

# DIRECTRICES DE LA OIE

---

## Sueros estándar de referencia internacional para pruebas de anticuerpos

### 1. Introducción

#### 1.1. Propósito

Este documento recoge las directrices para la preparación, validación y distribución de anticuerpos Estándar de Referencia Internacional para las pruebas de detección de anticuerpos de las enfermedades infecciosas de los animales. En el texto de las presentes directrices, el término “estándares” se refiere a los anticuerpos, a no ser 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 Pruebas de Diagnóstico y Vacunas para los Animales Terrestres* de la OIE.

#### 1.2. Definiciones

##### 1.2.1. Protocolo de prueba estándar

Se trata de un procedimiento validado e internacionalmente aceptado, suele ser una “Prueba prescrita por la OIE para el comercio internacional”, descrita en el *Manual de Pruebas de Diagnóstico y Vacunas para los Animales Terrestres* de la OIE.

##### 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 una prueba determinada puede medir la actividad de los anticuerpos 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.

Para un número limitado de enfermedades, se ha convenido internacionalmente en un sistema de “unidades internacionales” de actividad de anticuerpos 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 inmunodifusión) puede ser el único estándar positivo requerido.

Para las pruebas cuantitativas, sin titulación, como el ELISA indirecto, 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.

## **2. Selección del material que se utilizará como estándar**

### **2.1. Tipo de material**

La mayoría de los estándares de referencia internacional serán preparados a partir de suero sanguíneo, que estará libre de hemólisis y de lipemia excesiva. Los antisueros, de ser posible, serán obtenidos en animales libres de patógenos específicos o gnotobióticos de una especie apropiada para la prueba que se va a normalizar. Otro tipo de material, como la leche desnatada o los anticuerpos monoclonales, podrá ser utilizado si resulta apropiado para la prueba en cuestión.

### **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 BEI (bromoetilenimina) o irradiados a 25–30 kilogray (2.5–3.0 Mrad) al tiempo que las muestras se mantienen a  $-78^{\circ}\text{C}$ . 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 pruebas de inocuidad apropiadas para verificar que están libres de agentes vivos detectables. Los sueros de bovino provendrán de una fuente libre de EEB.

### **2.3. Estándares de referencia positivos**

Los estándares de referencia positivos se seleccionarán a partir de animales que presenten una respuesta inmune humoral (o sea, de anticuerpos) típica al organismo en cuestión. Los animales hiperinmunes no son considerados como típicos y deberán ser evitados. La respuesta inmune puede ser inducida por infección experimental o con vacuna. Se medirá la respuesta del animal de acuerdo con el protocolo de prueba estándar para decidir en qué momento se procede a coleccionar el material tras la inmunización. Todo dependerá de la naturaleza de la enfermedad y de la prueba. Habrá que facilitar todos los detalles sobre los plazos de inmunización y la naturaleza del inmunógeno para que los estándares secundarios puedan ser preparados con métodos equivalentes. Los estándares estarán libres de todo anticuerpo a 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 inmunización o infección controlada.

## **2.4. Estándares de referencia negativos**

Los estándares de referencia negativos se seleccionarán a partir de animales que nunca hayan estado expuestos al organismo en cuestión o vacunados contra él. Estarán libres de todo anticuerpo a organismos 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 tales como la fijación del complemento, la neutralización vírica o ELISA indirecto, que demuestran curvas sigmoideas típicas de dosis/respuesta, el estándar positivo fuerte presentará una actividad de anticuerpos que se encuentre en la porción lineal de la curva justo antes de la fase de meseta. En otras pruebas, contendrá anticuerpos 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 ELISA de competencia o inhibición.

### **3.2. Estándar positivo débil de referencia**

El estándar positivo débil presentará una actividad de anticuerpos 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 anticuerpos 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 anticuerpos 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 anticuerpos 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. Sobre todo si éstos han sido preparados por dilución de positivos fuertes o hiperinmunes en sueros negativos.

### **4.5.1. Datos requeridos**

En la ficha figurarán todas las informaciones especificadas para la etiqueta (cf 4.4). Además, podrán figurar las informaciones siguientes, 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 animal donante del suero positivo y negativo que indique la especie, la edad, el estatus reproductivo y el origen (producción natural, libre de patógenos específicos, gnotobiótico, etc.).
- ii) Naturaleza de la respuesta de anticuerpos: a la infección natural, infección experimental, inmunización.
- iii) Detalles del organismo utilizado para inducir la respuesta inmune: fuente, cepa, serotipo, etc.
- iv) Detalles de la infección experimental o los protocolos de inmunización: ruta, dosis, calendario de inmunización, método y momento de la recolección de la muestra, etc.
- v) Pruebas de referencia empleadas para seleccionar los sueros candidatos positivos y negativos de referencia y para caracterizar la respuesta de anticuerpos: ELISA, inmunodifusión en gel de agar, neutralización del virus, etc.
- vi) Muestra de perfiles de titulación de sueros hiperinmunes y criterios de selección de diluciones apropiadas con actividad definida.
- vii) Presencia de anticuerpos 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 informaciones.

## **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 de la OIE con la autorización del Comité Internacional de la OIE.

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 de la OIE estudiará la información. Si la Comisión de Normas 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. Bibliografía**

BAHNEMANN H.G. (1975). Bromine ethyleneimine as an inactivant for foot and mouth disease virus and its application for vaccine production. *Arch. Virol.*, **47**, 47–56.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2002). Guidelines on viral inactivation and removal procedures intended to assure the viral safety of human blood plasma products. WHO Expert Committee on Biological Standardization. WHO, Geneva, Switzerland.

WRIGHT P.F. (1998). International standards for test methods and reference sera for diagnostic tests or antibody detection. *In: Veterinary Laboratories for Infectious Diseases*, Pearson J.E., ed. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **17** (2), 527–533.

---