

Artículo Original/ Original Article

[10.18004/mem.iics/1812-9528/2023.e21122306](https://doi.org/10.18004/mem.iics/1812-9528/2023.e21122306)

Evaluación de un prototipo de ensayo de aglutinación látex-estreptavidina-tp17 para detección de anticuerpos anti-*Treponema pallidum*

Arianna Sanabria¹ , Cecilia González² , Ivalena de Guillén¹ , Laura Aria-Zaya¹ , Alejandra Rojas¹ , Cynthia Bernal¹ , María Eugenia Acosta-de Hetter¹ 

¹Universidad Nacional de Asunción, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Departamento de Producción, San Lorenzo Paraguay

²Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Químicas. San Lorenzo, Paraguay

Cómo referenciar este artículo/
How to reference this article:

Sanabria A, González C, de Guillén I, Aria-Zaya L, Rojas A, Bernal C, Acosta de Hetter ME. Evaluación de un prototipo de ensayo de aglutinación látex-estreptavidina-tp17 para detección de anticuerpos anti-*Treponema pallidum*. Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud. 2023; 21(1): e21122306.

RESUMEN

La sífilis es una infección bacteriana causada por *Treponema pallidum*. El diagnóstico se basa en las características clínicas y en pruebas laboratoriales serológicas indirectas. El objetivo fue evaluar un prototipo de ensayo de aglutinación de látex-estreptavidina-Tp17 para detección de anticuerpos anti-*T. pallidum*. Se estandarizaron las condiciones óptimas de un prototipo de ensayo de aglutinación basado en la unión estreptavidina-biotina sobre soporte de látex con la proteína recombinante Tp17. Se analizó la concordancia del ensayo con otras pruebas comerciales para determinar su utilidad como alternativa en el diagnóstico de sífilis. Se lograron obtener las condiciones óptimas de preparación del reactivo y se demostró la estabilidad del mismo hasta los 90 días conservado a 4°C. En cuanto a la concordancia entre el prototipo y otras pruebas comerciales, se analizaron 56 muestras con la prueba de VDRL y se obtuvo un índice kappa de 0,48 IC95% (0,24-0,73) indicando una fuerza de concordancia moderada. Por otro lado, 44 muestras fueron previamente evaluadas por quimioluminiscencia (CLIA), siendo el índice kappa calculado 0,81 IC95% (0,55-1) representando una fuerza de concordancia casi perfecta entre los métodos. Adicionalmente se determinaron la sensibilidad y la especificidad teniendo como referencia a la prueba de CLIA debido a la similitud en la utilización del antígeno Tp17 en ambos métodos, brindando un resultado de 94,87% y 100% respectivamente. Estos resultados plantean obtener una evaluación de la performance orientada a una posible aplicación en la población general.

Palabras clave: Aglutinación, concordancia, proteína recombinante, sífilis.

Evaluation of a latex-streptavidin-tp17 agglutination assay prototype for detection of anti-*Treponema pallidum* antibodies

ABSTRACT

Syphilis is a bacterial infection caused by *Treponema pallidum*. Diagnosis is based on clinical features and indirect serological laboratory tests. The objective was to evaluate a latex-streptavidin-Tp17 agglutination assay prototype for the detection

Fecha de recepción: 11 de octubre de 2022. **Fecha de aceptación:** 04 de mayo de 2023

***Autor correspondiente:** María Eugenia Acosta de Hetter. Universidad Nacional de Asunción, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Departamento de Producción, San Lorenzo Paraguay
Email: maruhetter@yahoo.com.mx



of anti-*T. pallidum* antibodies. The optimal conditions of a agglutination assay prototype based on streptavidin-coated polystyrene latex particles and a biotinylated Tp17 were standardized. The concordance of the assay with other commercial tests was analyzed to determine its usefulness as an alternative in the diagnosis of syphilis. The optimal conditions for the reagents preparation were obtained and the reagent stability was demonstrated for up to 90 days stored at 4°C. Regarding the concordance between the prototype and other commercial tests, 56 samples were analyzed with the VDRL test and a kappa index of 0.48 CI_{95%} (0.24-0.73) was obtained, indicating a moderate agreement. Also, 44 samples, previously evaluated by chemiluminescence (CLIA), were evaluated with the assay, and a kappa index of 0.81 CI_{95%} (0.55-1) was obtained demonstrating an almost perfect strength of agreement. Additionally, sensitivity and specificity were determined using the CLIA method as reference due to the similarity in the use of the Tp17 antigen in both methods, and 94.87% and 100% were obtained respectively. These results suggest further evaluation of the assay performance oriented to a possible application in the general population.

Keywords: Agglutination, concordance, recombinant protein, syphilis.

INTRODUCCIÓN

La sífilis es una infección bacteriana causada por *Treponema pallidum*, agente patológico que se transmite mayoritariamente por contacto sexual a través de ulceraciones presentes en los genitales, mediante transmisión vertical de la madre al feto durante el embarazo y en menor medida a través de transfusiones sanguíneas. En Paraguay se ha documentado un aumento en la tasa de incidencia, de 21 por cada 100.000 habitantes en el 2015 a 46 por cada 100.000 habitantes en el 2018, afectando principalmente a embarazadas con una prevalencia del 3%, y a grupos vulnerables por prácticas de riesgo con una prevalencia del 5,2 al 5,6%⁽¹⁻⁴⁾.

Este microorganismo, posee lipoproteínas que cumplen la función de mediadores proinflamatorios, por ende, activan a células del sistema inmune. Pueden citarse como ejemplos la Tp17, Tp15 y Tp47. La Tp17 está presente en la membrana de *T. pallidum*, posee función de citoadhesina y una estructura de barril β conformada por 8 láminas; tiene la capacidad de unirse a distintos ligandos presentes en el hospedador como la biotina o el retinol. Es considerada una de las proteínas más inmunogénicas implicadas en la transmisión natural de la sífilis⁽⁵⁻⁷⁾.

El diagnóstico de la sífilis se basa en las características clínicas del paciente y en pruebas laboratoriales basadas en métodos directos e indirectos. No se recurre al cultivo de la bacteria, debido a la imposibilidad del microorganismo para crecer en medios acelulares. Los métodos directos se basan en la búsqueda de *T. pallidum* en lesiones, adenopatías, o LCR (líquido cefalorraquídeo) y se realizan mediante observación directa por microscopía de campo oscuro o a través de la detección del genoma por PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Por otro lado, los métodos indirectos se basan en la búsqueda de anticuerpos en suero o plasma del paciente y se clasifican en pruebas treponémicas y no treponémicas. Las pruebas no treponémicas detectan anticuerpos generados en respuesta al daño celular generado por *T. pallidum*, ejemplos de estas pruebas son la VDRL (*Venereal Disease Research Laboratory*) y la RPR (*Rapid Plasma Reagin*). Las pruebas treponémicas incluyen TP-PA (*Treponema pallidum-particle agglutination*), TPHA (*Treponema pallidum Haemagglutination*), FTA-ABS (*Fluorescent Treponemal Antibody-Absorption*), Inmunoblot, ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) y CLIA (*Chemiluminescence immunoassay*) y son específicas para la detección de anticuerpos generados contra *T. pallidum*⁽⁸⁻¹¹⁾.

Diversas pruebas treponémicas se valen de la utilización de proteínas recombinantes, debido a que las lipoproteínas de membrana de *T. pallidum* inducen una respuesta inmune fuerte, como es el caso de la Tp17, la misma tiene la capacidad de aumentar la expresión de moléculas de adhesión, inducir la actividad quimiotáctica de células THP-1 y aumentar la producción de TNF-α por parte de los macrófagos⁽¹⁰⁻¹⁶⁾.

En este contexto, se propuso el diseño y desarrollo de un prototipo de prueba treponémica, basada en la técnica de aglutinación sobre soporte de látex recubierto con estreptavidina; por lo tanto, el objetivo general de este trabajo fue evaluar un prototipo treponémico de ensayo de aglutinación para detección de anticuerpos anti-*Treponema pallidum*, estandarizando las condiciones óptimas de la preparación del reactivo así como la aplicación del mismo y determinando la concordancia entre el prototipo con una prueba no treponémica y una prueba treponémica.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo fue dividido en dos etapas; la primera consistió en el desarrollo del reactivo para el ensayo de aglutinación látex-estreptavidina-tp17, para lo cual se utilizó la proteína recombinante Tp17 expresada a partir de un cultivo de *Escherichia coli* BL21 pET22bTp17-His y purificada por cromatografía de afinidad de níquel, evaluando su funcionalidad por medio de un ELISA sensibilizando con 100 ng por pocillo, analizando con 2 muestras positivas y negativas para anticuerpos de tipo IgG anti *Treponema pallidum*. El siguiente paso fue la biotilación utilizando dos protocolos distintos^(16,17) y verificándolos por ensayos de ELISA indirectos con placas recubiertas con estreptavidina. Por último, se sensibilizaron las micropartículas de látex recubiertas con estreptavidina de 0,5 µm de diámetro con la Tp17 biotilada, probando soluciones del látex al 5 y 10%.

Para la prueba de funcionalidad se utilizaron muestras positivas y negativas y se determinaron las condiciones óptimas del prototipo diseñado en base a él volumen, tiempo y condiciones de muestras utilizadas en la reacción. Se estudió la estabilidad del reactivo de látex optimizado a los 30,60 y 90 días posteriores a la elaboración.

En una segunda etapa se analizó la concordancia con otras pruebas comerciales disponibles para el diagnóstico de sífilis, utilizándose muestras de suero y plasma obtenidas de la Seroteca del Departamento de Producción del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud – Universidad Nacional de Asunción (IICS-UNA) previamente codificadas y conservadas a -20°C entre los años 2020-2021; 44 evaluadas por quimioluminiscencia (CLIA) y 56 analizadas con la prueba de VDRL.

Se aplicó la estadística descriptiva. Se calcularon medidas de tendencia central: media y desvío estándar para las condiciones óptimas de reacción. Se analizó la frecuencia de resultados positivos y negativos de cada prueba aplicada, y se calculó la fuerza de concordancia entre métodos (VDRL versus Ensayo de aglutinación, CLIA versus Ensayo de aglutinación) por medio del índice kappa de Landis y Koch⁽¹⁴⁾, mediante el estadístico Z con un nivel de significancia menor a 0,05. Adicionalmente se determinó la sensibilidad y especificidad del prototipo con respecto a CLIA. El análisis se realizó mediante el programa estadístico EPIDAT 3.1 y 4.2.

El protocolo de este trabajo fue evaluado por el Comité de Ética en la Investigación de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Asunción, con dictamen 810/21. Además, cuenta con la aceptación del Comité Científico y Comité de Ética en Investigación del IICS-UNA bajo el código P24/21.

RESULTADOS

La proteína recombinante Tp17 presentó la funcionalidad antigénica esperada ante muestras positivas y negativas (Figura 1).

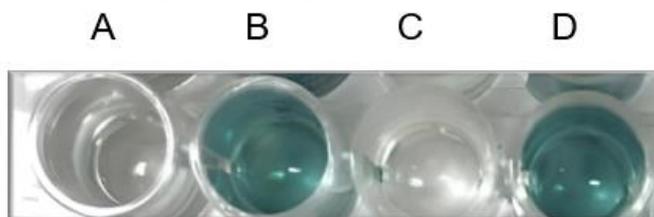


Figura 1. Resultados obtenidos mediante sensibilización de microplacas de Elisa con Tp17 recombinante purificada. A) y C) Reacción obtenida mediante la no interacción de proteína recombinante Tp17 y anticuerpos ausentes en muestras negativas. B) y D) Reacción obtenida mediante interacción de proteína recombinante Tp17 y anticuerpos presentes en muestras positivas.

En cuanto a la biotinilación de la proteína Tp17 el protocolo con relación de moles Proteína: Biotina 1:30, brindó una reacción de coloración más alta mediante la lectura de absorbancia. (Figura 2).

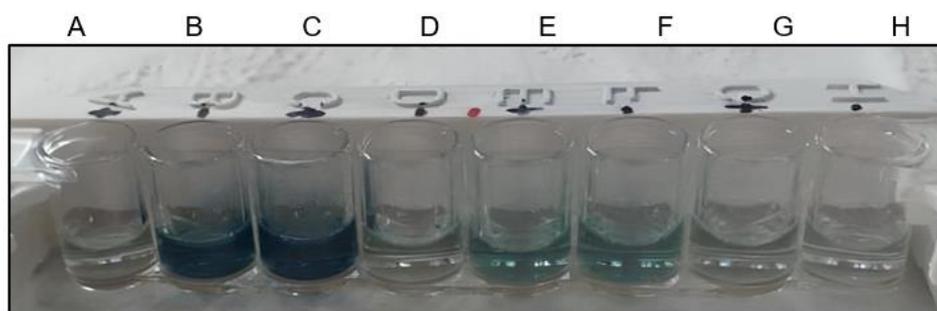


Figura 2. Resultados obtenidos mediante sensibilización de microplacas de titulación de ELISA recubiertas con estreptavidina, con Tp17 biotinilada mediante protocolo con relación Tp17: Biotina 1:30 y protocolo relación Tp17: Biotina 1:500. A) y H) Control negativo de PBS. B) y C) Reacción de Tp17 biotinilada mediante protocolo 1:30 adherida a pocillo con estreptavidina, con muestras positivas. D) Reacción de Tp17 biotinilada mediante protocolo 1:30 adherida a pocillo con estreptavidina, con muestra negativa. E) y F) Reacción de Tp17 biotinilada mediante protocolo 1:500 adherida a pocillo con estreptavidina, con muestras positivas. G) Reacción de Tp17 biotinilada mediante protocolo 1:500 adherida a pocillo con estreptavidina, con muestra negativa.

En cuanto la sensibilización de las soluciones del látex al 5 y 10%, se observó mejor definición de la aglutinación con la dilución del látex al 10%. En la Tabla 1, se presenta un resumen de las condiciones finales de la preparación del reactivo de látex-estreptavidina-Tp17.

Tabla 1. Resumen de las condiciones finales de la preparación del reactivo de látex-estreptavidina-Tp17.

| Procedimiento | Resultados |
|--------------------------------------|--|
| Biotinilación de Tp17 | Relación de moles Tp17:Biotina= 1:30 |
| Conjugación | |
| - % de Látex | Dilución de microesferas de látex recubiertas con estreptavidina al 10% |
| - Tp-Biotinilada | Volúmenes iguales de Tp17 biotinilada y dilución al 10% de microesferas de látex recubiertas con estreptavidina al 10% |
| Condiciones de almacenamiento | Refrigeración a 4°C |

Respecto a las condiciones de las muestras para la reacción de aglutinación, el suero y plasma brindaron indistintamente buenos resultados, excepto si las mismas presentaban aspecto lipémico. La inactivación de las muestras a 56°C por 30 minutos brindó resultados definidos en cuanto a la observación de la aglutinación de muestras positivas y la no aglutinación de muestras negativas.

En cuanto al volumen, la proporción que brindó mejores resultados fue la proporción Muestra: Reactivo 2:1.

El tiempo de reacción promedio hallado para una lectura confiable fue de aproximadamente 3 minutos.

Las pruebas de estabilidad a los 30, 60 y 90 días con muestras seleccionadas al azar, arrojaron los resultados expresados en la Figura 3, donde se demuestra que la estabilidad fue conservada durante estos 3 periodos.



Izquierda: Muestra positiva, Derecha: Muestra negativa.

Figura 3: Prueba de Estabilidad del Reactivo de látex-estreptavidina-Tp17 a los 30, 60 y 90 días posteriores a su preparación.

En la segunda etapa del estudio se obtuvo la concordancia entre la prueba de aglutinación (prototipo) y la VDRL, brindó un valor de 0,48 IC_{95%} (0,2375-0,7271), representando este valor una fuerza de concordancia moderada según la valoración del índice kappa de Landis y Koch. La determinación de concordancia entre la prueba de aglutinación y CLIA, brindó un valor de 0,81 IC_{95%} (0,5525-1,000), lo cual indica una fuerza de concordancia casi perfecta. Adicionalmente se determinaron la sensibilidad y la especificidad teniendo como referencia a la prueba de CLIA, brindando un resultado de 94,87% y 100% respectivamente.

DISCUSIÓN

Este trabajo se propuso el objetivo general de evaluar un prototipo de ensayo de aglutinación de látex-estreptavidina-Tp17 para detección de anticuerpos anti-*Treponema pallidum*, el cual se logró mediante la realización de diferentes pruebas y ensayos. La utilización del antígeno Tp17 como agente sensibilizante para detección de anticuerpos específicos generados en respuesta a infecciones por *T. pallidum*, brinda un resultado congruente con lo demostrado por otros autores, los cuales aseguran que es una proteína que en contacto con suero de pacientes infectados demuestra elevada y persistente reactividad incluso post tratamiento⁽¹⁵⁾.

Se analizaron dos protocolos de biotilación^(16,17). Uno de los protocolos brindó una proporción molar Tp17:Biotina 1:30, mientras que el otro protocolo una proporción molar de 1:500. Los mejores resultados se obtuvieron con la proporción 1:30, la cual respeta la regla sugerida por Kay *et al.*, la cual indica que para muestras de proteína con concentraciones menores o iguales a 2 mg/mL, se debe agregar un exceso molar de biotina mayor o igual a 20 veces la cantidad de proteína presente⁽¹⁸⁾. Además, cabe destacar que el protocolo 1:30 estaba diseñado para la biotilación de proteínas virales, cuyo tamaño molecular es pequeño, mientras que el protocolo 1:500 estaba dirigido a la biotilación de anticuerpos, los cuales poseen mayor tamaño molecular. Para la conjugación o sensibilización de las micropartículas de látex recubiertas con estreptavidina, con la Tp17 biotilada, se probaron dos concentraciones distintas del látex, al 5 y 10%, de las cuales la segunda concentración mencionada brindó resultados macroscópicamente más definidos en cuanto a la aglutinación de muestras positivas. Cabe destacar que la sensibilización propuesta por Shekarchi *et al.* utilizó una concentración de látex al 5%, teniendo las micropartículas de látex un diámetro de 0,6 a 0,9 μm ; mientras que las micropartículas utilizadas en este ensayo tenían un diámetro de 0,5 μm . De por sí, al disminuir el tamaño de la micropartícula la superficie de contacto sería mayor y aumentando la concentración del látex al 10%, es de esperarse que la Tp17 biotilada recubra eficientemente todos los puntos de contacto de las macropartículas recubiertas con estreptavidina, brindando de este modo la posibilidad de formar una mayor cantidad de conglomerados inmunes al entrar en contacto con muestras positivas^(19,20).

Las muestras de suero y plasma brindaron indistintamente buenos resultados, excepto si las mismas presentaban aspecto ligeramente lipémico. Esto debido a que la presencia de lipoproteínas puede interferir con la reacción antígeno-anticuerpo, bloqueando los sitios de unión de anticuerpos, lo que puede causar resultados

falsos positivos o falsos negativos. Esto sugeriría que las muestras adecuadas para el ensayo serían muestras de pacientes en ayunas, o como alternativa según Schiettecatte *et al.*, realizar una ultracentrifugación de muestras lipémicas o tratamiento previo con lipasas^(21,22). La inactivación de las muestras a 56°C por 30 minutos brindó resultados definidos en cuanto a la observación macroscópica de la aglutinación de muestras positivas y la no aglutinación de muestras negativas, cuyos resultados estaban validados por la prueba de CLIA. Si bien la inactivación térmica podría llegar a producir falsos negativos debido a la inducción de agregados de proteínas séricas compuestas por IgA, IgM, IgG y albúmina; algunas pruebas diagnósticas proponen este tipo de inactivación, ya que, ante la presencia de un test de elevada sensibilidad, puede no verse afectada la reacción antígeno-anticuerpo ante estas agregaciones proteicas^(23,24). Hu *et al.*, reportaron un aumento en el índice de IgM e IgG anti-SARS-CoV-2 en suero, tras previa inactivación térmica y posterior detección a través de un ELISA. Este tratamiento también podría inactivar el sistema del complemento, lo que podría evitar reacciones no específicas y disminuir el fondo en los ensayos inmunológicos^(24,25). El tiempo de reacción seleccionado para una lectura confiable fue de 3 minutos. Algunos trabajos proponen un tiempo máximo de lectura de 5 minutos, debido a que pasado este tiempo las muestras positivas podrían seguir brindando una aglutinación constante, sin embargo, las negativas podrían dar una señal inespecífica haciendo que no se pueda discriminar un resultado y posibilitando la lectura de falsos positivos⁽²⁶⁾. En el presente trabajo, además de la señal inespecífica observada con algunas muestras negativas, pasados los 3 minutos también se observó sequedad de la reacción. La estabilidad del reactivo fue analizada hasta los 90 días posteriores a su elaboración. Luego de este periodo sería interesante seguir estudiando su reactividad en el tiempo, ya que estudios anteriores reportan incluso una estabilidad de 9 meses en este tipo de micropartículas sensibilizadas por afinidad⁽¹⁶⁾.

Respecto a la concordancia del prototipo de ensayo de aglutinación propuesto y otras pruebas realizadas para el diagnóstico de sífilis, se tuvieron en cuenta la prueba de VDRL y la prueba de CLIA. La determinación de concordancia entre el ensayo de aglutinación y la VDRL a través del índice kappa, brindó un valor de 0,48 (IC=95%, 0,2375-0,7271) el cual indica una fuerza de concordancia moderada entre estos métodos. Este resultado es de esperarse debido a que los fundamentos de las pruebas son distintos. La VDRL es una prueba no treponémica basada en la detección de anticuerpos denominados "reaginas" presentes en individuos infectados por *T. pallidum*. Si la muestra contiene reaginas, estas reaccionarán con una suspensión de antígenos de cardiolipina y lecitina purificados, produciéndose una floculación visible al microscopio; si bien esta prueba es reactiva en las primeras fases de la enfermedad haciéndola sumamente sensible, puede negativizarse cuando esta avanza o cuando ha sido tratada bajo antibioticoterapia, además pueden presentarse falsos positivos ante enfermedades autoinmunes o bien en enfermedades que involucran destrucción tisular, siendo necesaria la confirmación con pruebas treponémicas, las cuales se caracterizan por su elevada especificidad^(11,27). El prototipo de ensayo de aglutinación de látex-estreptavidina-Tp17 se fundamenta en la detección de anticuerpos anti-Tp17, al ser la Tp17 un antígeno específico de *T. pallidum* se propone que esta prueba sería clasificada como treponémica. Este tipo de prueba confirma la infección, ya sea reciente o pasada, generalmente una vez que se positivizan permanecen así de por vida, incluso si el paciente fue tratado^(11,28).

Por otro lado, la determinación de concordancia entre el ensayo de aglutinación y CLIA a través del índice kappa, brindó un valor de 0,81 (IC=95%, 0,5525-1,000), lo cual indica una fuerza de concordancia casi perfecta entre estos métodos. Este resultado es congruente con los fundamentos de ambos métodos. Ambas pruebas son de tipo treponémico, utilizan micropartículas sensibilizadas con antígenos recombinantes específicos de *T. pallidum*, y están orientadas a la detección de IgM e IgG específicas generadas durante la infección. No obstante, cabe resaltar que el método de CLIA utiliza tres antígenos recombinantes (Tp47, Tp15 y Tp17), además

de ser un inmunoanálisis de dos pasos automatizado, por lo que presenta una elevada sensibilidad y especificidad⁽²⁹⁾.

Adicionalmente se realizó el cálculo de sensibilidad y especificidad del prototipo de ensayo de aglutinación látex-estreptavidina-Tp17 con respecto a CLIA, obteniéndose una sensibilidad de 94,87% (IC=95%, 86,67-100,00) y una especificidad del 100% (IC=95%, 90,00-100,00). El valor de sensibilidad obtenido podría mejorarse sensibilizando a las micropartículas de látex con distintos antígenos recombinantes, y no utilizarse solo uno, ya que la tasa de positividad de inmunoglobulinas específicas para cada antígeno de *T. pallidum* puede aumentar o disminuir según la fase de la enfermedad⁽⁶⁾. Si bien el valor de especificidad fue del 100%, sería interesante ampliar el tamaño muestral y poder caracterizar a las muestras clínica y epidemiológicamente.

La concordancia entre el prototipo de ensayo de aglutinación y la prueba no treponémica VDRL fue moderada, por otro lado, la concordancia entre el prototipo de ensayo de aglutinación y la prueba treponémica de CLIA fue casi perfecta.

Los excelentes resultados de sensibilidad y especificidad con respecto a CLIA nos llevan a plantear como perspectivas el empleo del reactivo con un mayor número de muestras y comparar los resultados con un patrón de referencia, para poder obtener una evaluación de la performance orientada a una posible aplicación en la población general.

Contribución de autores: Arianna Sanabria y María Eugenia Acosta: conceptualización, diseñaron la metodología y condujeron la investigación, analizaron los datos, redactaron el borrador inicial, y redactaron y revisaron la versión final. **Cecilia González Vetteone:** analizó los datos, redactó el borrador inicial, y redactó y revisó la versión final. **Ivalena de Guillen, Laura Aria Zaya, Alejandra Rojas Segovia, Cynthia Bernal Vera:** revisaron la versión final.

Financiación: propia.

Conflictos de intereses: Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mengarelli R. Evolución del tratamiento de las heridas a lo largo de la historia (Segunda Parte). *Cicat Ar.* 2016; 2(2):17-9.
2. Ministerio de Salud Pública Y Bienestar Social. Programa nacional de control del VIH/sida/ITS. 2017; Disponible en: <https://www.mspbs.gov.py/dependencias/pronasida/adjunto/d8b201-INFEPVIH2017PARAGUAY.pdf>
3. Ministerio de Salud Pública Y Bienestar Social. La sífilis en Paraguay. Perfil de país, 2018. 2019; 14(2018): 2-3.
4. Organización Panamericana de la Salud. Sífilis. OPS/OMS [Internet]. [citado 22 de junio de 2021]. Disponible en: <https://www.paho.org/es/temas/sifilis>
5. Brautigam CA, Deka RK, Liu WZ, Norgard MV. Insights into the potential function and membrane organization of the TP0435 (Tp17) lipoprotein from *Treponema pallidum* derived from structural and biophysical analyses. *Protein Sci.* 2015; 24(1): 11-9.
6. Sun R, Lai DH, Ren RX, Lian S, Zhang HP. *Treponema pallidum*-specific antibody expression for the diagnosis of different stages of syphilis. *Chin Med J (Engl).* 2013; 126(2): 206-10.
7. Garza-Velasco R, Gómez-Pérez I, Manero-Brito SM. La sífilis y los principales factores de virulencia de *Treponema pallidum*. *Dep Biol - UNAM.* 2003; 1-27.
8. Aznar J, Blanco MA, Lepe JA, Otero L, Vázquez F. Diagnóstico microbiológico de las infecciones de transmisión sexual y otras infecciones genitales. Vol. 25, Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2018: 421.
9. Duran AT, Leguizamón LD, Pinilla G. Desafíos en el diagnóstico de sífilis congénita Challenges in the diagnosis of congenital syphilis. *Biociencias* 2017; 1: 31-8.
10. Murray P, Rosenthal K, Pfäller M. Medical Microbiology. *Medical microbiology.* 2021; 1: 330-2.

11. Ryan KJ, Ray G. Sherris. Microbiología Médica. 5ta edición. México: Mc Graw Hill; 2010.
12. Veroli V. Expresión de antígenos recombinantes de *Treponema pallidum* para el desarrollo de test de diagnóstico de Sífilis. Universidad de la República Uruguay. 2016.
13. Zhang RL, Wang QQ, Zhang JP, Yang LJ. Tp17 membrane protein of *Treponema pallidum* activates endothelial cells in vitro. Int Immunopharmacol. 2015; 25(2):538-44.
14. Landis JR, Koch GG. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. Biometrics. 1977; 33(1):159-74.
15. Pastuszczak M, Kotnis-Gaska A, Jakubowicz B, Wojas-Pelc A. *Treponema pallidum*-specific immune responses and autoimmunity in patients who remain serofast after treatment of syphilis. Postep Dermatol Alergol. 2019; 36(5):620-5.
16. Shekarchi IC, Fuccillo DA, Sever JL, Madden DM. Avidin-biotin latex agglutination assay for detection of antibodies to viral antigens. J Clin Microbiol. 1988; 26(5): 954-6.
17. Aria L, Bernal C. Manual de Procedimientos del Departamento de Producción IICS-UNA. IICS-UNA.2018.
18. Kay BK, Thai S, Volgina VV. High-throughput biotinylation of proteins. Methods Mol Biol. 2009; 498: 185-98.
19. Basso B, Moretti E. El laboratorio en el diagnóstico de la infección chagásica. 2015: 1-23.
20. Tallano BC. Diagnóstico bioquímico con micropartículas. Wiener Lab. 2014: 2-4.
21. Schiettecatte J, Ellen Anckaert JS. Interferences in immunoassays. Clin Biochem Rev 2013; 165-90.
22. Nikolac N. Lipemia: Causes, interference mechanisms, detection and management. Biochem Medica 2014; 24(1): 57-67.
23. Muratsugu M. Mechanism of aggregates generated by heating human serum. Biol Pharm Bull. 1996;19(1): 132-5. DOI: [10.1248/bpb.19.132](https://doi.org/10.1248/bpb.19.132)
24. Hu X, Zhang R, An T, Li Q, Situ B, Ou Z, et al. Impact of heat-inactivation on the detection of SARS-CoV-2 IgM and IgG antibody by ELISA. Clin Chim Acta. 2020; 509: 288-92. DOI: [10.1016/j.cca.2020.06.032](https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.06.032)
25. Miranda E, Sánchez E, Náquira C, Somocursio J, Ayala E, Miranda G. Evaluación de una prueba de aglutinación de látex para el diagnóstico serológico de la equinococosis quística. Rev. perú. med. exp. salud publica 2009; 26(2): 198-202. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342009000200011
26. Garcia VS. Obtención de un reactivo de inmunoaglutinación para el diagnóstico de la infección por *Trypanosoma cruzi*. (Tesis de Grado Académico de Doctor en Química) Argentina: Universidad Nacional del Litoral, Facultad de Ingeniería Química; 2011. <https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8443/bitstream/handle/11185/267/tesis.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
27. Wiener Laboratorios S.A.I.C. V.D.R.L. test. Rosario - Argentina: Wiener Lab; 2000.
28. Cruz A. Diagnóstico de sífilis: al derecho y al revés. Rev la Asoc Colomb Dermatología y Cirugía Dermatológica. 2019; 27(1): 6-11.
29. Abbott Laboratories. Syphilis TP. Germany: Abbott; 2009.