

APLICACIÓN

El sistema de pruebas ELISA *Treponema pallidum* IgG de ZEUS se diseñó para la detección cualitativa de anticuerpos de clase IgG frente a *T. pallidum* en suero humano. La prueba puede ser utilizada en conjunción con pruebas no treponémicas y los hallazgos clínicos como evidencia serológica de infección por *T. pallidum*. Esta prueba está concebida exclusivamente para uso diagnóstico *in vitro*. Esta prueba no está concebida para la detección selectiva de donantes de sangre o plasma.

IMPORTANCIA Y ASPECTOS GENERALES

Treponema pallidum (subespecie pallidum) es una bacteria delgada, Gram negativa, del orden de las espiroquetas (1). Es una de las espiroquetas clínicamente importantes y está relacionada con agentes tales como *Borrelia burgdorferi* y *Leptospira*. *T. pallidum* es el agente etiológico de la sífilis (1). No hay sistemas de cultivo clínicamente disponibles para *T. pallidum* y la identificación microbiológica del organismo depende de técnicas como el microscopio de campo oscuro, las tinciones de anticuerpos directos fluorescentes, las tinciones de plata y las pruebas serológicas (2).

La sífilis afecta a los seres humanos exclusivamente. En la mayor parte de los casos la sífilis se contrae por contacto sexual con una persona infectada. Otros modos de contraerla incluyen la transmisión congénita al recién nacido y la transfusión de sangre, pero estos casos son poco comunes (1, 2). La sífilis se presenta normalmente en una de las siguientes etapas: sífilis primaria, secundaria, latente o terciaria. Los métodos para diagnosticar los primeros signos de la sífilis incluyen el examen de campo oscuro de las lesiones activas y las pruebas de anticuerpos indirectos fluorescentes. Las pruebas serológicas para la detección de la sífilis incluyen pruebas no treponémicas (VDRL) y pruebas FTA o EIA treponémicas (1, 3). Por lo general tanto las pruebas treponémicas como las no treponémicas resultan necesarias para diagnosticar una presunta sífilis primaria. Normalmente las pruebas treponémicas permanecen positivas de por vida tras la infección inicial, independientemente de que se administre o no una terapia adecuada (1, 3). El sistema de pruebas ELISA *T. pallidum* IgG de ZEUS está diseñado para detectar anticuerpos de clase IgG frente a *T. pallidum* en suero humano.

FUNDAMENTO DE LA PRUEBA

El sistema de pruebas ELISA *T. pallidum* IgG de ZEUS está diseñado para detectar anticuerpos de clase IgG frente al antígeno p17 de *T. pallidum* en suero humano. Los pocillos de las tirillas de micropocillos de plástico se sensibilizan mediante adsorción pasiva con antígeno de *T. pallidum*. El procedimiento de la prueba comprende tres pasos de incubación:

1. Los sueros de la prueba (debidamente diluidos) se incuban en micropocillos revestidos de antígeno. Los anticuerpos contra antígeno específico que existan en la muestra se fijarán al antígeno inmovilizado. La placa se lava para eliminar el anticuerpo no fijado y otros componentes séricos.
2. Se agrega anti-IgG humana de cabra conjugada con peroxidasa a los pocillos y se incuba la placa. El conjugado reaccionará con el anticuerpo de tipo IgG inmovilizado en la fase sólida del paso 1. Se lavan los micropocillos para eliminar el conjugado que no haya reaccionado.
3. Los micropocillos que contienen conjugado de peroxidasa inmovilizado se incuban con solución de sustrato de peroxidasa. La hidrólisis del sustrato por la peroxidasa produce un cambio de color. Transcurrido un tiempo, se detiene la reacción y se mide fotométricamente la intensidad del color de la solución. La intensidad del color de la solución depende de la concentración de anticuerpos en la muestra original analizada.

COMPONENTES DEL SISTEMA DE PRUEBAS

Materiales suministrados:

Cada sistema de pruebas contiene los siguientes componentes en cantidad suficiente para realizar el número de pruebas indicado en la etiqueta del envase. **NOTA: los siguientes componentes contienen como conservante azida de sodio a una concentración de <0,1% (p/v): controles, calibrador y SAVE Diluent®.**

PLATE	1.	Placa: 96 micropocillos distribuidos en doce tirillas de 1x8 micropocillos recubiertos con el antígeno recombinante p17 de <i>Treponema pallidum</i> . Las tirillas se suministran envasadas en un soporte y selladas en un sobre con desecante.
CONJ	2.	Conjugado: anti-IgG humana (específica de la cadena Fc) de cabra conjugada con peroxidasa de rábano. Un vial de 15 ml con tapón blanco. Listo para usar.
CONTROL +	3.	Control positivo (suero humano): un vial de 0,35 ml con tapón rojo.
CAL	4.	Calibrador (suero humano): un vial de 0,5 ml con tapón azul.
CONTROL -	5.	Control negativo (suero humano): un vial de 0,35 ml con tapón verde.
DIL SPE	6.	Diluyente SAVE Diluent®: un frasco de 30 ml con tapón verde con Tween 20, albúmina sérica bovina y solución salina tamponada con fosfato, (pH 7,2 ± 0,2). Listo para usar. NOTA: El diluyente SAVE Diluent® cambiará de color cuando se combine con suero.
SOLN TMB	7.	TMB: un frasco de 15 ml de color ámbar con tapón ámbar que contiene 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). Listo para usar.
SOLN STOP	8.	Solución para detener la reacción: un frasco de 15 ml con tapón rojo con H ₂ SO ₄ 1 M y HCl 0,7 M. Listo para usar.
WASHBUF 10X	9.	Tampón de lavado concentrado (10X): diluir 1 parte del concentrado + 9 partes de agua desionizada o destilada. Un frasco de 100 ml con tapón transparente que contiene solución salina tamponada con fosfato concentrada 10X y Tween 20 (solución azul). NOTA: la solución 1X tendrá un pH de 7,2 ± 0,2.

NOTAS:

1. Los siguientes componentes no dependen del número de lote del sistema de pruebas y se pueden usar indistintamente con cualquier sistema de pruebas ELISA de ZEUS: TMB, solución para detener la reacción y tampón de lavado. El diluyente SAVE Diluent® se puede usar indistintamente con cualquier sistema de pruebas ELISA de ZEUS utilizando el n.º de producto 005CC.
2. El sistema de pruebas también contiene una etiqueta de componentes que contiene información específica de lote dentro de la caja del sistema de pruebas.

PRECAUCIONES

1. Para uso diagnóstico *in vitro*.
2. Se deben seguir las precauciones normales que se utilizan para manipular reactivos de laboratorio. En caso de contacto con los ojos, enjuague inmediatamente con abundante agua y busque asistencia médica. Utilice ropa de protección adecuada, guantes y protección para la cara/ojos. No inhale los vapores. Deshágase de los desechos observando todas las normativas locales, regionales y nacionales.
3. Los micropocillos de la placa ELISA no contienen microorganismos viables. No obstante, considere las tirillas **material con potencial riesgo biológico** y manipúlelas de manera acorde.
4. Los controles son **material con potencial riesgo biológico**. Los materiales a partir de los cuales se obtuvieron estos productos resultaron negativos para el antígeno del VIH-1, el HBsAg y para anticuerpos contra el VHC y el VIH por métodos de prueba homologados. Sin embargo, debido a que ningún método de prueba puede ofrecer completa seguridad de que estén ausentes agentes infecciosos, estos productos deben ser manejados según el Nivel 2 de Bioseguridad,

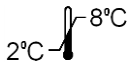
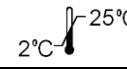
como se recomienda para cualquier suero humano o muestra de sangre potencialmente infecciosos en el manual "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" (Biosseguridad en los Laboratorios Microbiológicos y Biomédicos): última edición; y en la Norma de la OSHA sobre Patógenos que se transmiten en la sangre (5).

- Para lograr resultados precisos, es esencial cumplir estrictamente los tiempos y temperaturas de incubación especificados. **Se debe dejar que todos los reactivos alcancen temperatura ambiente (20-25 °C) antes de comenzar el ensayo.** Los reactivos no utilizados deben devolverse a temperatura de refrigeración inmediatamente después de su uso.
- Un lavado inadecuado podría ocasionar resultados de falsos positivos o falsos negativos. Debe reducirse al mínimo la cantidad de solución de lavado residual (p. ej., mediante secado o aspiración) antes de añadir el conjugado o el sustrato. No permita que los pocillos se sequen entre una incubación y la siguiente.
- El diluyente DAVE Diluent®, los controles, y el calibrador contienen azida sódica en una concentración de <0,1% (p/v). Se ha descrito la formación de azidas de plomo o cobre a partir de la azida de sodio en tuberías de laboratorio, lo cual puede causar explosiones al martillar las tuberías. Para evitarlo, enjuague bien el lavabo con agua después de eliminar las soluciones que contengan azida de sodio.
- La solución para detener la reacción es TÓXICA por inhalación, por contacto con la piel o en caso de ingestión. Provoca quemaduras. En caso de accidente o si se siente mal, solicite asistencia médica inmediatamente.
- La solución de TMB es NOCIVA. Irritante para los ojos, el sistema respiratorio y la piel.
- La solución concentrada del tampón de lavado es IRRITANTE. Irritante para los ojos, el sistema respiratorio y la piel.
- Limpie el fondo de la placa de todo residuo de líquido o huellas de los dedos que puedan alterar las lecturas de la densidad óptica (DO).
- La dilución o adulteración de estos reactivos puede generar resultados erróneos.
- No utilice reactivos de otro origen o fabricante.
- La solución de TMB debe ser incolora o de color amarillo muy claro, verde muy claro o azul muy claro al utilizarla. La contaminación de TMB con el conjugado u otros oxidantes hará que la solución cambie de color prematuramente. No utilice la solución de TMB si tiene un color azul intenso.
- Nunca pipetee con la boca. Evite el contacto de los reactivos y las muestras de pacientes con la piel y las membranas mucosas.
- Evite la contaminación microbiana de los reactivos. Esto puede ocasionar resultados incorrectos.
- La contaminación cruzada de reactivos y/o muestras podría ocasionar resultados erróneos.
- Los instrumentos de vidrio reutilizables se deben lavar y enjuagar cuidadosamente para eliminar cualquier residuo de detergente.
- Evite las salpicaduras o la formación de aerosoles.
- No exponga los reactivos a la luz intensa durante el almacenamiento o la incubación.
- Permita que las tirillas de micropocillos y su soporte alcancen la temperatura ambiente antes de abrir el sobre protector, a fin de evitar la condensación en los micropocillos.
- Recoja la solución de lavado en un lavabo de eliminación. Trate la solución de desecho con desinfectante (es decir: 10 % de lejía de uso doméstico - 0,5 % de hipoclorito de sodio) Evite la exposición de los reactivos a los vapores de la lejía.
- Precaución: neutralice cualquier desecho líquido con pH ácido antes de agregarlo a la solución de lejía.
- No utilice la placa ELISA si la tirilla indicadora del sobre de desecante ha cambiado de azul a rosado.
- No permita que el conjugado entre en contacto con recipientes o instrumentos que hayan podido contener previamente una solución que utilice azida de sodio como conservante. Los residuos de azida de sodio pueden destruir la actividad enzimática del conjugado.
- No exponga ninguno de los reactivos a soluciones que contengan lejía o a ningún olor fuerte de soluciones que contengan lejía. Los restos de lejía (hipoclorito de sodio), incluso a nivel de trazas, pueden destruir la actividad biológica de muchos de los reactivos incluidos en este sistema de pruebas.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Lector de micropocillos ELISA capaz de leer a una longitud de onda de 450 nm. **NOTA: Se podrá usar un lector de longitud de onda única (450 nm) o doble (450/620 - 650 nm). Es preferible la longitud de onda doble, puesto que el filtro de referencia adicional está configurado para disminuir posibles interferencias derivadas de anomalías capaces de absorber luz.**
- Pipetas capaces de dispensar con exactitud entre 10 y 200 µl.
- Pipeta multicanal capaz de dispensar con exactitud entre 50 y 200 µl.
- Depósitos de reactivos para pipetas multicanal.
- Frasco de lavado o sistema de lavado de micropocillos.
- Agua destilada o desionizada.
- Probeta graduada de un litro.
- Pipetas serológicas.
- Puntas de pipeta desechables.
- Toallas de papel.
- Cronómetro de laboratorio para controlar las etapas de incubación.
- Recipiente para desechos y desinfectante (es decir: 10 % de lejía de uso doméstico - 0,5 % de hipoclorito de sodio)

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

	Tirillas de micropocillos revestidos: vuelva a sellar inmediatamente las tirillas sobrantes con el secante y devuélvalas al lugar adecuado de almacenamiento. Una vez abiertas, las tirillas son estables durante 60 días siempre y cuando las tirillas indicadoras del envase del desecante permanezcan de color azul.
	Conjugado: NO CONGELAR.
	Sistema de pruebas, calibrador, control positivo, control negativo, TMB y diluyente DAVE Diluent® sin abrir
	Solución para detener la reacción: 2 - 25°C Tampón de lavado (1X): hasta 7 días entre 20 y 25 °C o durante 30 días entre 2 y 8 °C. Tampón de lavado (10X): 2 - 25°C

RECOGIDA DE LAS MUESTRAS

- ZEUS Scientific recomienda que el usuario realice la recolección de muestras conforme al documento M29 del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI): Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease (Protección de los trabajadores de laboratorio frente a las enfermedades infecciosas).
- Ningún método de prueba puede ofrecer una garantía completa de que las muestras de sangre humana no transmitirán infecciones. Por lo tanto, todos los derivados de la sangre deben considerarse potencialmente infecciosos.
- Con este ensayo solamente deben utilizarse sueros recién extraídos y debidamente refrigerados que se hayan obtenido mediante procedimientos homologados de venopunción aséptica (7, 8). No los utilice si se han agregado anticoagulantes o conservantes. Evite utilizar sueros hemolizados, lipémicos o contaminados con bacterias.
- Almacene la muestra a temperatura ambiente durante un lapso no superior a las 8 horas. Si la prueba no se realiza dentro de las 8 horas, el suero puede almacenarse a entre 2 - 8° C, durante un lapso no superior a las 48 horas. Si tiene previsto retrasar la realización de la prueba, conserve los sueros de la prueba a -20 °C o a temperaturas inferiores. Evite múltiples ciclos de congelación/descongelación que puedan ocasionar la pérdida de actividad de los anticuerpos y dar lugar a resultados erróneos. Es responsabilidad del laboratorio individual usar todas las referencias disponibles o sus propios estudios para determinar los criterios de estabilidad para su laboratorio (9).

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

1. Retire los componentes individuales del kit del almacenamiento y permita que alcancen la temperatura ambiente (20 - 25 °C).
2. Determine el número de micropocillos necesarios. Calcule seis determinaciones de control o calibrador (un blanco de reactivo, un control negativo, tres calibradores y un control positivo) por serie. En cada prueba se debe analizar un blanco de reactivo. Compruebe que las configuraciones de controles y calibrador sean correctas en los requisitos del programa y del lector. Devuelva las tirillas no usadas a la bolsa resellable con desecante, séllela y devuélvala a su almacenamiento entre 2 y 8 °C.

EJEMPLO DE CONFIGURACIÓN DE LA PLACA		
	1	2
A	Blanco	Paciente 3
B	Control negativo	Paciente 4
C	Calibrador	etc.
D	Calibrador	
E	Calibrador	
F	Control positivo	
G	Paciente 1	
H	Paciente 2	

3. Prepare una dilución 1:21 (por ejemplo: 10 µl de suero + 200 µl de diluyente SAVe Diluent®) del control negativo, del calibrador, del control positivo y de cada suero de paciente. **NOTA: el diluyente SAVe Diluent® sufrirá un cambio de color, lo cual confirma que la muestra se ha combinado con el diluyente.**
4. A cada micropocillo se añaden 100 µl de cada control diluido, calibrador y muestra de paciente. Compruebe que las muestras estén bien mezcladas. Utilice una punta de pipeta diferente para cada muestra.
5. Añada 100 µl de diluyente SAVe Diluent® al micropocillo A1 como blanco de reactivo. Compruebe que la configuración del micropocillo del blanco de reactivo sea correcta en los requisitos del programa y del lector.
6. Incube la placa a temperatura ambiente (20 - 25 °C) durante 25 ± 5 minutos.
7. Lave las tirillas de micropocillos 5 veces.
 - a. **Procedimiento de lavado manual:**
 1. Agite la placa para eliminar el líquido de todos los micropocillos.
 2. Llene cada micropocillo con solución tampón de lavado. Asegúrese de que no queden burbujas de aire atrapadas en los micropocillos.
 3. Repita los pasos 1. y 2. para un total de 5 lavados.
 4. Agite la placa para eliminar la solución de lavado de todos los micropocillos. Invierta la placa sobre una toalla de papel y dele unos golpes secos para eliminar cualquier residuo de solución de lavado de los micropocillos. Inspeccione visualmente la placa para asegurarse de que no queden residuos de la solución de lavado. Recoja la solución de lavado en un recipiente desechable y trátela con desinfectante al final de la jornada de trabajo.
 - b. **Procedimiento de lavado automático:**

Si está utilizando un sistema automático de lavado, ajuste el volumen dispensado en 300-350 µl/micropocillo. Ajuste el ciclo de lavado para 5 lavados, sin interrupción entre los mismos. En caso necesario, se puede extraer la placa de micropocillos del lavador, invertirla sobre una toalla de papel y golpearla con firmeza para eliminar cualquier residuo de solución de lavado de los micropocillos.
8. Agregue 100 µl de conjugado a cada micropocillo, incluido el micropocillo del blanco de reactivo, a la misma velocidad y en el mismo orden en que se agregaron las muestras.
9. Incube la placa a temperatura ambiente (20 - 25 °C) durante 25 ± 5 minutos.
10. Lave los micropocillos siguiendo el procedimiento descrito en el paso 7.
11. Agregue 100 µl de TMB a cada micropocillo, incluido el micropocillo del blanco de reactivo, a la misma velocidad y en el mismo orden en que se agregaron las muestras.
12. Incube la placa a temperatura ambiente (20 - 25 °C) entre 10 y 15 minutos.
13. Detenga la reacción añadiendo 50 µl de la solución para detener la reacción a cada micropocillo, incluido el micropocillo del blanco de reactivo, a la misma velocidad y en el mismo orden en que se agregó la TMB. Las muestras positivas cambiarán de azul a amarillo. Después de agregar la solución para detener la reacción, dé unos cuantos golpes secos a la placa para asegurarse de que las muestras estén bien mezcladas.
14. Ajuste la longitud de onda del lector de micropocillos a 450 nm y mida la densidad óptica (DO) de cada micropocillo con respecto al blanco de reactivo. Lea la placa en los 30 minutos posteriores a la adición de la solución para detener la reacción.

PROCEDIMIENTO DE PRUEBA ABREVIADO

1. Diluya el suero 1:21.
2. Añada la muestra diluida al micropocillo - 100 µl/micropocillo.
3. —————→ Incube durante 25 ± 5 minutos.
4. Lave.
5. Añada el conjugado - 100 µl/micropocillo.
6. —————→ Incube durante 25 ± 5 minutos.
7. Lave.
8. Añada la TMB - 100 µl/micropocillo.
9. —————→ Incube durante 10 - 15 minutos.
10. Añada la solución para detener la reacción - 50 µl/micropocillo - Mezcle.
11. LEA en el transcurso de 30 minutos.

CONTROL DE CALIDAD

1. El calibrador se debe analizar por triplicado cada vez que se realiza esta prueba. También se deben incluir un blanco de reactivo, el control negativo y el control positivo.
2. Calcule la media de los micropocillos de los tres calibradores. Si alguno de los tres valores difiere de la media más del 15%, deséchelo y calcule la media de los dos valores restantes.
3. El valor medio de la DO del calibrador, del control negativo y del control positivo deben quedar dentro de los intervalos siguientes:

	<u>Intervalo de DO</u>
Control negativo	≤ 0,250
Calibrador	≥ 0,300
Control positivo	≥ 0,500

- a. El valor de la DO para el control negativo dividido entre la media de la DO del calibrador debe ser ≤ 0,9.
 - b. El valor de la DO para el control positivo dividido entre la media de la DO del calibrador debe ser ≥ 1,25.
 - c. Si no se cumplen las condiciones anteriores, la prueba no se debe considerar válida y se debe repetir.
4. Los controles negativo y positivo sirven para verificar fallos sustanciales de los reactivos, pero no aseguran la precisión en el límite de referencia de la prueba.

- Es posible analizar controles adicionales siguiendo las directrices o los requisitos de las normativas locales, regionales o nacionales, o de las organizaciones acreditadas.
- Consulte el documento C24 del CLSI: Statistical Quality Control for Quantitative Measurement Procedures (Control de calidad estadístico para procedimientos de determinación cuantitativa) para obtener información sobre las prácticas de control de calidad apropiadas.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

1. Cálculos

- Factor de corrección:** El fabricante ha determinado un valor de DO como límite de referencia para las muestras positivas y lo ha correlacionado con el calibrador. El factor de corrección (FC) permite calcular el límite de referencia de las muestras positivas. Asimismo, permite corregir las pequeñas variaciones cotidianas de los resultados de las pruebas. El factor de corrección se determina para cada lote de componentes del kit y está impreso en la etiqueta de componentes que se encuentra en la caja del sistema de pruebas.
- Límite de referencia de la DO:** Para obtener el límite de referencia de la DO, multiplique el FC por la media de la DO del calibrador determinado anteriormente.
($FC \times \text{media de DO del calibrador} = \text{límite de referencia de la DO}$)
- Valores índice/cocientes de DO:** Calcule el valor índice/cociente de DO de cada muestra dividiendo su valor de DO por el límite de referencia de la DO del paso b.

Ejemplo:	DO media del calibrador	=	0,793
	Factor de corrección (FC)	=	0,25
	Límite de referencia de la DO	=	$0,793 \times 0,25 = 0,198$
	DO de muestra desconocida	=	0,432
	Valor índice/cociente de DO de la muestra	=	$0,432/0,198 = 2,18$

- Interpretaciones:** Los valores índice/cocientes de DO se interpretan como se indica a continuación:

	Valor índice/cociente de DO
Muestras negativas	$\leq 0,90$
Muestras dudosas	0,91 a 1,09
Muestras positivas	$\geq 1,10$

- Un cociente de DO menor o igual a 0,90 indica que no hay anticuerpos detectables frente a *T. pallidum* y se deberá informar como no reactiva para anticuerpos IgG contra *T. pallidum*.
- Vuelva a analizar por duplicado las muestras con valores del coeficiente de DO comprendidos en el intervalo dudoso (0,91 – 1,09). Documente cualesquiera dos de los tres resultados que concuerden. Repita la evaluación de las muestras dudosas utilizando un método serológico alternativo y/o repita la evaluación extrayendo otra muestra entre una y tres semanas más tarde.
- Un cociente de DO mayor o igual a 1,10 es positivo para anticuerpos IgG contra *T. pallidum*, el agente causante de la sífilis. Un resultado positivo de la prueba presume una infección activa o anterior con *T. pallidum*. Informe como reactivo para anticuerpos IgG contra *T. pallidum*. Realice otros ensayos serológicos de *T. pallidum* para confirmar o descartar un caso actual de sífilis activa.

Tabla 1: Interpretación de resultados de *T. pallidum*

Resultado no treponémico	Resultado treponémico	Informe/Interpretación para todos excluyendo recién nacidos, niños y personas infectadas con HIV*
No reactivo	Negativo/No reactivo	No hay evidencia serológica de infección con <i>T. pallidum</i> (la incubación o infección de sífilis primaria incipiente no se puede excluir).
Reactivo	Negativo/No reactivo	Es improbable una infección actual; probabilidad de un falso positivo biológico secundario a otro trastorno médico (enfermedades febriles, inmunizaciones, uso de fármacos intravenosos, enfermedades autoinmunes, etc.). Se recomienda repetir la prueba (no treponémica y treponémica por otros métodos de prueba).
No reactivo	Positivo/Reactivo	Probable infección pasada o reactividad cruzada potencial con otras espiroquetas/antígenos relacionados; Se recomienda pruebas adicionales adecuadas a los hallazgos/antecedentes clínicos**; Posibilidad de falso negativo no treponémico debido a prozona o sífilis latente tardía o neurosífilis.
Reactivo	Positivo/Reactivo	Evidencia presunta de infección actual (o infección tratada inadecuadamente, infección persistente, reinfección o falso positivo biológico si hay antecedentes anteriores); se recomienda realizar pruebas adicionales consistentes con la evaluación clínica.*
No reactivo	No realizado	Infección actual improbable; infección tratada efectivamente si se diagnosticó previamente y se trató; no se puede excluir incubación de sífilis o sífilis primaria incipiente; no se puede excluir sífilis latente o neurosífilis.
No realizado	Negativo/No reactivo	Infección actual o anterior improbable; no se puede excluir incubación de sífilis o sífilis primaria.

*Las personas infectadas con VIH pueden tener serorreactividad retardada o serología negativa.

**Pruebas no treponémicas cuantitativas; antecedentes clínicos; pruebas serológicas repetidas (secuenciales) para determinar cambios en el título.

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

- Interprete los resultados de la prueba de forma conjunta con la evaluación clínica y los resultados de otros procedimientos de diagnóstico.
- No se han establecido las características de funcionamiento de este dispositivo con enfermedades asociadas a la sífilis.
- Las muestras hemolíticas, ictericas o lipémicas pueden interferir con el resultado de este ensayo. Evite el uso de estos tipos de muestras.
- Los resultados de las muestras de pacientes inmunodeprimidos pueden resultar difíciles de interpretar.
- No se han establecido las características de funcionamiento de este dispositivo para otras matrices distintas del suero.
- Las características de funcionamiento de este dispositivo no se han establecido con muestras que contiene anticuerpos heterófilos que se sabe que causan resultados falsos positivos en diversos inmunoensayos.
- Un resultado positivo no establece un diagnóstico de sífilis. Ese resultado puede reflejar una infección previa; un resultado negativo puede excluir un diagnóstico de sífilis excepto en casos de incubación de la enfermedad o enfermedad primaria temprana.

RESULTADOS ESPERADOS

1. Datos demográficos y distribución por edad de la población para quien está pensado su uso:

Se probaron 998 muestras no seleccionadas, 500 cada una de personas con una solicitud para realizar una prueba de sífilis y 498 de mujeres embarazadas con una solicitud para realizar una prueba de sífilis (dos muestras se excluyeron de los cálculos debido a edad cuestionable). Centro 1, el fabricante, ubicado en el Noroeste, probó un total de 200 muestras, 100 de mujeres embarazadas y 100 de pacientes para quienes se había solicitado una prueba de sífilis. Centro 2, un laboratorio hospital, ubicado en el Noroeste, probó un total de 400 muestras; 200 de mujeres embarazadas y 200 de pacientes para quienes se había solicitado una prueba de sífilis. Centro 3, un laboratorio hospital, ubicado en la región del Atlántico medio, probó un total de 400 muestras; 200 de mujeres embarazadas y 200 de pacientes para quienes se había solicitado una prueba de sífilis. En la Tabla 2 se resumen los resultados de los datos demográficos de los pacientes.

Tabla 2: Datos demográficos para las poblaciones sometidas a prueba

Poblaciones	Cantidad analizada	Media	Mediana	Mínimo	Máximo
Muestras para las que se pidió una prueba de sífilis	500	34,2	31	5	88
Mujeres embarazadas posibles candidatas	500	28,8	28	15	48

2. Valores esperados/Intervalo de referencia:

Para determinar los valores esperados en las poblaciones sometidas a prueba, investigadores internos y externos evaluaron el comportamiento del dispositivo con 500 muestras enmascaradas recolectadas prospectivamente de personas y 498 muestras de mujeres embarazadas. Se requirió que las muestras fueran aleatorias, no seleccionadas, enviadas para hacer una prueba de anticuerpos contra sífilis. Se realizaron estudios adicionales a una población de 1000 pacientes hospitalizados no seleccionados (una muestra resultó no tener cantidad suficiente para la prueba). En las 500 muestras recolectadas prospectivamente de pacientes cuyas edades oscilaban de <1 a >70 años, 7 dieron resultado positivo. Cuatro de las 7 muestras provenían de pacientes varones por una prevalencia observada de 57,1%; 3/7 muestras provenían de mujeres por una prevalencia observada de 42,9%. La prevalencia general observada en este grupo fue de 1,4% (7/55 muestras). En las 498 muestras recolectadas de mujeres embarazadas cuyas edades oscilaban de 15 a 48 años, 3/489 dieron resultado positivo. La prevalencia observada en este grupo fue de 0,6%. En el grupo de 999 muestras de pacientes hospitalizados no seleccionados cuyas edades oscilaban de <1 a >70 años, 32 dieron resultado positivo. Catorce de las 32 muestras provenían de pacientes varones por una prevalencia observada de 43,8%; 18/32 muestras provenían de mujeres por una prevalencia observada de 56,3%. La prevalencia general observada en este grupo fue de 3,2% (32/999 muestras).

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO**1. Estudio comparativo:**

Se comparó el sistema de pruebas ELISA *T. pallidum* IgG de ZEUS con una prueba ELISA comercial para la detección de anticuerpos IgG contra *T. pallidum*. Los lugares de prueba, las poblaciones y las cantidades de muestras que se probaron aparecen a continuación en la Tabla 3:

Laboratorio	Muestras prospectivas			Muestras retrospectivas			
	Pacientes para quienes se pidió una prueba de sífilis	Mujeres embarazadas para quienes se pidió una prueba de sífilis	Pacientes hospitalizados no seleccionados	Suero comprado a pacientes positivos para VIH	Suero comprado a mujeres embarazadas	Suero comprado que se requirió que fuera RPR/TPPA +	Muestras caracterizadas como sífilis por un CDC
Sistema de pruebas	100	100	350	223	0	0	0
Lab. Hospital del Noroeste	200	200	350	0	277	280	0
Lab. Hospital del Atlántico Medio	200	200	300	0	0	0	0
CDC	0	0	0	0	0	0	157
Total	500	500	1000	223	277	280	157

- a. **Comportamiento en muestras recolectadas prospectivamente de la población para quien está pensado su uso:** El estudio comparativo para la Población para quien está pensado su uso consistió en 500 muestras de suero no seleccionadas de pacientes a quienes se les había pedido una prueba de sífilis y 500 muestras de suero compradas de mujeres embarazadas.

Tabla 4: Suero almacenado en banco de pacientes para quienes se pidió una prueba de sífilis

ELISA <i>T. pallidum</i> IgG de ZEUS		Comparativo					
		Positivo	Dudoso	Negativo	Total del laboratorio	PPA/NPA	IC del 95%
	Positivo	4	0	3	7	80,0	28,4 - 99,5
	Dudoso	1	0	1	2		
	Negativo	0	0	491	491	99,2	97,9 - 99,8
	Total del laboratorio	5	0	495	500		

Tabla 5: Suero comprado almacenado en banco de mujeres embarazadas para quienes se pidió una prueba de sífilis

ELISA <i>T. pallidum</i> IgG de ZEUS		Comparativo					
		Positivo	Dudoso	Negativo	Total del laboratorio	PPA/NPA	IC del 95%
	Positivo	3	0	0	3	75,0	19,4 - 99,4
	Dudoso	0	0	0	0		
	Negativo	1	0	494	495	100,0	99,4 - 100
	Total del laboratorio	4	0	494	498		

*Dos muestras no cumplieron con el criterio de inclusión para la prueba.

Las características de comportamiento para 1000 pacientes hospitalizados no seleccionados aparecen en la Tabla 6. Estas muestras se sacaron del trabajo de análisis químico de rutina de un laboratorio hospital.

Tabla 6: Pacientes hospitalizados no seleccionados

ELISA <i>T. pallidum</i> IgG de ZEUS		Comparativo					
		Positivo	Dudoso	Negativo	Total del laboratorio	PPA/NPA	IC del 95%
	Positivo	13	1	18	32	61,9	38,4 - 81,9
	Dudoso	1	0	9	10		
	Negativo	7	0	950	957	97,1	95,9 - 98,1
	Cantidad no suficiente	0	0	1	1		
	Total del laboratorio	21	1	978	1000		

- b. **Comportamiento en muestras recolectadas prospectivamente de poblaciones especiales:** los estudios comparativos para poblaciones especiales se llevaron a cabo en ZEUS Scientific. Las muestras se compraron a un proveedor de suero.

Tabla 7: Muestras de suero comprado almacenado en banco que se sabe son positivas para VIH-1

ELISA <i>T. pallidum</i> IgG de ZEUS		Comparativo					
		Positivo	Dudoso	Negativo	Total del laboratorio	PPA/NPA	IC del 95%
	Positivo	41	0	1	42	85,4	72,2 - 93,9
	Dudoso	1	0	0	1		
	Negativo	4	2	174	180	99,4	96,9 - 100
	Total del laboratorio	46	2	175	223		

Tabla 8: Muestras de suero comprado, almacenado en banco, de mujeres embarazadas que se solicitó fueran positivas para TPPA (27) y no reactivas para RPR/TPPA (250)

		Comparativo					
		Positivo	Dudoso	Negativo	Total del laboratorio	PPA/NPA	IC del 95%
ELISA <i>T. pallidum</i> IgG de ZEUS	Positivo	26	1	0	27	92,9	76,5 - 99,1
	Dudoso	0	0	0	0		
	Negativo	2	0	248	250	99,6	97,8 - 100
	Total del laboratorio	28	1	248	277		

Tabla 9: Suero comprado almacenado en banco que se requirió que fuera reactivo a RPR/TPPA

		Comparativo					
		Positivo	Dudoso	Negativo	Total del laboratorio	PPA/NPA	IC del 95%
ELISA <i>T. pallidum</i> IgG de ZEUS	Positivo	259	1	4	264	98,5	96,2 - 99,6
	Dudoso	1			1		
	Negativo	3		12	15	70,6	46,9 - 98,7
	Total del laboratorio	263	1	16	280		

Un panel de 157 muestras caracterizadas clínicamente se obtuvo de un CDC y se analizaron. Los resultados se presentan para proporcionar más información sobre el comportamiento del sistema de pruebas y no implica el respaldo del ensayo por parte del CDC. El resumen del comportamiento con el panel de sueros caracterizado aparece en la Tabla 10.

Tabla 10: Comportamiento con muestras caracterizadas clínicamente

Diagnóstico clínico	Resultados de ELISA <i>T. pallidum</i> IgG				% concordancia con el diagnóstico clínico Presentado con un IC del 95%	
	Positivo	Dudoso	Negativo	Total		
S. primaria tratada	11	0	0	11	100 (11/11)	76,2 - 100
S. secundaria sin tratar	41	0	2	43	95,3 (41/43)	84,2 - 99,4
S. secundaria tratada	39	0	0	39	100 (39/39)	92,6 - 100
S. latente sin tratar	6	0	5	11	54,5 (6/11)	23,4 - 83,3
S. latente tratada	48	0	2	50	96,0 (48/50)	86,3 - 99,5
Congénitas	1	1	1	3	33,3 (1/3)	0,84 - 90,6
Total	146	1	10	157	93,0 (146/157)	87,8 - 96,5

2. Reproducibilidad:

La reproducibilidad se evaluó internamente y en dos sitios clínicos externos. El estudio se llevó a cabo de la siguiente manera: 15 muestras fueron identificadas y/o preparadas por ZEUS Scientific para utilizarlas en el estudio basándose en su actividad en el ensayo. Se seleccionaron tres muestras por cada una de las siguientes: altamente negativa, cercana al punto de corte, escasamente positiva y altamente positiva. Para evaluar la reproducibilidad, en cada día de la prueba, cada muestra se diluyó dos veces y cada dilución se analizó por triplicado. Este proceso lo repitió un segundo técnico lo que dio como resultado doce resultados por día. Esto se repitió durante cinco días en cada sitio y los datos resultantes se utilizaron para evaluar la reproducibilidad.

Tabla 11: Resumen de la reproducibilidad en múltiples laboratorios - ELISA para detectar IgG contra *T. pallidum*

Miembro del panel	Muestra (N)	Valor de índice medio	Intraensayo		En un mismo día		Interensayos		Interlaboratorios		Total	
			DE	% CV	DE	% CV	DE	% CV	DE	% CV	DE	% CV
Negativo 1	180	0,06	0,01	14,7	0,01	19,3	0,01	10,7	0,02	29,1	0,02	36,6
Negativo 2	180	0,08	0,01	9,7	0,01	12,2	0,01	8,3	0,01	14,6	0,01	15,5
Negativo 3	180	0,31	0,03	8,6	0,03	10,7	0,02	6,6	0,04	12,7	0,04	13,3
Altamente negativo 1	180	0,80	0,04	5,1	0,05	6,3	0,03	4,2	0,06	7,3	0,06	7,3
Altamente negativo 2	180	0,74	0,04	5,1	0,04	5,8	0,02	3,0	0,05	7,0	0,05	7,4
Altamente negativo 3	180	0,76	0,04	5,0	0,04	5,6	0,21	2,7	0,05	6,5	0,05	7,2
En el límite 1	180	1,05	0,07	6,3	0,07	7,3	0,03	3,6	0,09	9,0	0,11	10,3
En el límite 2	180	1,13	0,05	4,7	0,06	5,4	0,04	3,1	0,07	6,0	0,08	6,7
En el límite 3	180	0,95	0,05	5,6	0,07	6,7	0,04	4,0	0,08	8,5	0,09	9,9
Escasamente positivo 1	180	1,45	0,09	6,2	0,11	7,6	0,06	4,4	0,13	8,9	0,14	9,6
Escasamente positivo 2	180	1,77	0,11	5,9	0,14	7,8	0,10	5,8	0,15	8,3	0,16	9,2
Escasamente positivo 3	180	1,93	0,14	7,1	0,17	8,9	0,12	5,9	0,19	9,7	0,21	10,7
Positivo	180	3,6	0,20	5,7	0,22	6,2	0,10	2,8	0,30	8,4	0,37	10,2
Positivo 2	180	3,1	0,20	6,2	0,22	7,3	0,13	4,4	0,28	9,0	0,34	10,9
Positivo 3	180	3,1	0,18	5,7	0,22	6,9	0,16	4,9	0,26	8,4	0,31	10,2
Control no reactivo	180	0,09	0,01	10,6	0,01	12,8	0,01	6,2	0,01	15,9	0,02	21,0
Control reactivo	180	3,9	0,16	4,1	0,12	5,1	0,14	3,5	0,22	5,7	0,02	5,9

La precisión se evaluó internamente en el lugar del fabricante. El estudio se llevó a cabo de la siguiente manera: 15 muestras fueron identificadas y/o preparadas por ZEUS Scientific para utilizarlas en el estudio basándose en su actividad en el ensayo. Se seleccionaron tres muestras por cada una de las siguientes: altamente negativa, cercana al punto de corte, escasamente positiva y altamente positiva. Para evaluar la precisión, en cada día de la prueba, cada muestra se diluyó dos veces y se analizó. Este proceso lo repitió un segundo técnico en una prueba separada lo que dio como resultado cuatro resultados por día. Esto se repitió durante doce días y los datos resultantes se utilizaron para evaluar la precisión.

Tabla 12: Resumen de la reproducibilidad analizada internamente - ELISA *T. pallidum* IgG

Miembro del panel	Muestra (N)	Media (UA/ml)	Intraensayo		En un mismo día		Interensayos		Total	
			DE	% CV	DE	% CV	DE	% CV	DE	% CV
Negativo 1	48	0,08	0,003	3,8	0,006	8,0	0,006	6,8	0,011	13,1
Negativo 2	48	0,12	0,005	4,0	0,003	6,5	0,009	7,0	0,013	10,5
Negativo 3	48	0,50	0,017	3,6	0,034	9,5	0,020	3,9	0,045	9,0
Altamente negativo 1	48	0,75	0,057	7,6	0,030	8,6	0,019	2,5	0,058	7,7
Altamente negativo 2	48	0,72	0,046	6,4	0,014	7,1	0,015	2,0	0,052	7,2
Altamente negativo 3	48	0,74	0,015	2,0	0,018	4,7	0,011	1,4	0,034	4,5
Cercana al punto de corte 1	48	0,92	0,028	3,0	0,025	5,0	0,036	3,9	0,056	6,1
Cercana al punto de corte 2	48	1,04	0,022	2,1	0,014	3,9	0,033	3,1	0,045	4,3
Cercana al punto de corte 3	48	0,95	0,037	3,9	0,025	6,4	0,036	3,8	0,061	6,4
Escasamente positivo 1	48	1,48	0,029	2,0	0,029	3,9	0,014	0,9	0,058	3,9
Escasamente positivo 2	48	1,43	0,026	1,8	0,020	2,5	0,017	1,2	0,050	3,5
Escasamente positivo 3	48	1,65	0,027	1,6	0,037	4,2	0,018	1,1	0,078	4,7
Altamente positivo 1	48	5,43	0,131	2,4	0,154	3,8	0,27	5,0	0,38	7,0
Altamente positivo 2	48	4,85	0,110	2,3	0,176	3,6	0,17	3,6	0,29	6,0
Altamente positivo 3	48	4,74	0,136	2,8	0,189	4,9	0,17	3,5	4,74	5,2
Control no reactivo	48	0,13	0,004	3,3	0,008	6,23	0,007	5,39	0,010	8,2
Control reactivo 1	48	5,63	0,049	7,5	5,5	5,15	0,29	5,11	0,42	7,51

3. Reactividad cruzada:

Se realizaron estudios en las instalaciones del fabricante para evaluar la reactividad cruzada con el sistema de pruebas ELISA *T. pallidum* IgG de ZEUS utilizando muestras que eran seropositivas para VEB, AAN, IgM frente a factor reumatoide (FR), Rubeola, VIH, VHS 1, VHS 2, Embarazo, Hepatitis B, IgG de VZV, IgM frente a VVZ, CMV, Toxoplasma, Lyme G/M y Hepatitis C. Se utilizaron sistemas de prueba de inmunoensayo para distribución comercial para determinar la seropositividad de las muestras. Los resultados de las pruebas para determinar Hepatitis B y C y embarazo fueron proporcionados por instalaciones de prueba alternativas. Se probaron diez muestras para cada posible agente de reacción cruzada. Los resultados presentados se obtuvieron probando los analitos frente a altas concentraciones de posibles agentes de reacción cruzada. Los resultados de este estudio se resumieron en la Tabla 13.

Tabla 13: Reactividad cruzada

Analito	Cantidad de positivos/Cantidad analizada
VEB	0/10
AAN	0/10
IgM frente a FR	0/10
Rubeola	0/10
VIH	0/10
VHS 1	0/10
VHS 2	0/10
Embarazo	0/10
Hepatitis B	0/10
VZV	0/10
IgM frente a VVZ	0/10
CMV	0/10
Toxoplasma	0/10
Lyme G/M	0/10
Hepatitis C	0/10

4. Sustancias interferentes:

El efecto de sustancias potencialmente interferentes en los resultados de las muestras generados utilizando el ensayo fue evaluado con las siguientes posibles sustancias interferentes: albúmina, bilirrubina, colesterol, hemoglobina, triglicéridos e intralípidos. La cantidad de analito en casa sustancia interferente es la siguiente:

- Bilirrubina: 1 mg/dl (bajo), 15 mg/dl (alto)
- Albúmina: 3,5 g/dl (bajo), 5 g/dl (alto)
- Colesterol: 150 mg/dl (bajo), 250 mg/dl (alto)
- Triglicéridos: 150 mg/dl (bajo), 500 mg/dl (alto)
- Hemoglobina: 10 g/dl (bajo), 20 g/dl (alto)
- Intralípidos: 300 mg/dl (bajo), 750 mg/dl (alto)

Todas las muestras positivas mostraron un cambio de señal de menos de un 20%. Las muestras en el límite mostraron un cambio de señal <20% con excepción del alto pico de la hemoglobina (25,2%). Las muestras negativas mostraron un cambio de señal (>20%) con picos altos y bajos de albúmina, hemoglobina, intralípidos, bilirrubina, colesterol y triglicéridos. Los resultados de las muestras negativas en cada caso permanecieron por debajo del punto de corte y el cambio en señal no afectó el resultado cualitativo.

REFERENCIAS

- Stevens RW and Schmitt ME: Evaluation of an Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Treponemal Antibody. Journal of Clinical Microbiology. 21(3):399-402, 1985.
- World Health Organization Technical Report Series: Treponemal Infections. No.674, 1982.
- Farnes SW, and Setness P: Serologic Tests for Syphilis. Post Graduate Medicine. 87(3): 37-46, 1990.
- U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health. U.S. Government Printing Office, Washington D.C., 4th Ed., 1999.
- U.S. Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration; Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens, Final Rule. Fed.Register 56:64175-64182, 1991.
- Protection of Laboratory Workers from Instrument Biohazards and Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids and Tissues; Approved Guideline. NCCLS/CLSI Document M29, Vol.17(12), 1997.

7. Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture. Second Edition; Approved Standard (1984). Published by National Committee for Clinical Laboratory Standards.
8. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens. NCCLS Document H18-A, Vol. 10, No. 12. Approved Guideline 1990.
9. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests; Approved Guidelines – 4th Edition (2010). CLSI Document GP44-A4 (ISBN 1-56238-724-3). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, PA 19087.



ZEUS Scientific, Inc.

200 Evans Way, Branchburg, New Jersey, 08876, USA

Toll Free (U.S.): 1-800-286-2111, Opción 2

International: +1 908-526-3744

Fax: +1 908-526-2058

Website: www.zeusscientific.com

ZEUS ELISA y SAVE Diluent* son marcas registradas de ZEUS Scientific, Inc.

Para Asistencia al cliente en EE. UU., comuníquese con su distribuidor local.

Para Asistencia técnica en EE. UU., comuníquese con ZEUS Scientific: llame al número gratuito o escriba un e-mail support@zeusscientific.com.

Para consultas a Asistencia al cliente y Asistencia técnica fuera de EE. UU., comuníquese con su distribuidor local.

©2017 ZEUS Scientific, Inc. Todos los derechos reservados.

