

DOCUMENTOS TÉCNICOS PARA EL LABORATORIO CLÍNICO

PROCEDIMIENTO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE SÍFILIS

VERSIÓN 1, 2018

La presente versión responde fielmente al contenido de la Resolución N° 483 del 23.02.2018 del Instituto de Salud Pública de Chile, que aprueba el presente documento

AUTORES ISP

T.M. Rodrigo Colina Morales

Encargado de Laboratorio de Agentes de Infecciones de Transmisión Sexual ITS
Sección Bacteriología, Subdepto. Enfermedades Infecciosas
Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia
Instituto de Salud Pública de Chile

T.M. Alejandra Manríquez Cortez

Laboratorio de Agentes de Infecciones de Transmisión Sexual ITS Sección Bacteriología, Subdepto. Enfermedades Infecciosas
Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia
Instituto de Salud Pública de Chile

REVISORES INTERNOS

Dr. Juan Carlos Hormazabal

Jefe de Subdepartamento de Enfermedades Infecciosas Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia Instituto de Salud Pública de Chile

BQ. Pamela Araya Rodríguez

Jefe Sección Bacteriología, Subdepto. Enfermedades Infecciosas, Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia Instituto de Salud Pública de Chile.

Dra. Verónica Ramírez Muñoz

Jefe Subdepto. Coordinación Externa, Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia Instituto de Salud Pública de Chile

PROCEDIMIENTO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE SÍFILIS

I.- ALCANCE

Este documento de recomendaciones técnicas está dirigido a los laboratorios clínicos de la red asistencial que realizan el diagnóstico serológico de Sífilis para las técnicas de VDRL, RPR y MHA-Tp.

II.- INTRODUCCION

La Sífilis es una enfermedad infecciosa sistémica causada por *Treponema pallidum* (*T. pallidum*) de reservorio humano exclusivo, y que cursa clínicamente en etapas. Se transmite preferentemente por contacto sexual, por contacto directo con las lesiones, contacto directo con sangre y de la madre al hijo durante el embarazo.

La Sífilis primaria corresponde a la primera etapa de la infección. El período de incubación es de 4 semanas (rango entre 1 y 90 días). La primera manifestación clínica, denominada chancro primario, aparece en el punto de inoculación (puerta de entrada) del treponema, como una pequeña erosión que posteriormente se ulcera, es habitualmente única, indolora, con bordes bien definidos y que desaparece espontáneamente en un período de 3 a 8 semanas.

La Sífilis secundaria corresponde a la etapa de diseminación hematogena. Se manifiesta dentro de los 6 primeros meses después de la infección, habitualmente 6 a 8 semanas. El comienzo del período secundario se acompaña a menudo de síntomas similares a un estado gripal tales como fiebre, cefalea, acompañado de un rash cutáneo y linfadenopatía generalizada. Las lesiones cutáneas más frecuentes pueden ser máculas, pápulas o lesiones pápulo escamosas, no pruriginosas, distribuidas simétricamente principalmente en tronco y extremidades, es frecuente la localización palmo-plantar. En esta etapa las lesiones son altamente infectantes por contener gran cantidad de treponemas en su superficie. Sin tratamiento estas manifestaciones cutáneas y mucosas desaparecen espontáneamente. Se presentan en episodios de tres a cuatro semanas de duración y en forma recurrente.

Cuando las manifestaciones visibles de la enfermedad desaparecen gradualmente se pasa al estado de **Sífilis latente precoz**, que se caracteriza por la ausencia de signos clínicos, cuando la infección ha ocurrido en los 12 meses previos al diagnóstico.

La **Sífilis latente tardía** es una etapa que se caracteriza por ausencia de signos clínicos, cuando la infección inicial ha ocurrido en un tiempo mayor a los 12 meses previos. Esta etapa puede prolongarse por décadas. En esta etapa la enfermedad no es transmisible por vía sexual.

La **Sífilis terciaria** corresponde a la etapa destructiva de la enfermedad, por lo general se desarrolla muchos años después de la infección primaria en pacientes no tratados o tratados inadecuadamente. En las lesiones de Sífilis Terciaria la presencia de treponemas es rara y las lesiones destructivas son producto de una reacción de hipersensibilidad. Clínicamente puede presentar compromiso cardiovascular, de grandes vasos y válvulas cardíacas, y la presencia de gomas sifilíticas que corresponden a lesiones granulomatosas características de la sífilis tardía que se presentan en la piel, en las mucosas y los huesos. La neurosífilis

se puede manifestar en cualquiera de las etapas clínicas de la enfermedad y consiste en el compromiso del Sistema Nervioso Central (SNC) por *T. pallidum*. Esta puede ser asintomática, pero con alteraciones en el líquido cefalorraquídeo. Clínicamente se puede presentar como meningitis sífilítica, compromiso de los pares craneanos, sífilis meningovascular, tabes dorsal y parálisis general progresiva.

La identificación del *T. pallidum* mediante el examen directo del exudado de la lesión (microscopía de campo oscuro y/o fluorescencia directa) es una prueba definitiva para asegurar el diagnóstico, aunque un resultado negativo del mismo no descarta la posibilidad de la enfermedad, ya que la presencia de treponemas puede ser escasa dependiendo de los días de evolución y de tratamientos previos. Debido a las dificultades que puede presentar la realización del diagnóstico directo, la experiencia indica que el diagnóstico indirecto (serológico) se ha convertido en el procedimiento de uso más frecuente.

Actualmente existen diferentes técnicas de laboratorio para el diagnóstico serológico de sífilis:

PRUEBAS NO TREPONÉMICAS (Reagínicas) No determinan anticuerpos específicos frente a *T. pallidum*, y se basan en la detección de reaginas o anticuerpos anti lipídicos (inespecíficos) en respuesta al material lipoidal liberado por los tejidos dañados por el *T. pallidum*. Se utiliza una solución alcohólica con presencia de cardiolipina, colesterol y lecitina.

Estas pruebas son:

- VDRL (Venereal Research Disease Laboratory)
- RPR (Rapid Plasma Reagin)
- USR (Unheated Serum Reagin) (*)

Son técnicas de bajo costo, fáciles de efectuar, se utilizan como pruebas de inicio en la detección serológica de sífilis y para evaluar la respuesta al tratamiento. La desventaja que presentan es que, debido a su inespecificidad, pueden arrojar falsos resultados positivos.

PRUEBAS TREPONÉMICAS: detectan específicamente los anticuerpos contra *T. pallidum* y su utilidad en el laboratorio está orientada a confirmar serológicamente los resultados obtenidos por las pruebas no treponémicas. Las pruebas treponémicas más conocidas son:

- FTA-Abs (Inmunofluorescencia indirecta con absorción del suero)
- MHA-Tp (Microhemaglutinación)
- ELISA (Inmunoensayo)
- Quimioluminiscencia

Estas técnicas carecen de utilidad para monitorear los tratamientos, ya que suelen permanecer positivas en el 85 a 90% de los pacientes tratados adecuadamente.

Es importante recordar que un resultado de examen no treponémico reactivo indica sospecha de infección activa (en curso) o serología residual. En el diagnóstico de la Sífilis es fundamental el análisis del examen clínico, los antecedentes epidemiológicos y los resultados de exámenes de laboratorio. Ninguno de estos aspectos por sí solo entrega un diagnóstico definitivo.

El uso de las técnicas treponémicas para confirmación de serología, está reservado para aquellos casos en que el equipo clínico tratante lo considere pertinente y en todos los casos de gestantes sin antecedentes de Sífilis previa con serología no treponémica reactiva.

(*) : El USR, no está contemplada en las técnicas indicadas por el Ministerio de Salud de Chile para el diagnóstico de Sífilis, a través de la Circular Ministerial N° 1 para Servicios de Sangre del 02 de Febrero de 2015 y Circular Ministerial N° 13 para Laboratorios Clínicos del 23 de Septiembre de 2015.

El diagnóstico de Sífilis en el recién nacido hijo de madre con sífilis requiere de la comparación de la curva serológica de la mujer durante la gestación, con el resultado de la técnica no treponémica del recién nacido, por tanto ambos deben ser evaluados con la misma técnica de laboratorio (no treponémica).

III.- PRUEBA NO TREPONÉMICA VDRL

1.- GENERALIDADES

Este procedimiento corresponde a la técnica de VDRL, la cual es una reacción antígeno-anticuerpo de floculación en lámina que está estandarizada para su realización en suero calentado y en líquido cefalorraquídeo (LCR) sin calentar. Emplea una suspensión de antígeno VDRL que se prepara con antígeno VDRL y solución salina amortiguada VDRL.

El antígeno es una solución alcohólica incolora que contiene cardiolipina al 0,03%, colesterol al 0,9% y suficiente lecitina purificada para producir una reactividad estándar. La solución salina amortiguada VDRL contiene formaldehído neutro, fosfato disódico, fosfato monopotásico y cloruro de sodio.

El examen VDRL mide anticuerpos inespecíficos contra material lipoidal liberado de las células huésped dañadas, así como material de estructura proteica y posiblemente cardiolipina, liberados desde los treponemas. Los anticuerpos antilipoidales son anticuerpos que se producen no sólo como consecuencia de la sífilis y de otras enfermedades treponémicas, sino también en respuesta a enfermedades de naturaleza aguda y crónica en las cuales se produce daño de los tejidos.

La técnica VDRL permite el análisis cualitativo y cuantitativo de las muestras de suero y LCR. Es de elección para seguimiento del tratamiento, por ser el primer examen serológico que disminuye sus títulos de reactividad después de un tratamiento adecuado.

Un examen No treponémico Reactivo sin otra evidencia clínica o epidemiológica de sífilis, no confirma una infección por *T. pallidum*.

2. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS MATERIALES

- Láminas de vidrio con anillos de parafina u otro similar de 14 mm de diámetro
- Micropipeta de 200 µL.
- Tubos khan.
- Soporte de madera para las láminas.
- Vaso precipitado de 50 mL.
- Jeringa de vidrio de 1 ó 2 mL.
- Aguja calibre 18G calibrada con 60 +/- 2 gotas /mL (Suero).
- Aguja calibre 21G calibrada con 100 +/- 2 gotas/mL (LCR).
- Frasco de vidrio de 30 mL con tapa esmerilada y de fondo plano, para preparación de antígeno.
- Pipetas de vidrio 1 y 5 mL.
- Propipetas.

REACTIVOS

Suspensión antigénica.
Solución salina amortiguada.
Suero fisiológico al 0.9%.
Suero fisiológico al 10%.
Sueros controles: Reactivo, Reactivo débil, No Reactivo.

EQUIPOS

- Rotador orbital adaptable a 180 +/- 2 rpm, que describa un círculo de ¾ de pulgada de diámetro en un plano horizontal.
- Baño termostático a 56°C.
- Centrífuga.
- Microscopio óptico, equipado con ocular 10x y un objetivo de 10x.
- Termómetro ambiental.
- Vitrina refrigerada (2-8°C).
- Freezer para -20°C.

3.- TÉCNICA VDRL EN MUESTRAS DE SUERO

Antes de empezar a trabajar, el personal del laboratorio debe disponer y utilizar todos los elementos de protección personal requeridos para la manipulación de sangre y fluidos biológicos: guantes, delantal de bioseguridad, antiparras.

3.1.- PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE SUERO

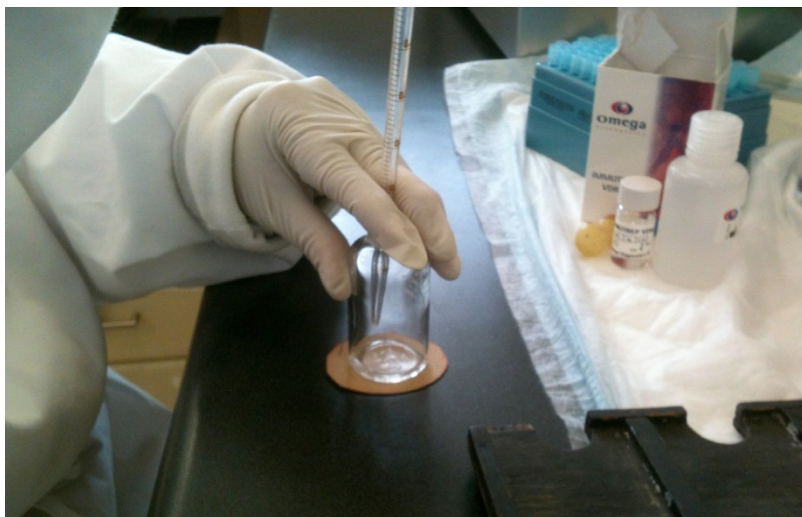
- 3.1.1.- Verificar que las muestras tengan un volumen adecuado, estén libres de hemólisis, lipemia y/o contaminación, condiciones que constituyen causal de rechazo.
- 3.1.2.- Si la muestra es sangre total, se centrifuga a 2.500 rpm por 5 minutos para separar el suero.
- 3.1.3.- Rotular el tubo primario y secundario con el número asignado por el laboratorio.
- 3.1.4.- Del tubo primario se traspa el suero a otro tubo khan (secundario), ambos previamente rotulados con el mismo número entregado por el laboratorio.
- 3.1.5.- Inactivar los sueros tapados a 56°C durante 30 minutos en el baño termostático.
- 3.1.6.- Dejar enfriar a temperatura ambiente durante 10 minutos hasta su procesamiento y no más allá de 4 horas. Si excede dicho tiempo deberá inactivar nuevamente por 10 minutos adicionales.
- 3.1.7.- Completar el registro de lecturas de VDRL donde se consignan las muestras a procesar en la corrida.
- 3.1.8.- Si las muestras no se procesan dentro de las siguientes 4 horas, estas se deben conservar refrigeradas a 2-8°C por un máximo de 48 horas.
- 3.1.9.- Si las muestras no se procesan dentro de las 48 horas se deben congelar a -20°C, pudiendo conservarse de esta forma hasta 2 años.

3.2.- PREPARACIÓN DEL ANTÍGENO PARA VDRL EN SUERO

- 3.2.1.- Temperar el laboratorio entre 23° y 29° C (óptimo 25°C).
- 3.2.2.- Agregar con pipeta de vidrio a un frasco con tapa esmerilada y fondo plano, 0.4 mL de solución salina amortiguada incluida en el kit.
- 3.2.3.- Agregar 0.5 mL de solución de antígeno gota a gota, por 6 segundos a la solución salina, haciendo rotar el frasco suave y continuamente. La punta de la pipeta debe quedar a nivel del tercio superior del frasco para evitar que tome contacto con la solución salina. Se obtiene la velocidad de rotación adecuada cuando el centro del frasco describe un círculo de dos pulgadas (5 cms.) de diámetro 3 veces por segundo (18 veces en 6 segundos). Continuar con la rotación del frasco durante 10 segundos. Ver figura N°1.
- 3.2.4.- Añadir 4.1 mL de solución salina amortiguada con pipeta de 5 mL dejándola escurrir suavemente.
- 3.2.5.- Tapar el frasco y agitar por inversión vigorosa aproximadamente 30 veces en 10 segundos.
- 3.2.6.- La solución debe ser usada dentro de las siguientes 8 a 12 horas. Este volumen de 5 mL de suspensión de antígeno alcanza para 180 determinaciones aproximadamente.
- 3.2.7.- Controlar la suspensión de antígeno cada vez que se prepare, con sueros patrones o sueros control de reactividad conocida (Reactivo, Reactivo débil y No Reactivo). Se recomienda la utilización de sueros controles comerciales, ya que están estabilizados, por lo que no es necesario congelarlos. Los controles preparados en los Laboratorios, deben ser sueros de pacientes, caracterizados por un profesional con experiencia. En este caso, se debe alicuotar los sueros y congelarlos a -20 °C. Los controles "in-house" deben ser calentados a 56°C antes de utilizarlos.
- 3.2.8.- Las reacciones con los sueros controles deben reproducir la pauta de reactividad establecida. Un suero No Reactivo debe presentar una dispersión completa de las partículas de antígeno.
- 3.2.9.- No debe usarse una suspensión de antígeno inadecuada, ni tampoco mezclas de suspensiones de antígeno.
- 3.2.10.- Los sueros controles deben incluirse en todas las preparaciones de la suspensión de antígeno, para asegurar la concentración adecuada de ésta al momento de realizar las determinaciones.

Figura N° 1

Preparación del antígeno para VDRL.



3.3.- TÉCNICA CUALITATIVA DE VDRL EN SUERO

- 3.3.1.- En el extremo superior izquierdo de cada lámina se anota el número de la primera muestra e inferior izquierdo el número de la última.
- 3.3.2.- Calibrar la aguja despuntada calibre 18G con una jeringa de vidrio de 2 mL aspirando 1 mL de suspensión la cual debe rendir 60 +/-2 gotas, es decir entre 58 y 62. Una gota de aguja calibre 18G corresponde a 17 µL.
- 3.3.3.- Ubicar las láminas de vidrio en el soporte de madera según el número de muestras a procesar. Agitar los tubos en vortex y con micropipeta dispensar 50 µL de cada una de las muestras preparadas en el punto anterior dentro de cada pocillo y extender el contenido por toda la superficie. Ver figura N°2.
- 3.3.4.- Homogenizar la suspensión de antígeno con suaves movimientos circulares. Aspirar un volumen suficiente y en forma vertical, agregar una gota a cada pocillo. Se puede utilizar cualquier dispositivo que rinda el volumen exacto requerido de antígeno. En el caso del uso de una pipeta automática, se recomienda el uso de una pipeta a repetición para minimizar posibles inconvenientes en la cantidad de alícuota dispensada.
- 3.3.5.- Agitar las láminas durante 4 minutos a 180 rpm en rotador orbital.

Figura N° 2.

Láminas para VDRL con 12 pocillos y ejemplo de dispensado de muestras.



3.4 LECTURA E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS TÉCNICA CUALITATIVA DE VDRL EN SUERO

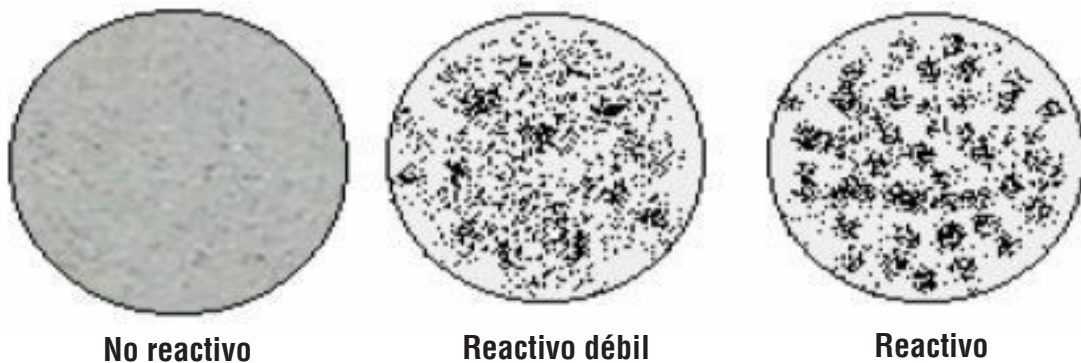
- 3.4.1.- Inmediatamente después de la agitación leer las reacciones al microscopio con aumento de 100 x (10x ocular y 10x objetivo).
- 3.4.2.- Leer los controles No Reactivo (NR), Reactivo débil (Rd) y Reactivo (R).
- 3.4.3.- Interpretación de Lecturas (Ver figura N° 3):

Sin grumos o con ligera rugosidad	: No Reactivo (NR)
Grumos pequeños	: Reactivo débil (Rd)
Grumos medianos a grandes	: Reactivo (R)

- 3.4.4.- El resultado Reactivo se caracteriza habitualmente por grumos grandes o pequeños, pero el tamaño es uniforme.
- 3.4.5.- Todo resultado Reactivo, Reactivo débil y No Reactivo rugoso debe ser analizado cuantitativamente. Esporádicamente se puede presentar un fenómeno de prozona, el cual se debe a un exceso de componente reactivo en el suero (anticuerpos reagínicos en muy alto nivel). Este fenómeno no es de fácil reconocimiento, pero se puede sospechar por la presencia de floculación irregular y de grumos débilmente unidos. Una reacción zonal se informa como Reactiva.

Figura N° 3

Interpretación de lecturas de floculación microscópica.



3.5.- TÉCNICA CUANTITATIVA DE VDRL EN SUERO

- 3.5.1.- Separar las muestras R a cuantificar.
- 3.5.2.- Dispensar las muestras según figura N° 4.
- 3.5.3.- Depositar con micropipeta 50 μ L de muestra de suero en el pocillo número 1 (dilución 1:1) y 50 μ L de suero fisiológico 0.9 % en los pocillos 5 y 9, según figura N°4.
- 3.5.4.- En el pocillo número 5 agregue 50 μ L de muestra de suero (dilución 1:2), mezclar por aspiración ocho veces con la pipeta automática, evitando la formación de burbujas y transferir 50 μ L de esta mezcla al pocillo número 9 (dilución 1:4) mezclar ocho veces igual forma como se explicó anteriormente, descartar los últimos 50 μ L.
- 3.5.5.- Proceder de la misma manera con el resto de las muestras paciente.
- 3.5.6.- Homogenizar suavemente la suspensión del antígeno y añadir 1 gota a cada pocillo, con aguja calibre 18G.
- 3.5.7.- Agitar la lámina por 4 minutos en rotador a 180 rpm.
- 3.5.8.- Leer las reacciones al microscopio según se indica en el punto 3.4. e interpretar los resultados según lo indica el ejemplo de la tabla N° 1.

Figura N° 4:

Esquema de diluciones para VDRL cuantificado.

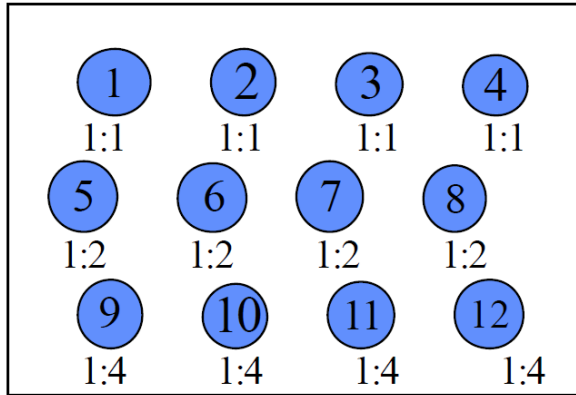


Tabla N° 1:

Ejemplo de interpretación de resultados de VDRL cuantificado.

Diluciones del suero						Informe
S/diluir(1:1)	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	
R	Rd	-	-	-	-	Reactivo sin diluir
R	R	Rd	-	-	-	R. en dilución al 1:2
R	R	R	Rd	-	-	R. en dilución al 1:4
Rd	R	R	R	Rd	-	R. en dilución al 1:8
NR(rugoso)	Rd	R	R	R	-	R. en dilución al 1:16
Rd	-	-	-	-	-	Reactivo débil
R	R	-	-	-	-	R. en dilución al 1:2

R=Reactivo Rd=Reactivo débil NR=No Reactivo

- 3.5.9.- Si la reactividad continúa, seguir diluyendo la muestra de la siguiente manera: hacer una dilución 1:8 en tubo, colocando 700 µL de suero fisiológico y 100 µL de muestra y mezclar en vórtex.
- 3.5.10.- Transferir 50 µL de suero fisiológico al pocillo 5 y 6. Agregar 50 µL de la dilución 1:8 al pocillo 4. Tomar otros 50 µL de esta dilución y mezclar 8 veces con los 50 µL de suero fisiológico del pocillo 5, de ahí tomar 50 µL y mezclar con los 50 µL de suero fisiológico del pocillo 6, mezclar 8 veces y eliminar los últimos 50 µL.
- 3.5.11.- Agregar una gota de antígeno (17 µL) a cada pocillo.
- 3.5.12.- Agitar la lámina en el rotador orbital, a 180 rpm por 4 minutos.
- 3.5.13.- Leer al microscopio según el punto 3.4 y seguir el ejemplo de interpretación de resultados. Tabla N°1

- 3.5.14.- Si la reactividad continúa (1:32 R o Rd) , preparar diluciones adicionales.
- 3.5.15.- Preparar dilución 1:64 en tubo, tomando 700 μ L de suero fisiológico y 100 μ L de la dilución 1:8 y se procede según lo descrito anteriormente hasta la obtención de un resultado NR.

4.- TÉCNICA VDRL EN MUESTRAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO (LCR)

4.1.- PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE LCR

- 4.1.1.- Si las muestras no se procesan dentro de las 4 horas, se conservan refrigeradas entre 2-8°C por un máximo de 48 horas.
- 4.1.2.- Si las muestras no se procesan dentro de las 48 horas, pueden ser conservadas congeladas a -20°C hasta ser procesadas.
- 4.1.3.- Las muestras de LCR no necesitan ser inactivadas.

4.2.- PREPARACIÓN DEL ANTÍGENO PARA VDRL EN LCR

- 4.2.1.- Coloque una parte de solución salina al 10 % y una parte de suspensión de antígeno preparada para usar en muestras de suero.
- 4.2.2.- Homogenizar suavemente y dejar en reposo por al menos 5 minutos a temperatura ambiente.
- 4.2.3.- Esta suspensión se puede utilizar solo hasta 2 horas después de preparada.

4.3.- EJECUCIÓN TÉCNICA CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE VDRL EN MUESTRAS DE LCR

- 4.3.1.- Calibrar la aguja despuntada calibre 21G con una jeringa de vidrio de 2 mL aspirando 1 mL de suspensión la cual debe rendir 100 +/- 2 gotas, es decir entre 98 y 102, correspondiente a 10 μ L.
- 4.3.2.- Las muestras de LCR se procesan de manera cualitativa y cuantitativa, desde la dilución 1:1 a 1:8.
- 4.3.3.- Utilizar una fila horizontal de 4 pocillos de la lámina para cada muestra de LCR.
- 4.3.4.- Colocar 50 μ L de solución salina al 0.9 % en las posiciones 2, 3 y 4 de la lámina.
- 4.3.5.- Agregar 50 μ L LCR al pocillo 1.
- 4.3.6.- Tomar otros 50 μ L de LCR y mezclar 8 veces con la solución salina del pocillo 2 (dilución 1:2). Traspasar 50 μ L al pocillo 3 (dilución 1:4) mezclar 8 veces. Traspasar 50 μ L al pocillo 4 (dilución 1:8) mezclar 8 veces y eliminar los 50 μ L restantes.
- 4.3.7.- Homogenizar suavemente la suspensión de antígeno para VDRL en LCR.
- 4.3.8.- Aspirar el antígeno y en posición vertical agregar una gota a cada muestra (10 μ L).
- 4.3.9.- Simultáneamente para evaluar reactividad y concentración del antígeno se debe realizar un análisis cuantitativo del control reactivo.
- 4.3.10.- Agitar las láminas durante 8 minutos en agitador de placas a 180 rpm.

4.4.- LECTURA E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS TÉCNICA VDRL EN LCR

- 4.4.1.- Inmediatamente después de la agitación leer las reacciones según el punto 3.4
- 4.4.2.- Informar los resultados en término de la mayor dilución de LCR que se observe reactividad. En el estudio de LCR no existe el criterio Rd, siendo toda reactividad categorizada como reactiva (R).

5.- CONTROL DE CALIDAD EN TÉCNICAS DE VDRL

5.1.- CONTROL DE CALIDAD INTERNO

- 5.1.1.- Se deben utilizar sueros controles de reactividad R, Rd y NR. Se recomienda la utilización de sueros controles comerciales, ya que son estabilizados, por lo que no es necesario congelarlos. Los controles preparados en los Laboratorios, deben ser sueros de pacientes caracterizados por un profesional con experiencia.
- 5.1.2.- Estos sueros se deben alicuotar y mantener congelados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los controles “in-house” deben ser calentados a $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ antes de utilizarlos.
- 5.1.3.- Para cada nuevo lote de antígeno se tiene que verificar con los controles R, Rd y NR.

5.2.- CRITERIOS DE ACEPTABILIDAD

- 5.2.1.- Con el antígeno preparado para la técnica de VDRL, los controles R, Rd y NR presentan una reacción como se observa en la figura N° 3.
- 5.2.2.- El control reactivo es titulado en cada preparación, y éste debe dar un título esperado y reproducible en cada procedimiento.

5.3.- CRITERIOS DE RECHAZO

- 5.3.1.- Si los controles NR, Rd y R no se comportan de la manera esperada se interrumpe el proceso y se siguen los siguientes pasos:
 - a) Repetir la lectura de los controles utilizando el mismo antígeno. Si la discordancia persiste, preparar nuevamente el antígeno, idealmente por otro profesional competente.
 - b) Verificar que la fecha de vencimiento del kit esté vigente. Si el problema continúa, utilizar un kit nuevo y repetir los controles. Cambiar de N° de Lote si persiste la no conformidad.
 - c) Verificar la temperatura ambiental, esta influye en la reactividad del antígeno. Verificar que esté entre 23 y $29\text{ }^{\circ}\text{C}$. Bajo $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ pueden obtenerse falsos negativos y sobre $29\text{ }^{\circ}\text{C}$ falsos positivos.

IV.- PRUEBA NO TREPONÉMICA RPR

1.- GENERALIDADES

Este procedimiento corresponde a la técnica de RPR, la cual es una reacción antígeno-anticuerpo de floculación en tarjeta (círculo de 18 mm de diámetro) que se realiza en suero o plasma sin calentar o calentado, empleándose una suspensión de antígeno VDRL modificado con fosfato de sodio y potasio, mertiolato, cloruro de colina, EDTA y partículas de carbón. El cloruro de colina elimina la necesidad de calentar las muestras; el EDTA le da mayor estabilidad a la suspensión de antígeno y las partículas de carbón permiten que la lectura se realice a ojo desnudo.

El examen RPR mide anticuerpos inespecíficos producidos en respuesta al material lipoidal liberado desde las células dañadas del huésped, así como en respuesta a material de estructura proteica, liberado desde los treponemas. Los anticuerpos antilipoidales son anticuerpos producidos, no solo a consecuencia de una sífilis u otras enfermedades treponémicas sino también en respuesta a enfermedades no treponémicas, agudas o crónicas, en las cuales hay daño de los tejidos. Si hay presencia de anticuerpos, estos se combinan con las partículas lipídicas del antígeno produciendo aglutinación. Las partículas de carbón coagulan con los anticuerpos dando como resultado la formación de grumos negros sobre el fondo blanco de la tarjeta de lectura. Si no hay anticuerpos presentes se observa en la muestra un color gris uniforme, un punto negro o una cola de humo.

La técnica de RPR se emplea generalmente como técnica de "screening" (tamizaje). Un examen no treponémico reactivo, sin otra evidencia clínica y/o epidemiológica de sífilis, no confirma la infección.

La prueba de RPR en tarjeta no puede utilizarse para analizar líquido cefalorraquídeo, la única prueba estandarizada y recomendada internacionalmente es el VDRL.

2.- MATERIAL, REACTIVO Y EQUIPO MATERIALES

- Aguja calibre 20G sin bisel, que rinde un volumen de 60 ± 2 gotas por mL de antígeno.
- Micropipeta automática.

REACTIVOS E INSUMOS

- Tarjetas recubiertas de plástico, cada una con 10 círculos de 18 mm de diámetro.
- Pipetas plásticas desechables, que rinden un volumen de 50 μ L por gota.
- Antígeno RPR, en ampollas de 1 o 3 mL.
- Frasco plástico para distribuir el antígeno.
- Aguja calibre 20G sin bisel, que rinde un volumen de 60 ± 2 gotas por mL de antígeno.
- Sueros Controles NR, R, Rd o Mínimo.

EQUIPOS

- Rotador orbital adaptable a 180 ± 2 rpm, que describa un círculo de $\frac{3}{4}$ de pulgada de diámetro en un plano horizontal.
- Refrigerador (2-8°C).
- Freezer para -20°C.
- Cubierta humedecedora.

3.- DESARROLLO

Antes de empezar a trabajar, el personal del laboratorio debe disponer y utilizar todos los elementos de protección personal requeridos para la manipulación de sangre y fluidos biológicos: guantes, delantal de bioseguridad, antiparras.

3.1.- PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE SUERO

- 3.1.1.- Verificar que las muestras tengan un volumen adecuado, estén libres de hemólisis, lipemia y/o contaminación, condiciones que constituyen causal de rechazo.
- 3.1.2.- Si la muestra es sangre total, se centrifuga a 2.500 rpm por 5 minutos para separar el suero.
- 3.1.3.- Si el análisis se realiza de inmediato, los sueros se pueden retener en el tubo de recolección original. Vaciar a tubos limpios y secos si se va a postergar el análisis.
- 3.1.4.- Completar el registro de lecturas de RPR donde se consignan las muestras a procesar en la corrida.
- 3.1.5.- Si las muestras no se procesan dentro de las siguientes 4 horas, estas se deben conservar refrigeradas a 2-8°C por un máximo de 48 horas.
- 3.1.6.- Si las muestras no se procesan dentro de las 48 horas se deben congelar a -20°C.

3.2.- SUSPENSIÓN DE ANTÍGENO DE RPR

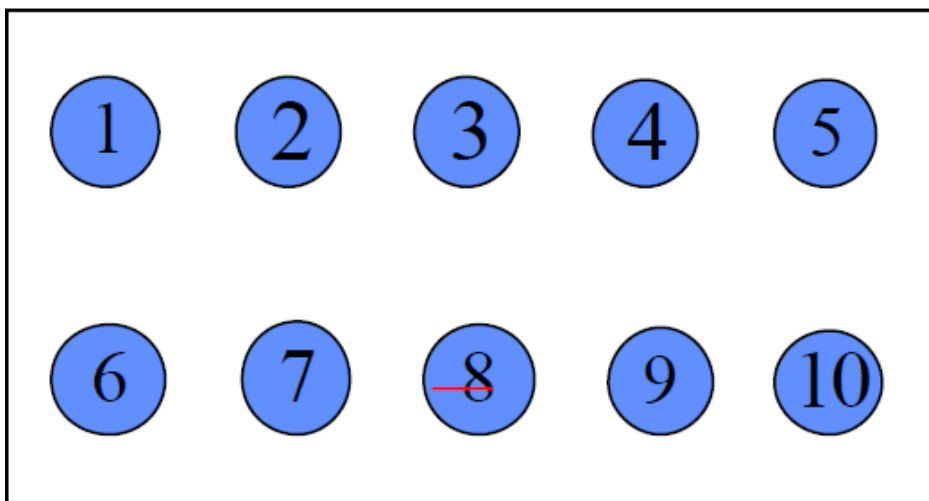
- 3.2.1.- Seguir las instrucciones del fabricante.
- 3.2.2.- Colocar la aguja en el frasco plástico.
- 3.2.3.- Agitar suavemente la ampolla de antígeno para resuspender las partículas de carbón.
- 3.2.4.- Abrir cuidadosamente la ampolla protegiendo los dedos con guantes o toalla de papel.
- 3.2.5.- Por succión, trasladar toda la suspensión del antígeno desde la ampolla al frasco plástico, colocando la aguja en el fondo de la ampolla y comprimiendo el frasco plástico para usarlo como una perilla de succión.
- 3.2.6.- Rotular el frasco plástico con el número de lote, fecha de expiración de la suspensión de antígeno y fecha en que se vació el antígeno de la ampolla al frasco plástico.
- 3.2.7.- La ampolla con antígeno, sin abrir y de manera refrigerada a 2^o- 8 °C se mantiene estable durante 12 meses después de la fecha de manufactura. No congelar.
- 3.2.8.- La suspensión de antígeno depositada en el frasco plástico es estable hasta 3 meses, de manera refrigerada entre 2^o - 8°C.
- 3.2.9.- La suspensión de antígeno debe protegerse de la luz y de temperaturas superiores a 30°C. Nunca debe utilizarse más allá de la fecha de expiración.
- 3.2.10.- El uso inmediato de un antígeno refrigerado puede producir una disminución de la sensibilidad de la prueba. Por esta razón después de retirar del refrigerador, permitir que el antígeno alcance la temperatura ambiente (entre 23^o y 29°C) antes de usarlo.
- 3.2.11.- Usar sólo las suspensiones de antígeno que reproduzcan el patrón de reacción con los sueros controles.
- 3.2.12.- Agitar suavemente el frasco cada vez que se distribuya el antígeno.

3.3.- PRUEBA CUALITATIVA DE RPR EN SUERO (EN TARJETA)

- 3.3.1.- Depositar 50 μ L de muestra sin calentar o calentada, en un anillo de 18 mm de la tarjeta, usando una pipeta automática. Figura N° 5.
- 3.3.2.- Guardar las tarjetas a temperatura ambiente, no tocar con los dedos el área dentro de los anillos para no engrasarlos. Cada anillo debe usarse una sola vez.
- 3.3.3.- Extienda el suero completamente dentro del anillo con la punta plástica, evitando que el suero se salga de este.
- 3.3.4.- Agitar suavemente el frasco plástico que contiene el antígeno para resuspender las partículas.
- 3.3.5.- Sosteniendo el frasco plástico con la aguja en posición vertical dejar caer varias gotas para eliminar el aire de la aguja y agregar una gota de la suspensión de antígeno RPR a cada anillo que contenga suero. No mezclar. El antígeno y la muestra se mezclarán durante la rotación.
- 3.3.6.- Colocar la tarjeta en un rotador orbital y agitar 8 minutos a 100 (+/- 2) rpm.
- 3.3.7.- De manera opcional se recomienda usar una cámara húmeda para cubrir las tarjetas durante el período de rotación, para evitar la evaporación. Puede colocarse una bandeja recubierta con papel absorbente humedecido con agua destilada.
- 3.3.8.- Leer las reacciones a ojo desnudo, inmediatamente después de terminada la rotación, sobre un fondo negro y con luz blanca potente. No emplear luz fluorescente porque las reacciones mínimas pueden omitirse. Para distinguir mejor los resultados No Reactivos de los Reactivos mínimos, girar e inclinar ligeramente la tarjeta.

Figura N° 5:

Ejemplo de tarjeta plástica RPR con 10 anillos



3.4.- LECTURA E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS TÉCNICA CUALITATIVA DE RPR

Informar los resultados de la siguiente manera:

Grumos pequeños a grandes:	Reactivo (R)
Singrumos o rugosidad muy leve:	No Reactivo (NR)

En el examen RPR los resultados se informan como Reactivo o No Reactivo. La reacción Reactiva mínima (o débil) se informa Reactiva.

Figura N° 6:

Interpretación de lectura de floculación macroscópica.



3.5.- PRUEBA CUANTITATIVA DE RPR EN SUERO (EN TARJETA)

- 3.5.1.- Para cada muestra a ser analizada, deposite 50 μ L de solución salina al 0.9% en los anillos N° 2 al N°5 de la tarjeta. No se debe extender la solución salina.
- 3.5.2.- Coloque 50 μ L de muestra en el anillo N° 1.
- 3.5.3.- Deposite 50 μ L de muestra en el anillo N° 2 mezclando el contenido 5 a 6 veces, evitando la formación de burbujas. Extienda la mezcla en todo el diámetro del anillo.
- 3.5.4.- Transferir 50 μ L del anillo 2, al 3, al 4, al 5 mezclando después de cada transferencia. Deseche 50 μ L después de mezclar el contenido en el anillo N° 5.
- 3.5.5.- Sosteniendo el frasco plástico con la aguja en posición vertical dejar caer varias gotas para eliminar el aire de la aguja, posteriormente agregar una gota de la suspensión de antígeno RPR a cada anillo que contenga suero. No mezclar.
- 3.5.6.- Colocar la tarjeta en el rotador orbital y agitar 8 minutos a 100 (+/- 2) r.p.m.
- 3.5.7.- Opcionalmente es recomendable usar una cámara húmeda para cubrir las tarjetas durante el período de rotación.
- 3.5.8.- Leer las reacciones, a ojo desnudo, inmediatamente después de terminada la rotación, sobre un fondo negro y con luz potente. No emplear luz fluorescente porque las reacciones mínimas pueden omitirse. Para distinguir mejor los resultados No Reactivos de los Reactivos mínimos, girar e inclinar ligeramente la tarjeta.

- 3.5.9.- Si la solución más diluida analizada (1:16) resulta reactiva, se prepara una dilución 1:16 de la muestra de prueba, agregando 100 µL de suero a 1.5 mL de solución salina al 0.9%. Mezclar bien. Deposite 50 µL de dilución 1:16 en el anillo N° 1 y complete el procedimiento en la forma descrita anteriormente hasta obtener un resultado No Reactivo.

4.- CONTROL DE CALIDAD RPR

4.1.- CONTROL DE CALIDAD INTERNO

- 4.1.1.- Se deben utilizar sueros controles R y NR, es recomendable además la inclusión de un control de reactividad mínima.
- 4.1.2.- Se recomienda la utilización de sueros controles comerciales, ya que son estabilizados, por lo que no es necesario congelarlos. Los controles preparados en los Laboratorios, deben ser sueros de pacientes caracterizados por un profesional con experiencia. Estos sueros se deben alicuotar y mantener congelados a -20 °C.
- 4.1.3.- Para cada nuevo lote de un kit se debe realizar una verificación con los sueros controles.

4.2.- CRITERIOS DE ACEPTABILIDAD

- 4.2.1.- Los sueros controles reproducen el patrón de reactividad correspondiente.

4.3.- CRITERIOS DE RECHAZO

- 4.3.1.- Si los controles no se comportan de la manera esperada se interrumpe el proceso y se siguen estos pasos:
- 4.3.2.- Repetir la lectura de los controles utilizando el mismo antígeno. Si la discordancia persiste, repetir el procedimiento con un nuevo frasco de antígeno.
- 4.3.3.- Verificar la vigencia del kit con la fecha de vencimiento. Si el problema continúa, utilizar un kit nuevo y repetir los controles. Cambiar a otro lote de kit si persiste la no conformidad.

V.- PRUEBA TREPONEMICA MHA-Tp

1.- GENERALIDADES

Test de hemaglutinación pasiva para la detección de anticuerpos específicos anti-*T. pallidum*. Este método utiliza eritrocitos de pollo como fase sólida, los cuales están sensibilizados con un extracto antigénico de *T. pallidum*, que se encuentra adherido a la membrana del eritrocito. Estos eritrocitos sensibilizados aglutinarán con los anticuerpos específicos presentes en el suero de pacientes sifilíticos. Esta técnica tiene la ventaja de su alta especificidad, la cual es comparable con FTA-ABS. Las reacciones falso-positivas son extremadamente infrecuentes, por estas razones esta técnica se utiliza como prueba de confirmación serológica.

2.- MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

- Tubos de vidrio khan.
- Placas de microtitulación con fondo en U.
- Soporte con espejo de aumento para lectura del fondo de los pocillos.

Reactivos

- Kit de MHA-Tp.
- Reactivo antigéno: Suspensión de eritrocitos de pollo sensibilizados.
- Reactivo Control: Suspensión de eritrocitos de pollo no sensibilizados.
- Solución diluyente: Tampón fosfato salino que contiene componentes solubles de Treponema Reiter y agentes estabilizadores.
- Control positivo: Suero de conejo inmune.
- Control negativo: Suero de conejo no inmune.

Equipos

- Centrífuga.
- Micropipetas automáticas.
- Refrigerador (2-8°C).
- Freezer para -20°C.

3.- DESARROLLO DE LA TECNICA

Antes de empezar a trabajar, el personal del laboratorio debe disponer y utilizar todos los elementos de protección personal requeridos para la manipulación de sangre y fluidos biológicos: guantes, delantal de bioseguridad, antiparras.

3.1.- PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS Y ALMACENAJE

- 3.1.1.- Verificar que las muestras tengan un volumen adecuado, estén libres de hemólisis, lipemia y/o contaminación, condiciones que constituyen causal de rechazo.

- 3.1.2.- Si la muestra es sangre total se centrifuga a 2.500 rpm por 5 minutos para separar el suero, rotular el tubo primario y secundario con el examen solicitado, número asignado y la fecha, utilizando una etiqueta autoadhesiva impresa.
- 3.1.3.- Si las muestras no se procesan dentro de las 4 horas, se conservan refrigerados entre 2-8°C por un máximo de 72 horas.
- 3.1.4.- Si las muestras no se procesan dentro de las 72 horas, se conservan congeladas a -20°C.

3.2.- PROCEDIMIENTO TÉCNICO

- 3.2.1.- Permitir que los reactivos alcancen la temperatura ambiente.
- 3.2.2.- Para cada test se necesitan 4 pocillos de la microplaca, 2 de los cuales se utilizarán para la preparación de la dilución de la muestra. Ver Tabla N°2.
- 3.2.3.- Verificar que los eritrocitos del reactivo antígeno y el reactivo control estén resuspendidos adecuadamente (debe realizarse suavemente).
- 3.2.4.- Distribuir 25 µL de solución diluyente en el pocillo 1, 100 µL en el pocillo 2 y 25 µL en cada uno de los pocillos 3 y 4.
- 3.2.5.- Añadir 25 µL de la muestra en el pocillo 1. Mezclar el contenido del pocillo 1 y transferir 25 µL al pocillo 2. Mezclar y transferir 25 µL del pocillo 2 al pocillo 3, mezclar y desechar 25 µL del pocillo 3. Transferir otros 25 µL del pocillo 2 al pocillo 4, mezclar y desechar 25 µL del pocillo 4.
- 3.2.6.- Añadir 75 µL de reactivo control al pocillo 3 y 75 µL de reactivo antígeno al pocillo
- 3.2.7.- Mezclar el contenido de los pocillos dando ligeros golpes en los lados de la placa.
- 3.2.8.- Cubrir la placa e incubar durante 45- 60 minutos a temperatura ambiente y en lugar libre de vibraciones. Mantener lejos de cualquier fuente de calor.
- 3.2.9.- Leer los resultados en el soporte con espejo de aumento.

Tabla N° 2.

Esquema de realización de las diluciones en prueba de MHA-Tp

Pocillo N°	1	2	3 control	4 prueba
Solución diluyente µL	25	100	25	25
Muestra µl	25			
Mezclar y transferir	25 25	25	25	25
Dilución de la muestra	1:2	1:10	1:20	1:20
Reactivo control µl	-	-	75	-
Reactivo antígeno	-	-	-	75
Dilución final			1:80	1:80






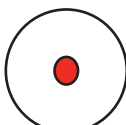
3.3.- LECTURA E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

La lectura e interpretación es realizada de acuerdo a la tabla N° 3.

Las lecturas correspondientes a +/- y 1+ ocurren ocasionalmente, debido al título bajo de anticuerpos o a errores técnicos. A estos sueros se les debe repetir el examen. Si el resultado es el mismo, se deben informar cómo no reactivo o reactivo mínimo respectivamente.

Tabla N°3.

Lectura e Interpretación de resultados de prueba de hemaglutinación.

	4+	Tapiz homogéneo de células aglutinadas que cubre el fondo del pocillo, a veces con bordes irregulares
	3+	Tapiz homogéneo de células aglutinadas que cubre parcialmente el fondo del pocillo
	2+	Tapiz homogéneo de células aglutinadas rodeado por un anillo de eritrocitos
	1+	Tapiz homogéneo de células aglutinadas rodeado por un anillo de eritrocitos. Repetir, si da igual informar R. Si da +/- o - informar NR.
	+/-	Botón de eritrocitos con una pequeña abertura central. Repetir, si da igual o - informar NR.
	-	Botón de eritrocitos con una muy pequeña abertura central o botón totalmente compacto

Interpretación:

Positivo o Reactivo: desde 4+ a 1+

Negativo o No Reactivo: -

Los resultados deben ser informados como Reactivo o No Reactivo, de acuerdo a la interpretación realizada.

4.- CONTROL DE CALIDAD MHA-Tp

Incluir el control positivo y el control negativo en cada serie de muestras teniendo en cuenta que estos controles ya están pre diluidos 1:20. Añadir 25 µL de cada control directamente en los pocillos 3 y 4. No añadir solución diluyente. Enfrentar ambos controles con el Reactivo control y el Reactivo antígeno.

Criterios de aceptabilidad: Cuando los controles positivo y negativo se comportan de acuerdo a lo esperado.

Criterios de rechazo: Si los controles positivo y negativo no se comportan como en la tabla de lectura se rechaza la corrida.

Si no se acepta la corrida, se repite al análisis. Si persiste el rechazo se cambia de lote de kit.

Los sueros positivos que además que presenten reacción positiva con el reactivo control, se deben informar no concluyente. En esta situación se recomienda el envío de la muestra al laboratorio de referencia.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán". "Manual de Técnicas y Procedimientos para el Diagnóstico de Sífilis". Abril 2010.
- 2.- S. A. Larsen, B. M. Steiner, A. H. Rudolph. Laboratory Diagnosis and Interpretation of Test for Syphilis. Clin Microbiol Rev. 1995 Jan; 8(1): 1–21.
- 3.- Instituto de Salud Pública de Chile. "Manual de técnicas para Sífilis". 2009.
- 4.- Centers for Disease Control and Prevention. "Manual of Tests for Syphilis". 9th Edition. Disponible en: <http://www.cdc.gov/std/syphilis/manual-1998/>
- 5.- Circular Ministerial N° 1. "Modifica procedimiento para el tamizaje de Sífilis en servicios de sangre y establece la derivación a otros establecimientos de la red asistencial". Minsal. 02 de Febrero de 2015.
- 6.- Circular Ministerial N° 13. "Regula el uso de técnicas de laboratorio para el apoyo al diagnóstico y seguimiento de sífilis en usuarios/as (no donantes) y establece criterios de organización y registros". Minsal. 23 de Septiembre de 2015.