

INTENCIÓN DE USO

El kit *Treponema pallidum* IgM ELISA se utiliza para la detección de anticuerpo IgM contra *Treponema pallidum* en suero o plasma humano.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Treponema pallidum es el agente causal de la Sífilis, una enfermedad sistémica, contagiosa e infecciosa que se caracteriza por períodos activos de manifestaciones floridas y por años de latencia asintomática. La sífilis se clasifica tradicionalmente como adquirida o congénita, cada estado se subdivide luego de acuerdo al curso natural de la enfermedad. En la sífilis adquirida, la infección se transmite por vía sexual. El período de incubación de la Sífilis puede variar de 1 a 13 semanas, siendo por lo general 3-4 semanas. Los pacientes con sífilis primaria o secundaria no tratados, que registran lesiones activas son los más infecciosos, y los riesgos de contagio son mayores durante los primeros 2 años de la infección. Prácticamente todos los órganos y tejidos del cuerpo se ven afectados, incluyendo la mayoría de los fluidos corporales. Más del 80% de los pacientes presentan lesiones mucocutáneas, el 50% registra inflamación de los ganglios linfáticos, y alrededor del 10% cuentan con lesiones en ojos, huesos, articulaciones, meninges, hígado y bazo. Suelen observarse síntomas leves de malestar general, cefalea, anorexia, náuseas, dolor en los huesos, y fatiga. La sífilis congénita es el resultado del paso del *T. pallidum* a través de la placenta. Las manifestaciones clínicas pueden estar presentes al nacer, pero más a menudo se ven entre las 3 semanas y los 6 meses de edad. Dos tipos de anticuerpos son producidos por *T. pallidum*: anticuerpos no treponémicos (reagina) y anticuerpos treponémicos. El método ELISA es el estándar para la detección de anticuerpos IgG e IgM en el diagnóstico de la Sífilis.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

El suero diluido del paciente (el diluyente de suero contiene absorbente para eliminar Factor Reumatoide y la interferencia de la IgG humana) es agregado a los micropozos recubiertos con antígeno purificado. El anticuerpo IgM específico, en caso de estar presente, se une al antígeno. Todos los materiales no unidos son lavados y el conjugado enzimático es agregado para unirse al complejo anticuerpo-antígeno, en caso de estar presente. El exceso de conjugado enzimático es lavado para luego agregar el sustrato. La microplaca es incubada a efectos de permitir la hidrólisis del sustrato por la enzima. La intensidad de color generada es proporcional a la cantidad de anticuerpo IgM específico en la muestra.

| MATERIALES PROVISTOS | 96 Pruebas |
|--|------------|
| 1. Micropozos recubiertos con IgG anti-humano | 12x8x1 |
| 2. Diluyente de la muestra: 2 Frasco (listo para usar) | 2x50 mL |
| 3. Calibrador: 2 Vial (listo para usar) | 2x1.6 mL |
| 4. Control Positivo: 1 Vial (listo para usar) | 1.6 mL |
| 5. Control Negativo: 1 Vial (listo para usar) | 1.6 mL |
| 6. Conjugado Enzimático: 1 Frasco (listo para usar) | 20 mL |
| 7. Sustrato TMB: 1 Frasco (listo para usar) | 20 mL |
| 8. Solución de Frenado: 1 Frasco (listo para usar) | 50 mL |
| 9. Concentrado de Lavado 10X: 2 Frasco | 50 mL |

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROVISTOS

1. Agua destilada o desionizada.
2. Pipetas de precisión.
3. Puntas de pipetas desechables.
4. Lector de micro ELISA con longitud de onda a 450 nm de longitud de onda.
5. Papel absorbente o toalla de papel.
6. Papel cuadrículado.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

1. Almacene el kit a 2 - 8°C.
2. Mantenga las tiras de los pocillos selladas en la bolsa de aluminio.
3. Los compuestos son estables hasta su fecha de expiración siempre que las condiciones de almacenaje sean estrictamente llevadas a cabo como aquí se indica.
4. No exponga los reactivos al calor, luz solar o intensa luz eléctrica.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Materiales con potencial riesgo biológico: Los calibradores contienen componentes de origen humano, que se han sido probados y encontrados no reactivos para el antígeno de superficie de hepatitis B y anticuerpos contra el VIH Aprobado por la FDA. Sin embargo no hay método de prueba que puede ofrecer completa seguridad de que el virus VIH, Hepatitis B u otros agentes infecciosos estén presentes. Estos reactivos deben ser manejados según el Nivel de Bioseguridad 2, como se recomienda en los Centros para el Control de Enfermedades / Institutos Nacionales de Salud manuales.
2. No pipetee con la boca. No fume, coma, o beba en el área donde maneje este equipo.
3. Los componentes en este equipo son para uso como una unidad integral. Los componentes de diferentes lotes no se deben mezclar.
4. Para obtener óptimos resultados, debe apegarse estrictamente al protocolo. Pipeteado exacto y preciso, así como después de la hora exacta y requerimientos de temperatura prescritos son esenciales. Cualquier desviación de este puede dar datos no válidos.

RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

1. Recolecte sangre por venopunción y separe el suero de inmediato.
2. En caso de no llevar a cabo el examen inmediatamente, refrigere la muestra a (2-8°C) por siete días. En caso de exceder dicho plazo, congele a -20°C hasta seis meses. Evite múltiples ciclos de congelación - descongelación.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO

Prepare 1X de solución de lavado agregando el contenido del frasco (100 mL, 10X) a 900 mL de agua destilada o desionizada. Conserve a temperatura ambiente (18-23°C).

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Previo al ensayo, todas las muestras y reactivos deben ser llevados a temperatura ambiente (20-25°C). Mezcle gentilmente todos los reactivos previos a su uso.

1. Corte el número de pozos a utilizar. Cierre y selle el resto de los pozos no utilizados y refrigérelos a 2-8°C.
2. Los controles (positivo y negativo) y el calibrador están listos para su uso. Prepare una dilución de las muestras de 1:5, agregando 20 µl de la muestra a 100 µL del diluyente. Mezclar bien.
3. Dispense 100 µL del suero diluido, calibrador y controles en los pozos designados. Para el reactivo blanco, dispense 100 µL de diluyente de la muestra en la posición 1A. Golpee el pozo para remover las burbujas de aire del líquido y mezcle bien. Incubar por 45 minutos a 37°C.
4. Retire el líquido de los pozos. Lave en tres tiempos con 300 µL de solución de lavado a 1x. Golpee los pozos sobre una toalla o papel absorbente.
5. Dispense 100 µL de conjugado enzimático en cada pozo e incube por 45 minutos a 37°C.
6. Retire el conjugado enzimático de los pozos. Lave en tres tiempos con 300 µL de solución de lavado a 1x. Golpee los pozos sobre una toalla o papel absorbente.
7. Dispense 100 µL de sustrato TMB e incube por 15 minutos a temperatura ambiente.
8. Agregue 100 µL de solución de frenado.
9. Lea la densidad óptica a 450 nm con un lector de placa de micro valoración en un plazo de 15 minutos después de haber agregado la solución de frenado.

CÁLCULO DE RESULTADOS

1. Chequear el Factor de Calibración (CF) valorado en el frasco del Calibrador. Este valor puede variar de lote a lote.
2. Calcule el valor del punto de corte. Calibrador (OD) por Factor de Calibración.
3. Calcule el anticuerpo (Ab) para cada determinación, dividiendo el valor (OD) de cada muestra entre el valor del punto de corte.

EJEMPLO DE LA MUESTRA TÍPICA

| | |
|----------------------------|-----|
| Media del Calibrador O.D. | 0.8 |
| Factor de Calibración (CF) | 0.5 |
| Valor Punto de Corte | 0.4 |
| Control Positivo O.D. | 1.2 |
| Anticuerpo Índice | 3.0 |
| Muestra del Paciente O.D. | 1.6 |
| Anticuerpo Índice | 4.0 |

CONTROL DE CALIDAD

Esta prueba puede considerarse válida siempre que se siga el siguiente criterio metodológico:

1. El OD. Del calibrador debe ser ≥ 0.2 a 450 nm.
2. La ración entre control negativo y el calibrador debe ser menor que 0.6.
3. El OD del control positivo debe ser menor que 1.5 que el calibrador.

INTERPRETACIÓN

Lo siguiente es una guía para la interpretación de resultados de *Treponema pallidum* IgM; cada laboratorio deberá establecer su criterio para interpretación basado en sus muestras.

INTERPRETACIÓN DE LOS ANTICUERPOS ÍNDICES

<0.8 Anticuerpo no detectado de *Treponema pallidum* IgM por ELISA
0.8-1.2 Sobre el límite positivo se recomienda otra identificación clínica.

>1.2 Anticuerpo detectado de *Treponema pallidum* IgM por ELISA

PERFORMANCE

1. Sensibilidad y Especificidad:

275 Pacientes fueron analizados utilizando el presente kit ELISA y un kit ELISA de referencia. Los resultados se resumen en la siguiente tabla:

| | <i>T. pallidum</i> IgM ELISA | | |
|-------------------------|------------------------------|-----|-------|
| | + | - | Total |
| Kit ELISA de Referencia | 37 | 0 | 37 |
| - | 3 | 235 | 238 |
| Total | 40 | 235 | 275 |

Sensibilidad de 92%

Especificidad de 100%

2. Precisión:

Estudio Intra Ensayo

| Suero | No. de Réplicas | Media | Desvío Estandar | Coficiente de Variación % |
|-------|-----------------|-------|-----------------|---------------------------|
| 1 | 16 | 1.34 | 0.094 | 7.01 |
| 2 | 16 | 1.17 | 0.082 | 7.00 |
| 3 | 16 | 0.23 | 0.021 | 9.13 |

Estudio Inter Ensayo

| Suero | No. de Réplicas | Media | Desvío Estandar | Coficiente de Variación % |
|-------|-----------------|-------|-----------------|---------------------------|
| 1 | 10 | 1.44 | 0.142 | 9.86 |
| 2 | 10 | 1.23 | 0.121 | 9.83 |
| 3 | 10 | 0.24 | 0.025 | 10.41 |

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

1. Para asegurar sensibilidad y especificidad en esta prueba IgM, el diluyente de la muestra provisto fue formulado para bloquear posibles interferencias de IgG y de Factor Reumatoideo (RF). Puede observarse turbidez luego de diluir la muestra, lo que se debe al bloque del suero IgG y no ha demostrado interferencia en los resultados. Dicha turbidez puede ser removida mediante centrifugación.
2. En especímenes con un alto RF y gran presencia de anticuerpos autoinmunes, no puede asegurarse la eliminación de interferencias.
3. Los resultados obtenidos mediante la utilización de este kit sirven solo como ayuda en el diagnóstico y deben ser interpretados en relación a la historia clínica del paciente, síntomas y otros procedimientos de diagnóstico.
4. Las muestras hemolizadas o lipémicas pueden causar resultados erróneos.

REFERENCIAS

1. Ebel A; Bachelart L; Alonso JM. Evaluation of a new competitive immunoassay (BioElisa Syphilis) for screening for *Treponema pallidum* antibodies at various stages of syphilis. J Clin Microbiol 1998; 36(2):358-61.
2. Young H; Moyes A; Seagar L; McMillan A. Novel recombinant-antigen enzyme immunoassay for serological diagnosis of syphilis. J Clin Microbiol 1998; 36(4):913-7.
3. Young H. Syphilis. Serology. Dermatol Clin 1998; 16(4):691-8.
4. Zrein M, Maure I, Boursier F, Soufflet L. Recombinant antigen-based enzyme immunoassay for screening of *Treponema pallidum* antibodies in blood bank routine. J Clin Microbiol 1995; 33:525-7.
5. Silletti RP. Comparison of CAPTIA syphilis G enzyme immunoassay with rapid plasma reagin test for detection of syphilis. J Clin Microbiol 1995; 33:1829-31.
6. Stienstra S, Peeters T, van der Straaten AM, Kadir N. *Treponema pallidum* membrane protein A ELISA: a new test for screening and diagnosis of syphilis. Beitr Infusionsther 1992; 30:85-91.
7. Byrne RE, Laska S, Bell M, Larson D, Phillips J, Todd J. Evaluation of a *Treponema pallidum* Western immunoblot assay as a confirmatory test for syphilis. J Clin Microbiol 1992; 30:115-22.
8. Bromberg K, Rawstron S, Tannis G. Diagnosis of congenital syphilis by combining *Treponema pallidum*-specific IgM detection with immunofluorescent antigen detection for *T. pallidum*. J Infect Dis 1993; 168:238-42.
9. Reisner BS, Mann LM, Tholcken CA, Waite RT, Woods GL. Use of the *Treponema pallidum*-specific captia syphilis IgG assay in conjunction with the rapid plasma reagin to test for syphilis. J Clin Microbiol 1997; 35:1141-3.