilizadas deben conservarse entre 2-10°C dentro del sobre con desecante bien cerrado con cinta autoadhesiva. Las tiras conservadas en estas condiciones pueden ser utilizadas dentro de los 4 meses posteriores mientras no supere la fecha de vencimiento indicada en la caja.

MUESTRA

Suero o plasma

a) Recolección de muestra: obtener de la manera habitual.

b) Aditivos: no se requieren para suero. Para las muestras de plasma se puede emplear heparina, citrato o EDTA como anticoagulante.

c) Sustancias Interferentes conocidas: no se ha observado interferencia con muestras que contienen hasta 30 mg/dl de bilirrubina, 50 mg/dl de ácido ascórbico, 1500 mg/dl de triglicéridos o 300 mg/dl de hemoglobina. Muestras conteniendo partículas deberán clarificarse mediante centrifugación.

d) Estabilidad e instrucciones de almacenamiento: la muestra se debe conservar refrigerada (2-10°C). En caso de no realizar el análisis dentro de las 72 hs se debe congelar a -20°C. No es recomendable realizar múltiples ciclos de congelamiento y descongelamiento. Esto puede generar resultados erróneos. En caso de utilizar muestras congeladas, éstas deben ser homogeneizadas y centrifugadas antes de su uso.

La inactivación por calor puede afectar el resultado.

No utilizar muestras con contaminación microbiana.

Si las muestras deben ser transportadas, embalarlas de acuerdo a las especificaciones legales relativas al envío de material infeccioso.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1- Llevar a temperatura ambiente los reactivos y las muestras antes de iniciar la prueba.

2- Preparar el volumen necesario de buffer de lavado diluido.

3- Colocar en el soporte de tiras, el número de pocillos requeridos para la cantidad de determinaciones a realizar, incluyendo 2 pocillos para el Control Positivo (CP) y 3 para el Control Negativo (CN).

4- Dispensar el Diluyente de Muestra, luego la muestra (M) y los controles según el siguiente esquema:

	M	CP	CN
Diluyente de Muestra	100 ul	100 ul	100 ul
Control Positivo	-	20 ul	-
Control Negativo	-	-	20 ul
Muestra	20 ul	-	-

Homogeneizar por carga y descarga de la micropipeta. Al adicionar la muestra, el Diluyente de Muestra virará de color, de acuerdo a la tabla siguiente:

Tipo de muestra	Sin muestra	Suero o plasma	Control Positivo	Control Negativo
Color	Violeta	Celeste	Naranja oscuro	Verde

Advertencia: las muestras hemolizadas o turbias pueden alterar el color final sin afectar los resultados. El viraje de color puede depender del volumen de muestra adicionado y de su composición. Un viraje de color de menor intensidad puede deberse a que se dispensó un volumen inferior de muestra, a que la muestra no se encuentra en las condiciones adecuadas, o a que tiene un bajo nivel de proteínas.

5- Para evitar la evaporación, cubrir la placa con la cinta autoadhesiva provista, e incubar 60 ± 2 minutos a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$. En forma paralela, preparar el conjugado diluido (ver Tabla en PREPARACION DE LOS REACTIVOS).

6- Después de la incubación eliminar el líquido de cada pocillo por completo. Lavar 5 veces según instrucción de lavado (ver Procedimiento de Lavado).

7- Agregar el Conjugado:

Conjugado diluido	100 ul	100 ul	100 ul
--------------------------	--------	--------	--------

Para evitar la evaporación cubrir la policubeta con cinta autoadhesiva.

8- Incubar 30 ± 2 minutos a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

9- Lavar 5 veces según instrucción de lavado.

10- Dispensar el Revelador. Para ello, trasvasar a un recipiente limpio solamente el volumen de Revelador que se requiera. No devolver el Revelador restante al frasco original. Evitar el contacto del reactivo con agentes oxidantes.

Revelador	100 ul	100 ul	100 ul
------------------	--------	--------	--------

11- Incubar 30 ± 2 minutos a temperatura ambiente ($18-25^\circ\text{C}$), protegido de la luz.

12- Agregar el Stopper:

Stopper	100 ul	100 ul	100 ul
----------------	--------	--------	--------

13- Leer absorbancia en espectrofotómetro en forma bicromática a $450/620-650$ nm o a 450 nm.

Nota: se recomienda realizar siempre la lectura en forma bicromática. En caso de que la lectura sea monocromática, realizar un blanco de reactivos que luego deberá ser restado de todos los valores de las muestras.

ESTABILIDAD DE LA MEZCLA DE REACCION FINAL

El color de la reacción es estable durante 10 minutos, por lo que los resultados deben leerse dentro de ese lapso.

PROCEDIMIENTO DE LAVADO

Eliminar el líquido de los pocillos por aspirado o volcado. Los pocillos se lavan con 300 ul de buffer de lavado diluido. Asegurar que la altura alcanzada al llenar los pocillos no cause desbordes. La solución de lavado debe estar en contacto con los pocillos entre 30 y 60 segundos. Garantizar que luego del último lavado no quede líquido residual. Realice un doble aspirado para eliminar el excedente de buffer. Si persiste luego de este procedimiento, invertir la placa sobre papel absorbente y golpearla varias veces, de lo contrario podrán obtenerse resultados erróneos.

Nota: el procedimiento de lavado es crítico para el resultado del ensayo. Si queda buffer de lavado en el pocillo o si los pocillos no están completamente llenos se obtendrán resultados erróneos. No dejar que los pocillos se sequen durante el procedimiento. Los lavadores automáticos deben ser enjuagados con agua destilada o desionizada al final del día para evitar obstrucciones debido a las sales presentes en el buffer de lavado.

RESUMEN DEL PROCEDIMIENTO

ETAPA	PROCEDIMIENTO	PRECAUCION/OBSERVACIONES
Dilución	Preparación de la solución de lavado (1x)	Disolución de los cristales de sales
Diluyente de Muestra	Agregar 100 ul de Diluyente de Muestra en cada pocillo	
Muestras	Agregar 20 ul de M, CP y CN	Se observa cambio de color al agregar la muestra y los controles
Incubación	Cubrir los pocillos e incubar durante 60 ± 2 minutos a $37 \pm 1^\circ\text{C}$	En estufa
Lavado	Lavar cada pocillo con 300 ul de buffer de lavado (5 veces)	Tiempo de contacto de la solución de lavado entre 30 y 60 segundos. Eliminar completamente el líquido residual de los pocillos
Dilución	Preparación del Conjugado (1x)	Durante la incubación con la muestra, diluir Conjugado Concentrado (10x)
Conjugado	Agregar 100 ul de Conjugado diluido (1x)	

Incubación	Cubrir los pocillos e incubar durante 30 ± 2 minutos a 37 ± 1°C	En estufa
Lavado	Idem al lavado anterior	
Revelado	Agregar 100 ul de Revelador	Trasvasar el volumen necesario de Revelador a usar. No pipetear del frasco original. Descartar remanente del reactivo. Evitar contacto con agentes oxidantes.
Incubación	Durante 30 ± 2 minutos entre 18-25°C	Mantener los pocillos protegidos de la luz
Detención	Agregar 100 ul de Stopper	
Lectura	Leer en espectrofotómetro	Leer dentro de los 10 minutos

CRITERIOS DE VALIDACION DEL ENSAYO

El ensayo se considera válido si se cumplen simultáneamente las siguientes condiciones:

1- El promedio de las densidades ópticas (D.O.) de los Controles Negativos deben ser menor o igual a 0,100.

Ejemplo:

Lectura 1 = 0,014; Lectura 2 = 0,018; Lectura 3 = 0,019

Promedio = $(0,014 + 0,018 + 0,019) / 3 = 0,017$

2- Eliminar cualquier Control Negativo con D.O. mayor a 0,100.

3- Si se ha eliminado algún Control Negativo, volver a calcular el promedio de los Controles Negativos. Un ensayo es válido si se aceptan al menos dos de los Controles Negativos.

4- El promedio de las D.O. de los Controles Positivos debe ser mayor o igual a 1,000.

Ejemplo:

Lectura 1 = 1,697; Lectura 2 = 1,774

Promedio = $(1,697 + 1,774) / 2 = 1,736$

5- La diferencia entre el promedio de las D.O. de los Controles Positivos y Controles Negativos debe ser mayor o igual a 0,900.

Si una de estas condiciones no se cumple, repetir el ensayo. Recordar que las lecturas obtenidas dependerán de la sensibilidad del aparato empleado.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

a) Con instrumental óptico:

La presencia o ausencia de anticuerpos anti-*Treponema pallidum* se determina relacionando la absorbancia de la muestra respecto al valor del Cut-off.

Cut-off = CN + 0,160

CN: promedio de las D.O. del Control Negativo

Ejemplo: $0,017 + 0,160 = 0,177$

Muestras No Reactivas: se consideran aquellas con absorbancias menores al Cut-off

Muestras Reactivas: se consideran aquellas con absorbancias mayores o iguales al Cut-off.

b) Interpretación visual:

Si se opta por este tipo de interpretación, debe considerarse No Reactiva toda muestra que no presente una coloración mayor que la de los Controles Negativos. Por el contrario, una muestra netamente amarilla se considera Reactiva.

Toda muestra inicialmente reactiva debe ser repetida por duplicado. Si una o ambas repeticiones dan positivas, la misma debe considerarse reactiva.

Una muestra inicialmente reactiva puede ser no reactiva en las dos repeticiones. Esto puede deberse a:

- Contaminación cruzada de un pocillo no reactivo por una muestra reactiva.
- Contaminación de la muestra durante la dispensación, imprecisión en el dispensado de muestra, Conjugado y/o Revelador en el pocillo.
- Reutilización de tips.
- Contaminación del pocillo con hipoclorito u otros agentes oxidantes.

En ciertos casos una muestra no reactiva puede presentar una reacción falsamente reactiva, tanto en el análisis inicial como en sus repeticiones. Algunas causas de este fenómeno pueden ser:

- Contaminación de la muestra durante la extracción, procesamiento o conservación.
- Presencia de sustancias interferentes, tales como auto-anticuerpos, fármacos, etc.
- Dispensación y/o aspirado ineficiente de la solución de lavado (sistema obstruido).

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Ver Sustancias Interferentes conocidas en Muestra.
- No se debe utilizar pool de muestras.
- No se deben utilizar otros fluidos corporales como la saliva, líquido cefalorraquídeo u orina.
- Un resultado negativo no excluye la posibilidad de exposición o infección por *Treponema pallidum*.
- Los resultados repetidamente reactivos deben corroborarse por un método confirmatorio, de acuerdo a la normativa legal vigente.
- No utilizar muestras inactivadas por calor ya que pueden ocasionar resultados falsos positivos.

CARACTERISTICAS ESPECIFICAS DE PERFORMANCE

a) Sensibilidad

Sensibilidad clínica en Paneles de Performance

En un estudio realizado sobre diferentes paneles comerciales internacionales, se obtuvieron los siguientes resultados:

- Syphilis mixed Titer Performance Panel (PSS 201), Boston Biomedica, Inc.: se detectaron 22 de 22 muestras positivas.

- Syphilis mixed Titer Performance Panel (PSS 202), Boston Biomedica, Inc.: se detectaron 18 de 18 muestras positivas.
- Syphilis Qualification Panel (QSS 701), Boston Biomedica, Inc.: se detectaron 5 de 5 muestras positivas.
- Panel WO2 del Center for Disease Control (CDC), se detectaron 20 de 20 muestras positivas.
- Panel de Performance para Sífilis, Q Panel, Brasil (PP0406): se detectaron 16 de 16 muestras positivas.
- Panel de Performance para Sífilis, Q Panel, Brasil (PP0407): se detectaron 16 de 16 muestras positivas.

b) Especificidad

En otro estudio de 3519 muestras de sueros y plasmas de tres centros de salud diferentes, se encontró una especificidad de 99,85%.

Sobre un panel de 461 plasmas provenientes de una población de alta prevalencia, la especificidad obtenida fue de 100%.

Se estudió la posible aparición de reactividades cruzadas ensayando muestras provenientes de 169 individuos con diferentes condiciones clínicas que pueden ser causantes de reacciones inespecíficas para el ensayo Sífilis ELISA recombinante v.4.0. Estas condiciones incluyen pacientes con enfermedades autoinmunes o enfermedades infecciosas diferentes a Sífilis (HIV, HTLV, Hepatitis C, Hepatitis B, Chagas, otras). Para esta población la especificidad fue de 99,4%.

c) Precisión

Se evaluó la precisión del test siguiendo el protocolo EP5-A recomendado por la NCCLS. Los ensayos fueron realizados con muestras de diferentes niveles de reactividad y con los controles. Se realizaron 2 ensayos diarios evaluando cada muestra por duplicado por el transcurso de 20 días.

	Media (D.O.)	Intra-ensayo		Total	
		D.S.	C.V.	D.S.	C.V.
Muestra 1	0,716	0,082	11,440%	0,137	19,129%
Muestra 2	0,829	0,057	6,876%	0,083	10,013%
Muestra 3	0,389	0,031	8,020%	0,044	11,311%
Muestra 4	1,403	0,104	7,430%	0,154	10,976%
Control (+)	1,585	0,084	5,290%	0,127	8,013%
Control (-)	0,014	0,003	19,710%	0,002	12,143%

n = 80

PRESENTACION

Equipo para 96 determinaciones (Cód. 1723452).

Equipo para 192 determinaciones (Cód. 1723552).

BIBLIOGRAFIA

- Brown, D.L. et al. - American Family Physician 68/2:283-290, 2003.
- Morse, S.A. - Current Opinions in Infectious Diseases 14:45-51, 2001.
- Quattordio, L.E. et al. - Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana 38/3:301-306, 2004.
- Singh, A.E. et al. - Clinical Microbiology Reviews 12/2:187-209, 1999.

- Young, H. - Sex Transm. Inf. 76:403-405, 2000.

- Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices. Approved Guideline EP5-A 19/2 (1999) National Committee for Clinical Laboratory Standards.

- Specifications for Immunological Testing for Infectious Diseases. Approved Guideline I/LA18-A2 (1994) National Committee for Clinical Laboratory Standards.

- Clinical Evaluation of Immunoassays. Approved Guideline I/LA21-A (2002) National Committee for Clinical Laboratory Standards.

- Interference testing in Clinical Chemistry. Approved Guideline EP7-A (2002) National Committee for Clinical Laboratory Standards.

EXPLICACION DE LOS SIMBOLOS

Policubeta Sensib.

Policubeta sensibilizada

Diluyente Muestra

Diluyente de Muestra

Conjugado Conc.

Conjugado Concentrado

Conjugado Diluy.

Diluyente de Conjugado

Revelador

Revelador

Buf. Lavado Conc.

Buffer de Lavado Concentrado

Control +

Control Positivo

Control -

Control Negativo

Stopper

Stopper

Los siguientes símbolos se utilizan en todos los kits de reactivos para diagnóstico de Wiener lab.



Este producto cumple con los requerimientos previstos por la Directiva Europea 98/79 CE de productos sanitarios para el diagnóstico "in vitro"

EC REP Representante autorizado en la Comunidad Europea

MD Uso diagnóstico "in vitro"

Contenido suficiente para <n> ensayos

Fecha de caducidad

Límite de temperatura (conservar a)

No congelar

Riesgo biológico

Volumen después de la reconstitución

Cont. Contenido

LOT Número de lote

Elaborado por:

Nocivo

Corrosivo / Caústico

Irritante

Consultar instrucciones de uso

Calibr. Calibrador

CONTROL Control

CONTROL+ Control Positivo

CONTROL- Control Negativo

REF Número de catálogo

Wiener Laboratorios S.A.I.C.
Riobamba 2944
2000 - Rosario - Argentina
<http://www.wiener-lab.com.ar>
Dir. Téc.: Viviana E. Cétola
Bioquímica
Producto Autorizado A.N.M.A.T.
Cert.: 6436/09



Wiener lab.

2000 Rosario - Argentina