

DIRECTRICES DE LA OIE

Estándares Internacionales de Referencia para los Ensayos de Detección de Antígenos

1. Introducción

1.1. Finalidad

Este documento recoge las directrices para la preparación, validación y distribución de antígenos Estándar de Referencia Internacional para las pruebas de detección de antígenos de las enfermedades infecciosas de los animales. En las presentes directrices, el término "estándar" se refiere a los antígenos, a menos que se indique otra cosa. Estos estándares son designados por la OIE como estándares de referencia primarios para ser usados junto con las pruebas descritas en el *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres (Manual Terrestre)*.

1.2. Definiciones

1.2.1. Protocolo de prueba estándar

Se trata de un procedimiento de prueba validado e internacionalmente aceptado, descrito en el *Manual Terrestre*.

1.2.2. Estándar de referencia internacional

El término "estándar de referencia internacional" es sinónimo de estándar de referencia primario. Representa el estándar de referencia respecto del cual se comparan y calibran todos los demás.

1.2.3. Estándares secundarios y de trabajo

Los estándares secundarios se preparan comparándolos directamente con el estándar de referencia internacional y, en la medida de lo posible, tendrán las características del estándar primario si van a ser utilizados para el protocolo de prueba estándar. En principio, el estándar secundario será preparado por un laboratorio nacional de referencia y será designado como estándar nacional o local.

Los estándares de trabajo pueden ser estándares secundarios o estándares terciarios calibrados respecto al secundario. Los estándares de trabajo estarán disponibles en cantidad suficiente para que los laboratorios de diagnóstico puedan usarlos a fin de normalizar las pruebas cotidianas rutinarias.

1.3. Campo de aplicación

Los estándares de referencia internacional son necesarios para asegurarse de que un ensayo de detección de antígeno determinado puede medir la actividad de los antígenos con un nivel específico de sensibilidad de diagnóstico. La sensibilidad de diagnóstico está relacionada con el riesgo de que la prueba dé una falsa reacción negativa cuando, en realidad, el animal está, o ha estado, infectado. Los estándares de referencia internacional suelen ser utilizados por los laboratorios internacionales, nacionales o de referencia para calibrar las pruebas estándar como plantillas para obtener estándares secundarios. El estándar secundario o de trabajo será el que se utilice diariamente para normalizar las pruebas, no el estándar internacional.

Algunas pruebas de detección de antígenos emplean material de diagnóstico que se obtiene directamente de un caso sospechoso, mientras que para otras se requiere un cultivo previo *in vivo* o *in vitro* del agente (cf. tabla).

Para un número limitado de enfermedades, se ha convenido internacionalmente en un sistema de “unidades internacionales” de actividad de antígenos y los estándares de referencia internacional definen, para ellas, la escala de unidad. Para la gran mayoría de las enfermedades animales no existe tal sistema y las pruebas, normas de trabajo y muestras se definen en base a los estándares de referencia internacional.

1.4. Procedimiento

Para la mayoría de las pruebas, habrá que establecer tres estándares primarios de referencia: un positivo fuerte, un positivo débil y uno negativo. Serán seleccionados y caracterizados por un laboratorio de referencia designado que utilice un protocolo de prueba estándar internacionalmente aceptado y reactivos internacionalmente aceptados.

El estándar positivo débil es fundamental para garantizar la sensibilidad de diagnóstico de la prueba. Para las pruebas no cuantitativas (como las de inmunofluorescencia, de aglutinación o inmunohistoquímicas) puede ser el único estándar positivo requerido.

Para las pruebas cuantitativas, sin titulación (p. ej., pruebas que incluyen dispositivos de flujo lateral, ELISpot o ELISA de captura de antígenos [Ag ELISA] el estándar positivo fuerte definirá un nivel arbitrario de positividad al 100%. Se asignará entonces a los estándares negativo y positivo débil un porcentaje proporcional de positividad que corresponda a su reactividad al ser sometidos al protocolo estándar.

Los laboratorios de referencia de la OIE que elaboran una norma internacional deben establecer contacto con otros laboratorios de referencia de la OIE, especialmente con aquellos designados para la misma enfermedad, con el fin de organizar un sistema entre laboratorios para mejorar la consistencia de los resultados. La realización de un examen de competencias daría un valor agregado a la norma internacional, este aseguraría la armonización entre los laboratorios y promovería la creación de redes y cooperación entre los Centros de Referencia de la OIE.

2. Selección del material que se utilizará como estándar

2.1. Tipo de material

La mayoría de los estándares de referencia internacional se preparan purificando el antígeno mediante la infección de células permisivas con el virus, o infectando animales cobaya con el patógeno apropiado o con preparados (antígenos) de proteínas recombinantes. Estos se purificarán de nuevo con la columna cromatográfica y se verificará el grado de pureza por espectrómetro de masas, para producir un preparado de antígeno homogéneo libre de proteínas contaminantes. Se pueden utilizar varios métodos para concentrar más el antígeno, por ejemplo el liofilizado y el ultrafiltrado. Para cultivar virus y virus recombinantes (partículas semejantes a virus incluidas), siempre que sea posible se empleará un medio libre de proteínas animales derivadas de suero. Si se tiene que emplear suero bovino, provendrá de fuente exenta de EEB. Siempre que sea posible, se producirán los antígenos en animales exentos del patógeno específico, o gnotobióticos, de una especie apropiada para el ensayo que se está estandarizando.

2.2. Inocuidad

Los estándares de referencia se prepararán de tal modo que no contengan materia infecciosa. Para facilitar el transporte de un país a otro, se recomienda que los estándares que estén húmedos sean tratados con un método que haya sido validado como apto para desactivar el agente, al tiempo que conserva su reactividad en el ensayo. Por ejemplo: con BEI (bromoetilenimina) o irradiados a 25–30 kilogray (2.5–3.0 Mrad) al tiempo que las muestras se mantienen a –78°C. No se recomienda irradiar muestras liofilizadas, ya que la dosis recomendada puede no bastar para obtener una inactivación completa del agente patógeno. Después del tratamiento, las muestras pasarán las pruebas de inocuidad apropiadas que se describen en el capítulo 1.1.9 del *Manual Terrestre*:

Pruebas para comprobar la esterilidad y la ausencia de contaminación de los productos biológicos, para verificar que están libres de agentes vivos detectables.

2.3. Estándares de referencia positivos

Los estándares de referencia positivos se seleccionarán a partir de cultivos o de animales de laboratorio infectados. Se medirá la replicación del patógeno en cultivo o en el animal de acuerdo con el protocolo de prueba estándar para decidir en qué momento se procede a coleccionar el material tras la inoculación. Todo dependerá de la patogénesis de la enfermedad y de la prueba. Habrá que facilitar todos los detalles sobre los plazos de inoculación y la naturaleza del inoculado para que los estándares secundarios puedan ser preparados con métodos equivalentes. Los estándares estarán libres de todo antígeno y organismos que podrían provocar una reacción cruzada en la prueba estándar o se facilitará la información relativa a esa reacción cruzada. El estándar podrá derivar de un solo animal o de muestras agregadas de distintos animales. Excepcionalmente, los animales infectados naturalmente podrán ser utilizados como fuente del estándar cuando no sea posible efectuar una inoculación o infección controlada.

2.4. Estándares de referencia negativos

Los estándares de referencia negativos comprenderán cultivos no infectados o se seleccionarán a partir de animales que nunca hayan estado expuestos al organismo en cuestión o vacunados contra él. Estarán libres de todo antígeno o de otros patógenos que podrían provocar una reacción cruzada en la prueba estándar. El estándar negativo podrá derivar de un solo suero o de varios sueros agregados.

3. Características de los estándares de referencia internacional

3.1. Estándar positivo fuerte de referencia

Para pruebas que demuestran curvas sigmoideas típicas de dosis/respuesta, el estándar positivo fuerte presentará una actividad de antígenos que se encuentre en la porción lineal de la curva justo antes de la fase de meseta. En otras pruebas, contendrá antígenos suficientes para producir la reacción máxima que corresponda a los límites seleccionados para la prueba, por ejemplo, una línea clara de corte de identidad en una prueba por inmunodifusión o un 100% de inhibición en un Ag ELISA de competencia o inhibición.

3.2. Estándar positivo débil de referencia

El estándar positivo débil presentará una actividad de antígenos que se encuentre también en la porción lineal de la curva justo después del umbral positivo/negativo. La reacción obtenida nunca será equívoca. En otras pruebas, el estándar de referencia positivo débil contendrá antígenos suficientes para producir de modo congruente la reacción detectable mínima, por ejemplo, una línea de identidad débil pero inequívoca en una prueba por inmunodifusión. Para las pruebas de competencia o inhibición que frecuentemente muestran una transición abrupta de positivo a negativo, la selección del estándar positivo débil puede ser especialmente difícil. Se aplican los mismos principios: el estándar debe dar una respuesta positiva congruente, justo por encima del umbral positivo/negativo, con el protocolo de prueba estándar.

3.3. Estándar negativo de referencia

Este dará siempre una reacción por debajo del umbral positivo/negativo con el protocolo de prueba estándar. La reacción obtenida nunca será equívoca.

4. Preparación de los estándares de referencia

4.1. Constitución de los estándares

Siempre que sea posible, los estándares de referencia positivos se prepararán con materiales que presenten el nivel de reactividad deseado sin tener que diluir más. Pero en muchos casos puede ser necesario que el laboratorio de referencia realice una disolución una sola vez de un suero positivo en un suero negativo para alcanzar el nivel de reactividad que se indica en (3). En tales casos, el estándar de referencia positivo débil puede derivarse del mismo stock de suero positivo que el estándar de referencia positivo fuerte.

Un estándar de referencia internacional no requerirá que el laboratorio destinatario efectúe manipulaciones especiales (como la predisolución) antes de usarlo para la prueba en cuestión. El estándar será puesto a prueba como cualquier muestra de campo, en condiciones de diagnóstico rutinario (lo que incluye las fases de dilución que forman parte normalmente del procedimiento). Así se evitan errores o sesgos debidos a una manipulación o preparación especiales. Por consiguiente, la actividad de antígenos en un estándar de referencia positivo corresponderá a los límites de detección exactos de la prueba de diagnóstico.

4.2. Estabilidad y almacenamiento

Todos los materiales serán congelados o refrigerados en espera de la evaluación. Se evitará repetir los ciclos de congelación y descongelado. Para asegurar la estabilidad, se recomienda que el estándar final, después de que la muestra haya sido tratada para inactivar los agentes adventicios, sea liofilizado y lo mejor sería proporcionar el diluyente estéril para reconstituir el material junto con el estándar liofilizado. Es preferible recurrir a viales sellados, y no con tapa de goma, para el almacenamiento a largo plazo. Los stocks liofilizados se guardarán a 4°C, aunque no les perjudique pasar un poco de tiempo a temperatura ambiente (por ejemplo, durante el transporte). El proceso de liofilizado puede alterar la calidad biológica de los sueros, por lo que se recomienda como alternativa que se guarden en crioprobetas a -78°C.

Después del liofilizado, se reconstituirán y reevaluarán varios frascos de suero estándar. No deberá poder ser observado signo alguno de reacciones cruzadas a los antígenos o cualquier otro factor no específico que interfiera con la interpretación de los resultados de la prueba. Si existe una posibilidad de reacción cruzada con agentes estrechamente relacionados, esta información deberá ser indicada.

4.3. Control de los lotes

El material de referencia original empezará como stock único que será suficiente para durar al menos 5 años. Puede mantenerse congelado (preferentemente a -70°C como máximo) y puede ser liofilizado un lote suficiente para 2 años (unas 500 pruebas). Se asignará a cada lote, congelado o liofilizado, una referencia y se llevará un registro completo de los datos de control de la calidad de cada lote.

Cada lote liofilizado será calibrado de nuevo. Cada frasco o vial contendrá 0.5–1 ml.

4.4. Etiquetado

En la etiqueta figurará como mínimo la siguiente información: logotipo de la OIE; estándar de referencia internacional de la OIE para (enfermedad) (prueba); especificar si se trata de positivo fuerte, positivo débil o negativo; nombre del laboratorio de referencia; método de reconstitución y condiciones de almacenamiento. Si no hay sitio suficiente en la etiqueta para que figuren todos estos datos, se podrá recurrir al uso de abreviaturas y algunos deberán figurar en la ficha de datos, no en la etiqueta.

4.5. Fichas de datos

Los laboratorios de referencia de la OIE que elaboren sueros estándar de referencia internacional se cerciorarán de que todas las alícuotas van acompañadas por una ficha de datos apropiada. Se dejará claro a los laboratorios solicitantes que lo que está previsto es que los estándares de referencia internacional sean utilizados para que calibren su propia prueba y para promover la armonización internacional.

Para que un laboratorio de diagnóstico prepare un estándar de referencia secundario para su propio uso, será necesario que el laboratorio de referencia de la OIE le facilite los datos específicos para la selección o preparación de los estándares de referencia primarios.

4.5.1. Datos requeridos

En la ficha figurarán todas las informaciones especificadas para la etiqueta (cf. 4.4). Además, figurará la información siguiente, para facilitar la selección o preparación de los estándares secundarios que, en la medida de lo posible, serán una copia exacta de los primarios.

- i) Descripción del cultivo o del animal donante para preparar el agente que indique la especie, la edad, el estatus reproductivo y el origen (producción natural, libre de patógenos específicos, gnotobiótico, etc.);
- ii) Detalles del agente utilizado: fuente, cepa, serotipo, etc.;
- iii) Detalles del protocolo de la infección experimental: ruta, dosis, calendario de inmunización, método y momento de la recolección de la muestra, etc.;
- iv) Descripción de los medios de cultivo, los tiempos de incubación y las temperaturas para preparar los cultivos del agente;
- v) Pruebas de referencia empleadas para seleccionar los antígenos candidatos positivos y negativos de referencia: western blot, inmunodifusión en gel de agar;
- vi) Muestra de perfiles de titulación de preparados antigénicos y criterios de selección de diluciones apropiadas con actividad definida;
- vii) Presencia de antígenos heterólogos, si se conocen, y pruebas usadas para la detección;
- viii) Detalles de las pruebas de inocuidad que se hayan realizado con los materiales;
- ix) Declaración según la cual el estándar se destina únicamente a ser utilizado in vitro;
- x) Descripción de los métodos de esterilización que mencione el tipo de irradiación y dosis y el estado de la muestra en el momento de la esterilización (líquida, congelada, liofilizada, etc.).
- xi) Número de lote y fecha de producción.
- xii) Reconstitución recomendada (tipo de fluido reconstituyente y volumen), condiciones de manipulación y almacenamiento.
- xiii) Dirección completa, número de fax y dirección electrónica del laboratorio de referencia para obtener más información.

5. Aprobación por la OIE de los estándares de referencia

Ningún estándar de referencia internacional podrá llevar el nombre de la OIE si no ha sido ratificado por la Comisión de Normas Biológicas de la OIE con la autorización de su Asamblea.

Todos los datos técnicos y estadísticos relativos a la evaluación de los estándares de referencia candidatos, junto con todos los datos para la ficha que se especifican anteriormente, serán sometidos a la OIE. La Comisión de Normas Biológicas de la OIE estudiará la información. Si da su aprobación, el estándar de referencia será incorporado a la lista de estándares de referencia internacional disponibles. Esta lista será comunicada a los Países Miembros de la OIE que la soliciten y también podrá ser consultada en las ciberpáginas de la OIE (<http://www.oie.int>).

6. Referencias

BALAMURUGAN V., VENKATESAN G., SEN A., ANNAMALAI L., BHANUPRAKASH V. & SINGH R.K. (2010). Recombinant protein-based viral disease diagnostics in veterinary medicine. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, **10**, 731–753. doi: 10.1586/erm.10.61. (Review).

CHRISTOPHER-HENNINGS J., ARAUJO K.P., SOUZA C.J., FANG Y., LAWSON S., NELSON E.A., CLEMENT T., DUNN M. & LUNNEY J.K. (2013). Opportunities for bead-based multiplex assays in veterinary diagnostic laboratories. *J. Vet. Diagn. Diagn.*, **25**, 671–791. doi: 10.1177/1040638713507256. Epub 2013 Oct 23. (Review).

.../Anexo

Anexo

Tabla: Principios de los ensayos de detección de antígenos

Método	Especímenes	Observaciones	Características
Ensayos inmunoenzimáticos, por ejemplo, de captura de antígeno	Tejidos, células	Antígeno del agente identificado por reacción a anticuerpo de especificidad conocida	Rápido, sensible y específico, p. ej. captura de antígeno por inmuoabsorción enzimática
Inmunocromatografía, IGS	Sangre, secreciones y excreciones	Antígeno del agente identificado por reacción a anticuerpo de especificidad conocida	Rápido, sensible y específico, p. ej. dispositivos de flujo lateral
Inmunofluorescencia	Tejidos, células	Antígeno del agente identificado in situ por reacción a anticuerpo de especificidad conocida	Rápido, sensible y específico, p. ej. fluorescencia de anticuerpos
Inmunohistoquímica	Tejidos, células	Antígeno del agente identificado in situ por reacción a anticuerpo de especificidad conocida	Lento pero sensible y específico; técnica difícil de usar en laboratorios especializados en histopatología
Microscopía inmunoelectrónica	Tejidos, células	Agregación de agente por anticuerpo específico de especificidad conocida	Rápido, sensible y específico, p. ej. extensión del diagnóstico por microscopio electrónico; técnica difícil de usar en laboratorios especializados en microscopía
Radioinmunoensayo	Tejidos, células	Antígeno del agente identificado por reacción a anticuerpo de especificidad conocida	Necesita equipo y reactivos complejos
Aglutinación de partículas de látex	Extractos de tejidos, células	Antígeno del agente identificado por reacción a anticuerpo de especificidad conocida	Insensible y sujeto a reacciones no específicas, por ejemplo, aglutinación en placa
Inmunodifusión	Extractos de tejidos, células	Antígeno del agente identificado por reacción a anticuerpo de especificidad conocida	Insensible y sujeto a reacciones no específicas, método simple

Tabla modificada a partir de: *Veterinary Virology*, Third Edition, Murphy F.A., Gibbs E.P.J., Horzinek M.C. & Studdert M.J., eds, published 1999, Academic Press, San Diego, California, USA.