

## CONTROL DE CALIDAD DE SEROLOGÍA (S-2/03)

En el presente control se remitió a los distintos laboratorios participantes una muestra de suero liofilizado que había sido analizado y valorado para la detección de anticuerpos frente a *Treponema pallidum* por un centro de referencia con experiencia en el diagnóstico serológico, y cuyos resultados fueron los siguientes:

- **Anticuerpos reagínicos (no treponémicos) RPR: Positivo 1/1 [(Biokit® Izasa), ver más adelante].**
- **Anticuerpos específicos (treponémicos):**
  - **FTA-abs (IgG): Positivo (bioMérieux).**
  - **FTA-abs (IgM): Negativo (bioMérieux).**
  - **TPHA (MHA-TP): Positivo (Biokit® Izasa).**
  - **ELISA IgG: Positivo (Dade Behring).**
  - **ELISA IgM: Negativo.**

De acuerdo con la historia que acompañaba al control, la muestra pertenecía a un paciente varón con un perfil sociocultural y conductas de riesgo de enfermedades de transmisión sexual. En el momento del estudio presentaba un cuadro eritematoso en piel y mucosas, sugestivo de una sífilis secundaria. Existían antecedentes de frecuentes lesiones genitales recidivantes, de larga evolución, presumiblemente un herpes genital, si bien unos meses antes de presentar el cuadro actual el paciente presentó una lesión, que él juzgó diferente a las previas. Ante esta situación, el médico que le atiende decide indicar la realización de pruebas serológicas de sífilis y remite la muestra a Microbiología, lo que constituye el objetivo del presente control.

Se solicitó a los participantes la **detección de anticuerpos frente a *T. pallidum*, tanto reagínicos como treponémicos**, estableciéndose prioridades para que la muestra suministrada fuera suficiente, así como formular **sugerencias, comentarios e interpretación** de los resultados obtenidos. En total, fueron 237 los laboratorios participantes, de los que 206 remitieron hojas de respuesta, todas ellas con resultados valorables, lo que supone un porcentaje de participación real del 86,9%.

### ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE DETECCIÓN DE ANTICUERPOS REAGÍNICOS

#### Prueba *rapid plasma reagin* (RPR)

La prueba rápida de detección de anticuerpos reagínicos en plasma (RPR) fue realizada por 186 centros (90,3%) de los 206 que enviaron registros con resultados valorables. Como se observa en la tabla 1, con esta técnica de aglutinación, la mayoría de los participantes (90,3%) obtuvieron un resultado negativo, en principio discordante con el del laboratorio de referencia, pues éste informó un resultado positivo débil. Es posible que los títulos bajos de anticuerpos reagínicos de la muestra, junto con el estrés térmico al que se somete el suero en el proceso de liofilización enmascararan la débil positividad de la muestra, a pesar de que cuando se comprobaron los lotes tras su preparación no se detectó ningún problema. La repetición del análisis una vez transcurrido un tiempo, cuando se estaban analizando los resultados, permitió comprobar que el lote había resultado inestable y que se obtuvieron resultados negativos. Por esa razón, se consideró con válido este resultado negativo, aunque es obvio que el informe aportado por los que detectaron anticuerpos también debía ser aceptado como correcto.

**Tabla 1. Resultados cualitativos de la prueba RPR.**

Resultado	Número	%
Negativo	168	90,3
Positivo débil	15	8,1
Positivo	2	1,1
Indeterminado	1	0,5
Total	186	100,0

Los resultados obtenidos con la titulación de anticuerpos vienen a constatar la concentración crítica de anticuerpos que poseía la muestra originalmente. En total, fueron ocho los centros que con un resultado positivo aportaron dicho dato, siendo el más frecuente 1/1 (cuatro laboratorios); dos participantes obtuvieron un título de 1/2 y, sorprendentemente, otros dos un título de 1/16, éstos con reactivos comerciales diferentes. También hubo un centro que informó el resultado como negativo con un título 1/1.

En cuanto a las marcas comerciales, a pesar de que hubo una gran dispersión, destaca la utilización mayoritaria de Becton-Dickinson con un porcentaje del 26,9%, seguido del equipo de Biokit (Izasa) con un 19,4% y por bioMérieux con un 14,5%. El sistema Biosystems (Atom) es empleado por 14 participantes (7,5%). En 11 ocasiones (5,9%) los participantes no informaron de la marca empleada. Finalmente, cabe comentar que no existe una distribución específica de los resultados cualitativos por marcas comerciales, por lo que no es posible obtener conclusiones acerca de una mayor sensibilidad de uno u otro equipo para detectar títulos bajos de anticuerpos.

#### Prueba VDRL de floculación con antígeno cardiolipina

La prueba de detección de anticuerpos reagínicos mediante una técnica de floculación [*Venereal Diseases Research Laboratory* (VDRL)] fue realizada por 23 laboratorios (11,2%) de los 206 que enviaron hojas de respuesta con resultados valorables. De estos 23 centros, 12 participantes usaron únicamente esta técnica para la detección de

anticuerpos reagínicos y 11 realizaron también una prueba RPR, con un resultado negativo coincidente para los dos métodos, excepto en un caso, en que el VDRL fue positivo y el RPR negativo. De estos datos se infiere que fueron 8 (3,9%) los participantes que no realizaron determinación de anticuerpos reagínicos y directamente emplearon métodos de detección de anticuerpos treponémicos (tabla 2).

**Tabla 2. Pruebas no treponémicas.**

Método	Número	%
RPR	175	85,0
VDRL	12	5,8
RPR + VDRL	11	5,3
No realizan estas pruebas	8	3,9
Total	206	100,0

En cuanto a los datos cualitativos obtenidos con la prueba del VDRL, al igual que en el caso anterior, aparece un claro predominio de los resultados negativos frente a los positivos. Son sólo dos los centros que aportan el valor cuantitativo obtenido en la prueba, con un título 1/1 interpretado como negativo y un valor de 1/8 que no es interpretado. Dado el bajo número de efectivos, no fue posible obtener conclusiones acerca de las marcas comerciales. Cabe destacar la mayor frecuencia en la utilización del equipo de Dade-Behring (siete participantes, 34,8%).

### ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS TREPONÉMICOS

La prueba treponémica más utilizada por los participantes fue la aglutinación (TP-AP), con o sin hemáties, seguida de la técnica fluorescente (FTA-abs) y de los métodos de EIA. De los 142 centros que llevaron a cabo el TPA, en 64 de ellos ésta fue la única prueba treponémica realizada.

#### Pruebas de aglutinación de partículas TP-AP

Este tipo de pruebas fue utilizado por 142 participantes de los 206 centros que remitieron hojas de respuesta con resultados valorables (68,9%). La utilización de formas ambiguas o equívocas de expresión de los resultados en las hojas de respuesta, ha obligado a realizar el análisis en conjunto, sin distinción del tipo de partícula aglutinante. En total, 125 laboratorios (88,0%) dieron un resultado positivo coincidente con el centro de referencia, cuatro (2,8%) informan de un resultado positivo débil y uno (0,7%) un valor indeterminado. Sólo seis centros (4,2%) dan un resultado negativo. Los datos se resumen en la tabla 3.

**Tabla 3. Resultados cualitativos de las pruebas treponémicas de aglutinación.**

	Número	%
Positivo	125	88,0
Negativo	6	4,2
No Interpreta	6	4,2
Positivo débil	4	2,8
Indeterminado	1	0,7
Total	142	100,0

En cuanto a los resultados cuantitativos, fueron 61 de los 142 (43%) que realizan esta prueba, los que especificaron la titulación obtenida. De los que aportan un resultado positivo, son 54 los que informan el título obtenido, que oscila en un intervalo de  $\geq 1/80$  a  $1/2560$  con un valor modal de  $1/160$ . Los seis participantes que no interpretan el resultado aportan valores entre  $1/80$  y  $1/640$  con un valor modal entre  $1/160$  y  $1/320$  y por último hay un único participante que con un resultado negativo aporta también un dato numérico que es inferior a  $1/40$ .

**Tabla 4. Resultados de las pruebas treponémicas de aglutinación (TPA) según marca comercial.**

Marca	Positivo	Negativo	No interpreta	Positivo débil	Indetermin.	Total	
						Número	%
Biokit (Izasa)	27	2	2	–	–	31	21,8
Fujirebio	18	–	3	–	–	21	14,8
No Informa	18	–	1	–	–	19	13,4
Innogenetics	11	–	–	–	–	11	7,7
Dade-Behring	9	–	–	–	–	9	6,3
Biosystems (Atom)	6	1	–	–	–	7	4,9
bioMérieux	5	1	–	1	–	7	4,9
Oxoid	6	1	–	–	–	7	4,9
Abbott	5	–	–	–	–	5	3,6
Randox	4	–	–	–	–	4	2,8
Otros	16	1	–	3	1	21	14,8
Total	125	6	6	4	1	142	100,0

Como se observa en la tabla 4, existe una gran diversidad de marcas comerciales empleadas por los distintos laboratorios. A simple vista no se observa una relación estadísticamente significativa entre una/s determinada/s marca/s y un resultado negativo no coincidente con el del laboratorio de referencia, ya que el número de resultados erróneos es muy bajo. Biokit®-Izasa (hematíes sensibilizados, TPHA) y Fujirebio (aglutinación de partículas de gelatina) fueron las marcas mayoritariamente empleadas por los participantes, con porcentajes de 21,8% y 14,8%, respectivamente. Llama la atención que un porcentaje no desdeñable de centros (13,4%) no informa sobre el equipo empleado. En el apartado de “otros” se incluyen equipos que han sido utilizados por un máximo de tres laboratorios..

### Prueba FTA-abs

Por lo que se refiere a la prueba FTA-Abs, fueron 75 centros los que realizaron esta determinación de los 206 que remitieron hoja de respuesta, lo que supone un porcentaje del 36,4%, significativamente inferior al número de centros que realizan una prueba de TPA. En cuanto a los valores cualitativos, la prueba fue informada como positiva por la mayoría de los centros que la realizaron, coincidiendo así con el laboratorio de referencia. Tan sólo cuatro participantes (5,3%) la consideran negativa. Estos datos se reflejan en la tabla 5.

**Tabla 5. Resultados cualitativos de la prueba treponémica FTA-abs.**

	Número	%
Positivo	66	88,1
Positivo débil	4	5,3
Negativo	4	5,3
No interpreta	1	1,3
Total	75	100,0

La titulación de anticuerpos fue informada por muy pocos centros, siendo tan sólo 9 participantes (12,0%) de los 75 que llevan a cabo esta detección, los que aportan estos datos cuantitativos. Siete de estos centros, dan un resultado positivo con títulos que oscilan entre 1/5 y 1/100 con un valor modal de 1/80. Uno de los centros que informa la prueba como negativa aporta un título <1/10 y finalmente el que no interpreta el resultado da un valor de 1/320.

Con respecto a las marcas comerciales empleadas, se observa una menor variabilidad que en el caso anterior, pues la gran mayoría de participantes (68,0%) emplearon los reactivos de bioMérieux. Cabe destacar el hecho de que un número considerable de laboratorios (20,1%) no informan de la marca comercial empleada, lo que quizá pueda explicarse por el número de participantes que derivan la muestra a un centro de referencia. Tampoco en esta ocasión podemos deducir una relación significativa entre una marca comercial determinada y la obtención de falsos negativos, puesto que los resultados discrepantes son escasos y su distribución heterogénea (tabla 6).

**Tabla 6. Resultados de la prueba FTA-abs según la marca comercial utilizada.**

Marca	Positivo	Positivo débil	Negativo	No interpreta	Total	
					Número	%
bioMérieux	44	3	3	1	51	68,0
No Informa	14	1	–	–	15	20,1
MarDx	3	–	–	–	3	4,1
Biotech	2	–	–	–	2	2,6
Otros	3	–	1	–	4	5,3
Total	66	4	4	1	75	100,0

Finalmente, fueron sólo seis participantes los que realizaron la prueba de detección de anticuerpos IgM por inmunofluorescencia (FTAM-abs), lo que supone un porcentaje del 2,9%. En total, cinco de ellos obtienen un resultado negativo, que se corresponden con los que detectan anticuerpos totales en la prueba convencional FTA-abs. El único centro que informó la prueba FATM-abs como positiva no realizó la de anticuerpos totales. Respecto a las marcas comerciales, no es posible obtener información relevante, dado el bajo número de participantes, salvo que los reactivos de bioMérieux son los más frecuentemente utilizados.

### Detección por métodos de enzimoanálisis

La prueba de detección de anticuerpos totales (IgG e IgM) por enzimoanálisis es llevada a cabo por 21 laboratorios (10,2%) de los 206 que remiten hoja de respuesta. Como cabría esperar, aportaron mayoritariamente (90,4%) un resultado positivo, de forma que tan sólo uno informó un valor negativo y otro un valor indeterminado. En cuanto a las marcas comerciales empleadas, existe cierta variedad, aunque la más empleada fue Mercia (12 participantes, el 57,1), que fue con la que se obtuvieron los dos resultados discrepantes. Tres participantes utilizaron reactivos de Dade Behring y dos de bioMérieux. El resto utiliza una miscelánea de marcas representadas por un único participante.

La determinación inmunoenzimática de los anticuerpos de la clase IgG fue realizada por 44 laboratorios de los 206 que remitieron hoja de respuesta (21,4%) Uno de los laboratorios hizo dos detecciones de anticuerpos mediante equipos de casas comerciales distintas, por lo que en realidad se llevaron a cabo 45 determinaciones. Como se puede

observar en la figura 1 y la tabla 7, la mayoría de los laboratorios obtuvieron un resultado positivo coincidente con el de referencia. Tan sólo dos centros aportaron un resultado indeterminado (4,4%) y cuatro un resultado negativo (8,9%).

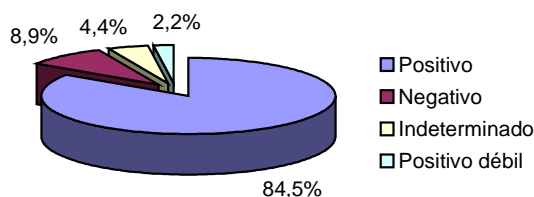


Figura 1. Distribución de resultados de la prueba de ELISA IgG

Tabla 7. Detección de anticuerpos de la clase IgG por EIA.

	Número	%
Positivo	38	84,4
Negativo	4	8,9
Indeterminado	2	4,4
Positivo débil	1	2,2
Total	45	100,0

En la tabla 8 se resumen los distintos métodos que refieren los participantes y los resultados obtenidos con estos. Como es lógico existe un predominio claro del EIA, con una participación del 80,0% (EIA y EIA de captura). Hay cuatro laboratorios que emplean variantes automatizadas de estas técnicas como son el enzimoimmunoensayo en bandas y la inmunoquimioluminiscencia con porcentajes del 4,4% cada uno de ellos.

Tabla 8. Resultados de la prueba de detección de anticuerpos IgG frente a *T. pallidum* según método empleado.

Método <sup>a</sup>	Positivo	Negativo	Indeterminado	Positivo débil	Total	
					Número	%
EIA	29	3	1	1	34	75,6
EIA captura	2	–	–	–	2	4,4
IQL	2	–	–	–	2	4,4
LIA	2	–	–	–	2	4,4
No consta	3	1	1	–	5	11,1
Total	38	4	2	1	45	100,0

<sup>a</sup>Abreviaturas. IQL: Inmunoquimioluminiscencia; LIA: Inmunoensayo en bandas.

Los resultados obtenidos con las diferentes marcas comerciales se resumen en la tabla 9. Una gran parte de los participantes que realizan estas pruebas (24,5%) no especifican la marca comercial empleada lo que podría explicarse en parte por el hecho de que algunos de estos resultados son datos obtenidos de laboratorios externos de referencia. Existe cierta variedad en lo que a casas comerciales se refiere, aunque la marca más frecuentemente empleada es Biotech, seguida de Innogenetics con un 24,5% y 11,2% respectivamente. Tampoco en esta ocasión se ve un predominio claro de resultados erróneos que coincidan con los reactivos de una determinada casa comercial. Tres de los cuatro resultados falsamente negativos se obtuvieron, respectivamente, con Biotech, Innogenetics, Adaltis (englobada en “otros”), y un cuarto participante no informó de este dato. Otro laboratorio que utilizó Adaltis obtuvo un valor indeterminado, con lo que ninguno de los dos usuarios de esta marca coincidió con el resultado de referencia.

Tabla 9. Marcas utilizadas en la detección de anticuerpos IgG frente a *T. pallidum*.

Marca	Positivo	Negativo	Indeterminado	Positivo débil	Total	
					Número	%
Biotech	9	1	–	1	11	24,4
Innogenetics	4	1	–	–	5	11,2
Mercia	4	–	–	–	4	8,9
Dade-Behring	4	–	–	–	4	8,9
Otros	8	1	1	–	10	22,2
No informa	9	1	1	–	11	24,4
Total	38	4	2	1	45	100,0

La determinación de anticuerpos de tipo IgM frente a *T. pallidum* es realizada por 45 laboratorios (21,8%), de los cuales 31 también realizaron la prueba de detección de anticuerpos de tipo IgG. Salvo las excepciones que se comentan a continuación, todos los resultados fueron informados como negativos, coincidiendo con el laboratorio de

referencia para este control. Las excepciones se refieren a un resultado indeterminado y cuatro positivos que fueron obtenidos por técnicas de EIA e Inmunoquimioluminiscencia. Como en el caso anterior, aparte del enzimoimmunoanálisis clásico y el de captura, algunos centros de forma minoritaria emplearon técnicas de *immunoblot* e inmunoquimioluminiscencia. Estos datos quedan reflejados en la tabla 13.

**Tabla 10. Métodos y resultados de la prueba IgM frente a *T. pallidum*.**

Método <sup>a</sup>	Negativo	Positivo	Indeterminado	Total	
				Número	%
EIA	28	3	1	32	71,1
EIA captura	8	–	–	8	17,8
IQL <sup>a</sup>	–	1	–	1	2,2
IB <sup>b</sup>	1	–	–	1	2,2
No consta	3	–	–	3	6,7
Total	40	4	1	45	100,0

<sup>a</sup>Abreviaturas. IQL: inmunoquimioluminiscencia; IB: *immunoblot*.

Por lo que respecta a las marcas comerciales (tabla 11), existe un amplio predominio de los reactivos de Mercia con un 31,2% seguido con bastante diferencia por Euroinmun® (Clonagen) con un 6,7%. De nuevo, hay un elevado porcentaje de participantes (31,2%) que no informan acerca de la marca comercial empleada, lo que puede explicarse por las razones ya apuntadas anteriormente. Dado el escaso número de falsos positivos no se pueden obtener conclusiones claras, si bien se observa la concurrencia de resultados discrepantes en la marca Microgen.

**Tabla 11. Marcas y resultados de la prueba IgM anti-*T. pallidum*.**

Marca	Negativo	Positivo	Indeterm.	Total	
				Número	%
Mercia	12	1	1	14	31,2
Euroinmun (Clonagen)	3	–	–	3	6,7
Innogenetics	3	–	–	3	6,7
Adaltis	2	–	–	2	4,4
Biotech	2	–	–	2	4,4
Microgen Bioproducts	–	2	–	2	4,4
Otros	5	–	–	5	11,0
No Informa	13	1	–	14	31,2
Total	40	4	1	45	100,0

## USO DE LABORATORIO EXTERNO

Por lo que se refiere a la utilización del laboratorio de referencia, de los 206 laboratorios que enviaron hoja de respuesta, 154 (74,8%) señalan que no lo utilizan, siete centros (3,4%) afirma requerirlo y 20 (9,7%) sólo parcialmente. Un número considerable, 25 participantes (12,1%), no aporta información alguna sobre este dato, por lo que desde el Control de Calidad se insiste en que se consignen todos aquellos datos que son requeridos en las hojas de respuesta para que se pueda hacer un análisis lo más fidedigno posible de los datos. En general, se puede concluir que la mayor parte de los laboratorios participantes son capaces de realizar al menos dos pruebas fundamentales para este control (detección de anticuerpos reagínicos y algún método de detección de anticuerpos treponémicos), aunque en menor medida cuentan con estas últimas. A este respecto, ninguno de los participantes que remitió la hoja de respuesta comentó que no se realizaban ninguna de estas determinaciones en su laboratorio.

## COMENTARIOS

En total son 91 (44,2%) los laboratorios participantes que realizan algún tipo de comentario, haciendo referencia a distintos aspectos del control de calidad. Cabe destacar los 30 centros que, de forma explícita y a la vista de la historia remitida y los resultados obtenidos, considera la existencia de unas manifestaciones clínicas clara de sífilis secundaria. Sin embargo, en 22 ocasiones se remarca que se trata de un cuadro clínico de sífilis secundaria discordante con los hallazgos serológicos, a lo que ocho de estos 22 centros, añaden la ausencia de un fenómeno de prozona. Varios de estos laboratorios indican la conveniencia de hacer un seguimiento serológico a las dos o tres semanas, y alguno también apunta la necesidad de descartar tratamientos previos con penicilina. Por otra parte hay otros nueve participantes que hablan de sífilis secundaria sin hacer este tipo de anotaciones y otros tres que se atreven sólo a proponer esta posibilidad, incluso afirmando que podría tratarse de un período inicial.

Uno de los comentarios más frecuentes es la discordancia entre clínica y serología, dada la negatividad (para la mayoría de los participantes) del RPR. Ciertamente, esto es así en la mayor parte de ocasiones, y la explicación real ha sido la pérdida de reactividad de una muestra, ya de por sí con una concentración muy baja de anticuerpos durante el proceso de manufactura del control, como ya se ha aludido antes. Sin embargo, desde el Control de Calidad se considera importante aportar el dato de que realmente existe un porcentaje de pacientes que presentan en estas circunstancias clínicas un RPR negativo y que, además, este puede ser negativo o presentar una débil positividad en estadios iniciales de esta fase clínica. Siguiendo en esta línea, hay cuatro participantes que reflejan en los comentarios la impresión de que se trata de una sífilis primaria, nueve centros dicen que se trata de una sífilis pasada y tres informarían de una sífilis latente precoz.