

MEDICION DE LOS ANTICUERPOS CONTRA EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA: ESTUDIO INTERNACIONAL EN COLABORACION PARA EVALUAR LOS SUEROS DE REFERENCIA DE LA OMS¹

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), agente causal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (1-3), se transmite principalmente por contacto sexual o por la inyección de sangre o hemoderivados contaminados, tales como los factores anti-hemofílicos (4). A partir de 1985, se ha establecido en muchos países la selección, mediante una prueba de anticuerpos contra el VIH, de la sangre de donantes a fin de reducir al mínimo el riesgo de transmisión del SIDA por transfusión sanguínea o tratamiento con hemoderivados. La detección de anticuerpos contra el VIH tiene también gran importancia como medio relativamente sencillo y rápido para determinar la magnitud y la propagación de las infecciones por este agente (5), y actualmente se usan en todo el mundo muchas pruebas inmunoquímicas comerciales o elaboradas en el laboratorio. Los ensayos más utilizados hoy en día se basan en inmunosorbencia ligada a la enzima o radiactiva, inmunofluorescencia, inmunoelectrotransferencia o inmunoprecipitación, y las variaciones en la especificidad y sensibilidad de las técnicas reflejan diferencias inherentes entre las propiedades de los ensayos así como variaciones en los lotes de preparados de reactivos y estuches (6, 7). Así pues, se necesita urgentemente material de referencia bien caracterizado que pueda utilizarse para definir la fiabilidad y la sensibilidad de las pruebas, con objeto de poder controlar la calidad de los lotes de estuches o reactivos y para usarlo como patrón de referencia en los laboratorios.

En este informe se presenta la evaluación que se hizo de dos preparados de sueros de referencia propuestos, uno reactivo y el otro no reactivo al VIH, en un estudio en colaboración en el que participaron 21 laboratorios de 11 países.

¹ Se publica en el *Bulletin of the World Health Organization*, Vol. 66, No. 1, 1988, con el título "Measurement of antibodies to human immunodeficiency virus: an international collaborative study to evaluate WHO reference sera". © Organización Mundial de la Salud, 1988. Los autores son A. J. Garrett, V. Seagroatt y G. C. Schild, del Instituto Nacional de Normas y Regulación de Productos Biológicos, Inglaterra; E. M. Supran, del Laboratorio Central del Servicio de Salud Pública, División de Reactivos Microbiológicos y Control de Calidad, Inglaterra; y K. O. Habermehl y H. Hampl, de la Universidad Libre de Berlín, Instituto de Virología Clínica y Experimental, República Federal de Alemania. Las tres instituciones mencionadas son centros colaboradores de la OMS en relación con el SIDA.

Materiales y métodos

Material de referencia propuesto. Los preparados propuestos de sueros humanos positivos y negativos con respecto a los anticuerpos fueron suministrados, en forma de liofilizado en ampollas de vidrio selladas, por el profesor K. O. Habermehl (Instituto de Virología Clínica y Experimental, Berlín, República Federal de Alemania). Cada preparado procedía de un solo donante; uno era un portador asintomático de VIH y el otro no tenía ningún factor de riesgo conocido. Ninguno de los sueros dio reacción en la prueba del antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) mediante un inmunoensayo estándar, y cada suero se calentó a 56 °C durante una hora antes de la liofilización. Cuando estos preparados se reconstituyeron en la forma recomendada (en 0,2 ml de agua), representaban concentraciones de 1:20 en relación con los sueros originales; este factor de dilución no se incluyó en los cálculos que se presentan en este informe.

Preparados codificados. Se facilitaron a cada uno de los participantes siete preparados de suero liofilizado, codificados con letras de la A a la G. Los preparados A y C eran muestras por duplicado del material de referencia reactivo propuesto, y el E constituía el material de referencia no reactivo propuesto. Las muestras D y F fueron preparadas por el Laboratorio Central del Servicio de Salud Pública, Colindale, Londres. La muestra D, derivada de un solo donante, presentó una débil reactividad en los ensayos de inmunosorbencia. La muestra F, obtenida de una mezcla de sueros de varios donantes, resultó sumamente reactiva. Las muestras B y G eran preparados de referencia del NIBSC (Instituto Nacional de Normas y Regulación de Productos Biológicos, Inglaterra) liofilizados, o derivados de mezclas de suero que daban, respectivamente, de 1973 y 1967; ambas fueron no reactivas.

Diseño del estudio. El estudio fue diseñado para identificar los preparados codificados que reaccionaban con anticuerpos VIH y averiguar la cantidad mínima de muestras reactivas que podía ser detectada con los métodos empleados de ordinario por los participantes.

Se proveyeron a los 21 laboratorios participantes (véase el anexo) juegos por duplicado de los preparados codificados y se les pidió que los sometieran a prueba mediante los procedimientos habitualmente empleados por ellos.

Métodos de valoración. Todos los participantes, salvo tres, valoraron los preparados mediante la técnica ELISA indirecta o competitiva. Se emplearon nueve estuches comerciales de ELISA, fabricados por Abbott, Dupont, ENI, Genetic, Organon, Ortho, Pasteur ("ordinaria" y "rápida"), Travenol y Wellcome. Dos laboratorios llevaron a cabo la prueba ELISA empleando sus propios métodos, y uno incluyó en su serie de ensayos la ELISA "confirmatoria" de Abbott, una prueba ELISA competitiva basada en antígenos de envoltura y centro obtenidos mediante recombinación de ADN.

Quince laboratorios practicaron inmunoelectrotransferencias. Todos ellos —con excepción de dos cuyas técnicas implicaban el uso de un anticuerpo monoclonal de ratón específico para IgG humana y marcado con ^{125}I o proteína A marcada con ^{125}I — emplearon anti-IgG humana ligada a peroxidasa para identificar los complejos antígeno-anticuerpo. Ocho utilizaron la amplificación de biotina-avidina del sistema enzimático.

Uno de los participantes empleó el método de Karpas (8), y otro, un ensayo basado en la aglutinación de partículas (AP).

Método de análisis. Para cada una de las pruebas, se consideró que la reactividad de las muestras codificadas A a G y los títulos de punto final de las muestras A, C y F eran los registrados por los participantes. Los puntos finales se definieron como los valores recíprocos de las diluciones más altas del material original reconstituido, *en suero normal* (no las diluciones finales en los pocillos de ensayo), que presentarían reacciones positivas a los ensayos.

Las relaciones de potencia de C y F se expresaron como relaciones de sus títulos con los de A en los mismos ensayos.

Resultados

Clasificación de sueros por su reactividad en la prueba ELISA y los inmunoensayos. Las muestras A, C y F resultaron reactivas en todas las pruebas y las B, E y G dieron resultado negativo en todos los casos menos en uno. Esta excepción fue una prueba basada en la aglutinación de partículas (AP) en que la muestra E se consideró débilmente reactiva. La muestra D resultó reactiva o débilmente reactiva en 40 de las 48 pruebas ELISA practicadas, en la AP y la prueba de Karpas y en dos de las cuatro de microscopía de fluorescencia (MF) (cuadro 1). En las ocho pruebas ELISA en que la muestra D fue identificada como no reactiva, esta presentaba mayor densidad óptica (DO) que el testigo negativo (si bien no tan alta, desde luego, como la DO del valor límite) y en todos los casos, salvo uno, la DO era por lo menos dos veces mayor que la del testigo negativo.

Titulación de las muestras A, C y F. Los participantes llevaron a cabo ensayos únicos o por duplicado mediante pruebas ELISA de un fabricante determinado o por sus propios métodos. Algunos laboratorios utilizaron pruebas ELISA de varios fabricantes; en particular, el laboratorio 1 empleó siete estuches distintos. Se calcularon para cada estuche la media geométrica de los títulos correspondientes a A, C y F y de las relaciones de potencia para C y F obtenidas por cada laboratorio. En las figuras 1 y 2 se presentan las

CUADRO 1. Evaluación de la reactividad de la muestra D mediante inmunoensayos

Método de ensayo	Laboratorios (No.)	Ensayos (No.)	No. de los que presentaban la reactividad fijada		
			+	±	-
Pruebas ELISA					
Abbott	9	12	9	2	1
Dupont	2	3	3
ENI	1	2	2
Genetic	1	2	...	2	...
Organon	3	4	1	1	2
Ortho	2	3	3
Pasteur ^a	5	8	6	1	1
Travenol	1	1	1
Wellcome	6	10	8	2	1
ELISA propia	2	3	1	1	1
Todas las ELISA	18	48	31	9	8
Microscopia de fluorescencia	4	4	1	1	2
Método de Karpas	1	1	1
Aglutinación de partículas	1	2	2

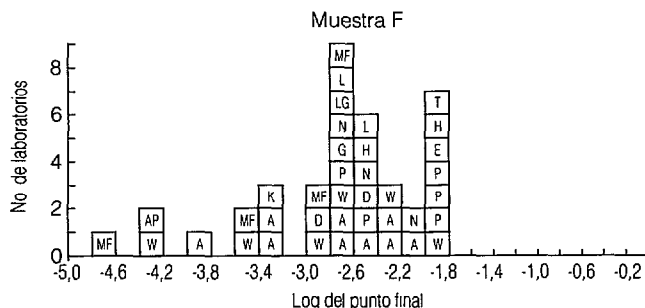
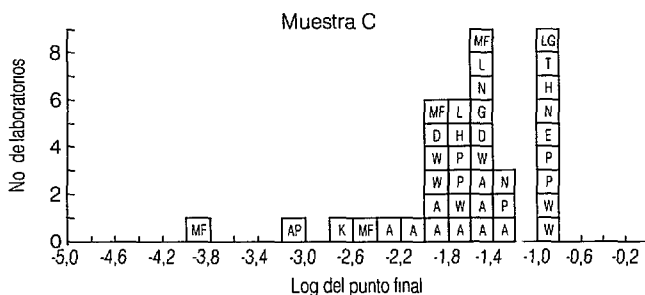
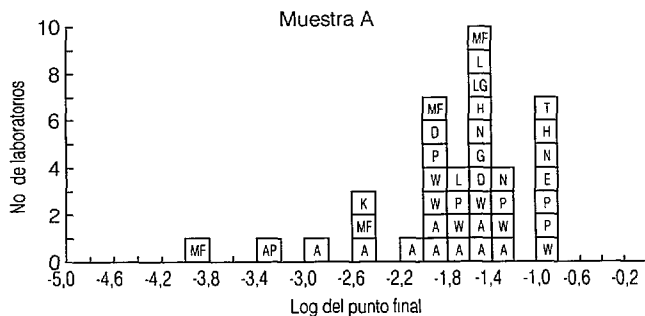
^a Incluye los ensayos hechos con la versión "rápida".

distribuciones de frecuencia de estos valores. Uno de los participantes que utilizó el estuche de Abbott obtuvo títulos mucho más altos para A y F que los otros participantes que emplearon este y otros estuches. Por añadidura, los títulos de C obtenidos en dicho laboratorio fueron 10 y 100 veces menores que los correspondientes a A. Por consiguiente, los resultados de este participante se consideraron atípicos y quedaron excluidos de los análisis ulteriores.

Los títulos medios obtenidos por los laboratorios variaron considerablemente; el más alto fue unas 20 veces mayor que el más bajo. Sin embargo, no se observaron grandes diferencias entre los títulos de distintos estuches; por ejemplo, los intervalos de los títulos correspondientes a los estuches de Abbott, Pasteur y Wellcome coincidieron parcialmente.

Las relaciones de potencia media de C, un duplicado de A codificado, obtenidas en los laboratorios fueron en su mayoría iguales a 1. Todos los laboratorios, salvo el antes mencionado, observaron que los títulos de A y C se diferenciaban por una sola dilución (véase la figura 1), aunque a veces esa dilución fuera desde 5 hasta 10 veces mayor. Las relaciones de potencia media para F fueron más variables que las correspondientes a C. Pero estas relaciones fueron menos variables que los títulos (véanse las figuras 1 y 2). Los resultados de un laboratorio indicaron una relación de potencia, basada en un solo ensayo, de 256 (10 veces más alta que las demás estimaciones) y el título más alto para F (16 384). Por consiguiente, ambos valores se consideraron atípicos y quedaron excluidos de los análisis ulteriores.

FIGURA 1. Distribuciones de frecuencia de las diluciones de punto final obtenidas para las muestras A, C y F. Cada cuadrado representa la estimación de una prueba; las letras corresponden a los diversos tipos de ensayo. Estuches comerciales de ELISA: A, Abbott; D, Dupont; E, ENI; G, Genetic; H, Ortho; N, Organon; P, Pasteur; T, Travenol, y W, Wellcome. L y LG indican las versiones de ELISA elaboradas por el propio laboratorio. Otros métodos distintos de ELISA: MF, microscopia de fluorescencia; K, prueba de Karpas, y AP, aglutinación de partículas



Las diferencias entre las estimaciones de los títulos hechas por los laboratorios resultaron estadísticamente significativas según el análisis de varianza, aun entre los que usaron estuches del mismo fabricante. Al expresar la reactividad de las muestras C y F en relación con la A se demostró que las diferencias entre laboratorios que emplearon el mismo estuche comercial dejaban de ser estadísticamente significativas. No obstante, aún había diferencias significativas entre la relación de potencia de pruebas distintas. Por ejemplo, la relación de potencia media global, es decir, la media geométrica de las potencias medias de laboratorio, fue de 22 para el estuche de Wellcome, alrededor de tres veces más elevada que las correspondientes a los estuches de Abbott y Pasteur (6 y 7, respectivamente). Las relaciones de potencia media global correspondientes a otros estuches estaban comprendidas dentro de este intervalo.

Inmunoelctrotransferencias. Quince participantes sometieron a prueba las muestras A a G mediante técnicas de inmunoelctrotransferencia (cuadro 2). El uso de antígenos testigo ("ficticios") fue notificado únicamente por dos laboratorios. Un participante que empleó antígeno "ficticio" de células H9 detectó uniformemente tenues bandas reactivas en las regiones de masa molecular relativa (M_r) de 24×10^3 y 64×10^3 ; se requiere más información sobre este importante aspecto de los ensayos.

Las masas moleculares relativas registradas en el cuadro 2 son las asignadas por cada participante. Para facilitar la presentación, las bandas registradas dentro de estrechos márgenes de M_r no están diferenciadas y se clasifican en grupos, por ej., $(32-34) \times 10^3$ y $(110-160) \times 10^3$.

Las muestras A y C eran duplicados del suero de referencia reactivo propuesto. Como se esperaba, produjeron resultados idénticos para cada sistema de inmunoelctrotransferencia y se consideran en conjunto. Un participante dio cuenta de la detección de anticuerpos únicamente contra los péptidos p24 y gp41. Solo dos participantes detectaron anticuerpos contra el VIH en las muestras B, E y G; uno informó

CUADRO 2. Detección de anti-VIH mediante inmunoelctrotransferencia^a

Péptido o glucopéptido (masa molecular relativa aproximada $\times 10^3$)	Bandas reactivas/Total de informes		
	Muestra A (C)	Muestra D	Muestra F
17, 18	11/14	6/14	13/14
24	15/15	13/15	15/15
32, 34	12/14	11/14	11/14
38, 39	9/13	5/14	10/13
41	15/15	6/15	15/15
53, 55	11/14	12/24	14/14
65	13/14	13/14	13/14
110, 120, 160	9/13	7/13	12/13

^a No todos los participantes informaron de la presencia o ausencia de cada péptido o glucopéptido.

de una reacción débil en la región p65 para la muestra E, y otro observó una reacción al antígeno p24 en la muestra G. La muestra F fue la más intensamente reactiva de las muestras positivas en todas las inmunoelectrotransferencias; sin embargo, con la salvedad de la detección menos frecuente de anticuerpos contra los antígenos de envoltura gp110-p160 en la A y la C que en la F, estas tres muestras fueron idénticas desde el punto de vista cualitativo.

Todos los participantes detectaron anticuerpos contra p24, gp41 y p53/55 en A, C y F; tres informaron de la ausencia de anticuerpos contra p17/18, y solo uno comunicó no haber observado anticuerpos contra p65.

Otros resultados. Essex *et al.* incluyeron en su estudio una investigación de la reactividad de las muestras A a G en inmunoelectrotransferencias en las que se empleó como antígeno la cepa IV del virus T-linfotrópico humano (VTLH-IV) recientemente aislada. En la inmunoelectrotransferencia de Western no hubo reacciones a ninguno de los antígenos víricos, y en la radioinmunoprecipitación con VTLH-IV marcado con ^{35}S solamente se detectaron dos regiones reactivas, gp160 para la muestra A y p24 para la F.

Discusión

En este estudio se utilizaron estuches ELISA de nueve fabricantes. La sensibilidad de los diversos estuches se evaluó comparando los títulos de punto final de las muestras sumamente reactivas A y E, y determinando si un suero débilmente reactivo resultaba o no "positivo" en las pruebas. Esta sensibilidad varió de un laboratorio a otro, incluso entre los que emplearon el mismo estuche comercial. La expresión de la reactividad de la muestra F en relación con la A redujo la variación entre las pruebas con la consiguiente concordancia entre los laboratorios que utilizaron el mismo estuche. No obstante, hubo todavía diferencias uniformes entre los estuches al comparar la reactividad de A y F, lo que posiblemente reflejaba las diferencias en la especificidad de los sistemas ELISA.

En conjunto, las inmunoelectrotransferencias revelaron reacciones de los sueros A (C) y F a todos los antígenos del VIH previstos. A juicio de muchos investigadores, la presencia de anticuerpos contra p24, gp41 y p55 es un importante indicio de infección por VIH (7, 9, 10). Ahora bien, para obtener resultados reproducibles, la fuente de antígenos, la estandarización de los procedimientos de electrotransferencia y la provisión de antígenos "testigo" requieren minuciosa atención (9); las variaciones de estos factores pueden muy bien explicar las diferencias que aparecen en el cuadro 2.

Los resultados relativos al VTLH-IV confirman observaciones anteriores (11-13) y destacan la urgente necesidad de obtener información acerca de las respuestas de los inmunoensayos a los sueros procedentes de enfermos de SIDA de diferentes zonas geográficas, así como de caracterizar las diferencias genéticas e inmunológicas entre los virus aislados. El preparado de referencia propuesto (A) reaccionó intensamente en todas las pruebas ELISA e inmunoensayos afines y con todos los principales antígenos del VIH en las inmunolectrotransferencias. Su empleo dependerá de las necesidades individuales, pero puede resultar útil como un medio de verificación cualitativa de la especificidad de los ensayos y para calibrar en unidades arbitrarias los testigos positivos incluidos en los estuches y otros ensayos, los límites de detección (como se hace para el HBsAg) y las inmunolectrotransferencias. En este último caso, puede servir particularmente para definir las cantidades óptimas de antígeno y para determinar la movilidad relativa de los principales péptidos y glucopéptidos del VIH. En vista de que la preparación no reactiva (E), reconstituida en 0,2 ml de agua tal como se recomienda, representa suero diluido, su empleo como material de referencia será limitado.

En diciembre de 1986 el Comité de Expertos de la OMS en Patrones Biológicos examinó el informe de este estudio en colaboración y convino en que los preparados A y E serían útiles como referencia para los sueros anti-VIH positivos y negativos, respectivamente.

Los preparados tienen la clave 86/6302 (reactivo) y 86/6238 (no reactivo) y pueden obtenerse de: Director, National Institute for Biological Standards and Control, South Mimms, Potters Bar, Herts., EN6 3QG, Inglaterra.

Agradecimiento

Hacemos constar nuestra gratitud a Jane Bruce por su ayuda en el análisis estadístico de los datos de este estudio.

Referencias

- 1 Barré-Sinoussi, F. *et al.* Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220:868-871, 1983.
- 2 Levy, J. A. *et al.* Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* 225:840-842, 1984.
- 3 Popovic, M. *et al.* Detection, isolation and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 224:497-500, 1984.
- 4 Curran, J. W. *et al.* The epidemiology of AIDS: current status and future prospects. *Science* 229:1352-1357, 1985.
- 5 Biggar, R. J. The AIDS problem in Africa. *Lancet* 1:79-83, 1986.
- 6 Mortimer, P. P. *et al.* Which anti-HTLV-III/LAV assays for screening and confirmatory testing? *Lancet* 2:873-877, 1985.
- 7 Petricciani, J. C. *et al.* An analysis of serum samples positive for HTLV-III antibodies. *New Engl J Med* 313:47-48, 1985.
- 8 Karpas, A. *et al.* Lytic infection by British AIDS virus and development of rapid cell test for antiviral antibodies. *Lancet* 2:695-697, 1985.
- 9 Essex, M. *et al.* Antigens of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy associated virus. *Ann Int Med* 103:700-703, 1985.

- 10 Schupbach, J. *et al.* Antibodies to HTLV-III in Swiss patients with AIDS and pre-AIDS and in groups at risk for AIDS. *New Engl J Med* 312:265-270, 1985.
- 11 Biberfeld, G. *et al.* Findings in four HTLV-IV seropositive women from West Africa. *Lancet* 2:1330-1331, 1986.
- 12 Clavel, F. *et al.* Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 233:343-346, 1986.
- 13 Kanki, P. J. *et al.* New human T-lymphotropic retrovirus related to simian T-lymphotropic virus type III (STLV-III-AGM). *Science* 232:238-243, 1986.

ANEXO. Laboratorios participantes

Laboratorio Nacional de Referencia del VIH, Hospital Fairfield, Fairfield, Victoria, Australia.
 Servicio de Transfusión Sanguínea de la Cruz Roja, Adelaide, Australia.
 Centro de Laboratorios para el Control de Enfermedades, Ottawa, Ontario, Canadá.
 Laboratorio Nacional de Salud, Departamento de Control de Vacunas Víricas y Productos Derivados de la Sangre, París, Francia.
 Instituto Pasteur, París, Francia.
 Instituto de Virología Clínica y Experimental, Universidad Libre de Berlín, República Federal de Alemania.
 Instituto Max von Pettenkofer, Munich, República Federal de Alemania.
 Instituto de Investigaciones Víricas, Universidad de Kyoto, Kyoto, Japón.
 Laboratorio Central del Servicio de Transfusión Sanguínea de la Cruz Roja Neerlandesa, Amsterdam, Países Bajos.
 Servicio de Transfusión Sanguínea, Departamento de Hematología, Hospital General de Singapur, Singapur.
 Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias, Majadahonda, Madrid, España.
 Laboratorio Bacteriológico Nacional, Solna, Estocolmo, Suecia.
 Centro de Transfusión Sanguínea de North London, Edgware, Middlesex, Inglaterra.
 Servicio Nacional Escocés de Transfusión Sanguínea, Edimburgo, Escocia.
 Departamento de Reactivos Microbiológicos y Control de Calidad, Laboratorio Central de Salud Pública, Colindale, Londres, Inglaterra.
 Departamento de Medicina Hematológica, Universidad de Cambridge, Cambridge, Inglaterra.
 Centro Regional de Transfusión Sanguínea, Royal Infirmary, Edimburgo, Escocia.
 Instituto Nacional de Normas y Regulación de Productos Biológicos, Holly Hill, Hampstead, Londres, Inglaterra.
 Departamento de Biología del Cáncer, Escuela de Salud Pública de Harvard, Boston, MA, Estados Unidos de América.
 División de Virología, Centro de Medicamentos y Sustancias Biológicas, Administración de Alimentos y Medicamentos, Rockville Pike, Bethesda, MD, Estados Unidos.
 Programa del SIDA, Centro de Enfermedades Infecciosas, Centros para el Control de Enfermedades, Atlanta, GA, Estados Unidos.
