

El presente estudio tiene por objetivo evaluar el desempeño del kit Sífilis ELISA recombinante (Wiener lab.), frente a paneles de sueros y muestras provenientes de individuos infectados y no infectados con *Treponema pallidum*.

Se realizó un análisis de reproducibilidad del kit con controles negativos y positivos.

También se realizó un estudio sobre muestras de una rutina de banco de sangre.

Sáez-Alquézar A., Marques W., Botini M.B. - PANEL, Assessoria e Controle de qualidade, Laboratório Hemo-Life

Material

Producto en ensayo

Sífilis ELISA recombinante es un ensayo inmunoenzimático basado en el principio "sandwich" para la detección de anticuerpos anti-*T. pallidum* en suero o plasma humano.

Equipamiento y procedimientos utilizados

Para la realización de las pruebas fue utilizado el siguiente equipamiento:
Incubadora: MIC3 Malcom Médica
Lavadora: Tecan
Lectora/Spectra Modelo Classic / Tecan
Se utilizó el procedimiento indicado en el manual de instrucciones del kit.

Determinación de Reproducibilidad

Se ensayaron los sueros controles negativo y positivo del kit y los sueros controles internos negativo y positivo producidos por Panel.

Sueros controles del kit

Se realizaron 10 determinaciones del

suero control negativo y 10 determinaciones del suero control positivo del kit, cálculo de la Media (M), Desvío Standard (D.S.) y Coeficiente de Variación (C.V.), según Tabla 1. Los ensayos fueron realizados por tres operadores distintos simultáneamente.

Sueros controles internos. Master-Panel

Se realizaron 10 determinaciones del suero control interno negativo y 10 determinaciones del suero control positivo MASTER-PANEL, cálculo de la Media (M), Desvío Standard (D.S.), Coeficiente de Variación (C.V.) y relación DO/CO, según Tabla 1.

Paneles de sueros

Se utilizaron 110 muestras de sueros previamente caracterizados respecto a su reactividad hacia las pruebas obligatorias en la selección serológica de donantes de sangre, divididas en 2 paneles de sueros con muestras negativas y positivas.

a) Panel de sueros negativos para anti-*T. pallidum*:

Se analizaron 80 muestras de sueros ne-

EVALUACION DE UN KIT ELISA PARA DETECCION DE SIFILIS

gativos para todos los parámetros de uso obligatorio en la selección serológicas de donantes de sangre. El panel contenía muestras positivas para: anti-HIV, anti-T. cruzi, anti-HTLV, anti-HCV, anti-HBc, anti-HBsAg y heterólogas.

Con el kit Sífilis ELISA recombinante (Wiener lab.), todas las muestras presentaron resultado no reactivo (relación DO/CO < 1,0).

b) Panel de sueros positivos para anti-*T. pallidum*:

Se analizaron 30 muestras de sueros positivos para anti-*T. pallidum*.

Con el kit Sífilis ELISA recombinante (Wiener lab.) todas las muestras presentaron resultados reactivos (relación DO/CO > 1,0).

Estudio sobre muestras de banco de sangre

El kit en ensayo se evaluó en paralelo con un kit comercial de metodología similar tomado como referencia al que se denominó "Kit A".

Para el análisis se utilizaron muestras de

Tabla 1: estudios de reproducibilidad en sueros control

Control Negativo

	Media	D.S.	C.V.
Operador 1	0,018	0,008	44,1
Operador 2	0,017	0,008	52,7
Operador 3	0,008	0,007	93,7

Control Interno Master-Panel Negativo

	Media	D.S.	C.V.
Operador 1	0,028	0,028	103,0
Operador 2	0,019	0,010	56,1
Operador 3	0,004	0,003	81,0

Control Positivo

	Media	D.S.	C.V.
Operador 1	2,965	0,200	6,8
Operador 2	2,547	0,229	9,0

Control Interno Master-Panel Positivo

	Media	D.S.	C.V.
Operador 1	0,551	0,064	11,8
Operador 2	0,672	0,098	14,7

una rutina de selección serológica de donantes de sangre. Las pruebas se realizaron a lo largo de 7 días.

Todas las muestras que presentaron reactividad para cualquiera de los dos kits anti-*T. pallidum* empleados, se repitieron por duplicado.

Todas las muestras repetidamente reactivas para cada uno de los kits anti-*T. pallidum* empleados, se sometieron a pruebas complementarias de FTA-Abs. El total de muestras ensayadas por ambos métodos fue de 1111.

(C.V.) de 10 determinaciones sucesivas de Suero Control Negativo interno Master-Panel presentó valores de 103,0%, 56,1% y 81,0% (realizado en días distintos por operadores diferentes).

El coeficiente de variación (C.V.) de 10 determinaciones sucesivas de Suero Control Positivo interno Master-Panel presentó valores de 11,8% y 14,7% (realizado en días distintos por operadores diferentes).

Todos los resultados obtenidos con paneles de muestras negativas fueron no

reactivos, con relación DO/CO < 1,0 (Tabla 1 - Gráfico I).

Los resultados obtenidos con los paneles de muestras positivas mostraron reactividad, con relación DO/CO > 1,0 (Tabla 1).

En la utilización de Sífilis ELISA recombinante (Wiener lab.) en un total de 1111 muestras en paralelo, en una rutina serológica podemos verificar la presencia de 42 resultados inicialmente reactivos (RIR) de los cuales 34 se observaron repetidamente reactivos (RRR) (27 muestras reactivas con el kit de referencia y 25 muestras reactivas por el kit en ensayo).

A las 34 muestras repetidamente reactivas por los dos ELISAs se les realizaron estudios de RPR (BioMerieux) y prueba treponémica (FTA-Abs Wama) confirmándose como positivas para anti-*T. pallidum*, 20 de ellas. La prueba ELISA en ensayo detectó 19 de los 20 positivos, con 6 falso-positivos.

Del ensayo efectuado sólo se pudo calcular la especificidad, dado que el número de resultados positivos no fue suficiente para calcular la sensibilidad. La especificidad resultó 99,45% con un intervalo de confianza entre 99,4 y 99,5% (con una confianza del 95%).

Conclusiones

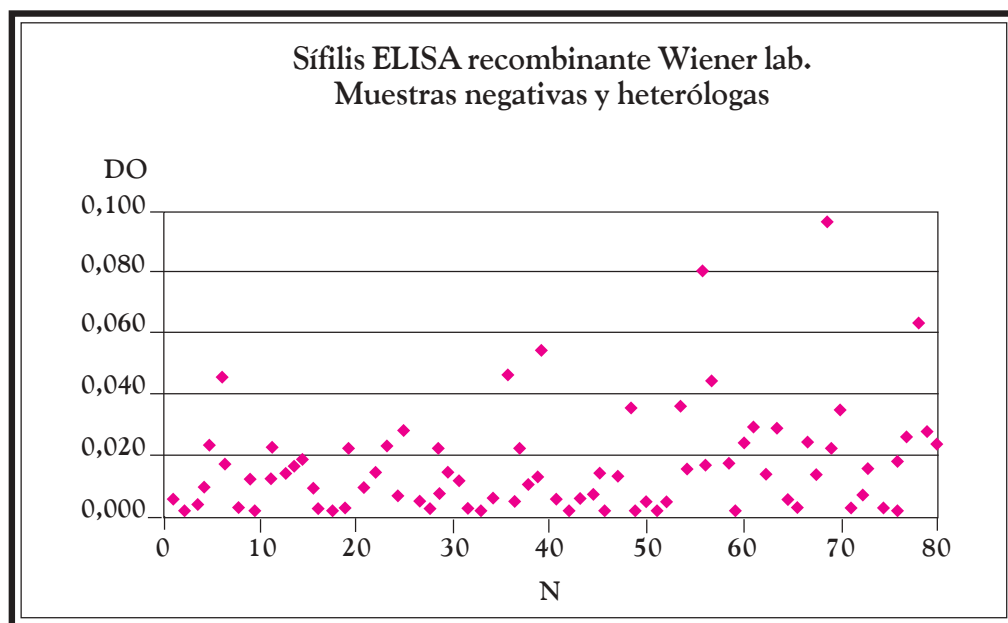
De acuerdo con la evaluación del kit Sífilis ELISA recombinante (Wiener lab.):

El coeficiente de variación (C.V.) de 10 determinaciones sucesivas de Control Negativo interno del kit presentó valores de 44,1%, 52,7% y 93,7% (realizado en días distintos por operadores diferentes).

El coeficiente de variación (C.V.) de 10 determinaciones sucesivas de Control Positivo interno del kit presentó valores de 6,8% y 9,0% (realizado en días distintos por operadores diferentes).

El coeficiente de variación

Gráfico I



ENFERMEDADES EMERGENTES: WEST NILE VIRUS

Department of Health and Human Services - Centers for Disease Control and Prevention Safer healthier people - September 29, 2004

Este virus fue aislado e identificado por primera vez en 1937 en un individuo febril en Uganda. Antes de 1999 el virus sólo se encontraba en el hemisferio este, con una amplia distribución en Africa, Asia, Medio Oriente y Europa. Existían frecuentes informes de brotes de la infección, asociados en general a enfermedad febril moderada. Desde mediados de los '90, la frecuencia y severidad de los brotes ha ido en aumento.

En los últimos años este virus se ha detectado también en América. En Estados Unidos, el Centers for Disease Control (CDC) ha recibido informes de casos de infección por el Virus del Nilo Occidental (Western Nile Virus-WNV) en la mayoría de los estados. Los picos de infección en este país ocurren entre agosto y septiembre.

Epidemiología

El West Nile Virus (WNV) es un virus a RNA de simple cadena de la familia de los flaviviridae, género flavivirus. Perteneció al grupo de virus asociados con encefalitis humana. Desde el año 1999 hasta el presente se han observado muy pocos cambios genéticos en las cepas de virus circulantes en Estados Unidos.

Estructura

Mide entre 40 y 60 nm, es simétrico e icosaédrico. Tiene una cadena simple de RNA de aproximadamente 10.000 a 11.000 bases.

Huéspedes/Formas de transmisión

El WNV se mantiene en la naturaleza por medio de un ciclo que involucra aves y mosquitos.

La enfermedad humana se produce por la picadura del mosquito infectado. Los mosquitos llevan el virus en sus glándulas salivales e infectan a las aves de especies susceptibles. Las aves que sobreviven a la viremia que se produce de 1 a 4 días después de la exposición desarro-

llan inmunidad de por vida. No se sabe exactamente cómo sobrevive el virus en las estaciones secas o en áreas con temperaturas invernales bajas.

Se ha observado en muy escasas oportunidades la transmisión a través de órganos trasplantados y transfusiones.

Factores de riesgo

El factor más significativo parece ser la edad, ya que existe mayor riesgo de desarrollo de enfermedad del sistema nervioso central en pacientes de mayor edad.

Descripción clínica

Enfermedad febril

La mayoría de las personas infectadas por el WNV no desarrollan síntomas. Aproximadamente el 20% de los infectados desarrollan enfermedad febril con un período de incubación de 2 a 14 días. Las manifestaciones son: fiebre, dolor de cabeza, fatiga, rash cutáneo, inflamación de los ganglios y dolor ocular (ocasionalmente).

Enfermedad severa

Cuando la infección afecta el sistema

nervioso central, se producen síndromes que van desde la cefalea febril a meningitis aséptica o encefalitis, las cuales no se distinguen de los síndromes similares causados por otros agentes etiológicos.

La meningitis por WNV generalmente involucra fiebre, cefalea y rigidez de nuca. Se observa pleocitosis y no se ven mayores alteraciones en el estado de conciencia.

La encefalitis por WNV, que es la forma más severa de la enfermedad neuroinvasiva por WNV, se presenta con fiebre y cefalea pero además, síntomas más globales. Habitualmente existen alteraciones de la conciencia, que pueden ser moderadas o llegar al coma. Pueden observarse déficits neurológicos, incluyendo parálisis de los miembros inferiores y de los nervios craneales.

La poliomielitis por WNV, es menos común que la meningitis o la encefalitis. Este síndrome está caracterizado generalmente por un incremento agudo de la debilidad de los miembros inferiores o parálisis en ausencia de pérdida sensorial. La parálisis es precedida en algunos casos por dolor. Puede ocurrir en ausencia de fiebre, cefalea u otros síntomas comunes asociados a WNV.

Las manifestaciones clínicas asociadas a la enfermedad severa son: fiebre, síntomas gastrointestinales, ataxia, neuritis ópticas, convulsiones, debilidad, cambios en el estado mental y mielitis. En una minoría de pacientes con enfermedad severa desarrollan rash maculopapular o morbiliforme en cuello, tronco, brazos o piernas.

A pesar de que no ha sido observado en las últimas epidemias, han sido descritos casos de miocarditis, pancreatitis y hepatitis fulminante.

Hallazgos de laboratorio

El recuento de leucocitos en sangre periférica es en general normal o aumentado con linfocitopenia. También se observa anemia. Puede existir hiponatremia, particularmente en pacientes con encefalitis.

El examen del líquido cefalorraquídeo muestra pleocitosis usualmente con predominio de linfocitos. Las proteínas se

encuentran en general elevadas y la glucosa es normal.

Pruebas diagnósticas en la enfermedad severa

El método más eficiente de diagnóstico es la detección de anticuerpos IgM contra el WNV en una muestra de suero extraído entre 8 y 14 días después del comienzo de los síntomas o sobre líquido cefalorraquídeo obtenido dentro de los 8 días. La aparición de IgM en el LCR es fuertemente indicativo de infección del SNC. Individuos recientemente vacunados contra flavavirus o recientemente infectados con los mismos (fiebre amarilla, encefalitis de Japón, dengue) pueden dar reacción positiva a los ELISAs para WNV. No se observa este efecto en LCR.

Debido a estas reacciones cruzadas con estos virus relacionados, cuando se sospecha la existencia de alguna de estas enfermedades, se recomiendan las pruebas de neutralización PRNT (plaque reduction neutralization test). Esta prueba es la más específica para flavavirus transmitidos por artrópodos y puede ser usada para determinar los falso-positivos en ELISA para detección de IgM u otras pruebas como hemaglutinación o IFI. Esta prueba puede ser usada incluso para distinguir la infección por distintos flavavirus aunque en este caso existe cierto grado de reacción cruzada que persiste y puede producir resultados ambiguos.

La determinación de PCR (Polymerase Chain Reaction) se utiliza en el diagnóstico de infección por WNV con ciertas limitaciones debido a la viremia baja y transitoria. En el 50% de los pacientes que presentan meningoencefalitis aguda por WNV, puede ser detectado el material genético en LCR. Sin embargo, debido a que esta no es una buena sensibilidad, un resultado negativo en esta situación, no descarta una infección por WNV. En estos pacientes se recomienda hacer estudios serológicos.



Agenda de Congresos

Argentina

- ✓ VIII Congreso Nacional Bioquímico

Se llevará a cabo en San Juan, del 10 al 13 de agosto de 2005

Organizan

Confederación Unificada Bioquímica de la República Argentina (CUBRA)
Colegio Bioquímico de San Juan

Informes

www.cbsj.com.ar/cubra/

- ✓ IV Congreso del Grupo Cooperativo Iberoamericano de Medicina Transfusional

X Congreso Argentino de Medicina Transfusional

Se llevará a cabo en el Hotel Intercontinental. Moreno 809, Buenos Aires, del 14 al 16 de Setiembre de 2005

Organizan

Asociación Argentina de Hemoterapia e Inmunohematología
Grupo Cooperativo Iberoamericano de Medicina Transfusional

Informes

www.aahi.org.ar

Estados Unidos

- ✓ XIX International Congress on Clinical Chemistry 2005 AACC Annual Meeting and Clinical Lab Expo

Se llevará a cabo en Orange County Convention Center del 24 al 28 de Julio de 2005 en Orlando, Florida

México

- ✓ XXIX Congreso Nacional de Químicos Clínicos y Expoquímicos

Se llevará a cabo en el Hotel Valle Grande - Av. Miguel Alemán y Tetabiate - Cd. Obregón, Sonora - México del 12 al 17 de Setiembre de 2005

Organiza

Colegio Nacional de Químicos Clínicos, A.C. (CoNaQuiC)

Informes

www.conaquic.com

Brasil

- ✓ XXXII Congresso Brasileiro de Análises Clínicas V Congresso Brasileiro de Citología Clínica

Se llevará a cabo en el Centro de Cultura e Convenções de Goiânia en la ciudad de Goiânia, Brasil, del 22 al 26 de Mayo de 2005

Informes

www.cbac.org.br

