



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

VERIFICACION DE LOS METODOS DEL ALGORITMO
DIAGNOSTICO POR LABORATORIO DE FIEBRE POR
DENGUE Y FIEBRE HEMORRAGICA POR DENGUE DEL
SISTEMA NACIONAL DE VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

PRESENTA:

YANELLI ADRIANA TORRES OLMOS

ASESOR:

DR. JOSE ALBERTO DIAZ QUIÑONEZ

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

"El hombre se autorrealiza en la misma medida en que se compromete al cumplimiento del sentido de su vida"

"La mejor forma de conseguir la realización personal es dedicarse a metas desinteresadas"

VIKTOR FRANKL

A Dios, por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante la vida.

A mis padres Justa Olmos y Adrian Torres por darme la vida, quererme mucho, creer en mí y porque siempre me apoyaron. Porque están conmigo en todo momento y porque hemos superado tantos obstáculos juntos. Gracias por sus enseñanzas y consejos, por los principios y valores que me inculcaron y por darme una profesión para mi futuro, todo esto se los debo a ustedes.

A todos los que laboran en el LCE del Centro Médico Nacional La Raza del IMSS, por ser buenos compañeros y darme consejos útiles y prácticos para el ejercicio profesional. En especial al M. en C. Andrés Sánchez Orozco, por ser una guía importante y excelente consejero en la realización de esta tesis.

DEDICATORIA

Para mis queridos padres, porque este triunfo también es de ustedes.

Al M. en C. Omar Asaf Ruíz Cázares, que con su ejemplo de lucha, tenacidad y esfuerzo, y por sus principios éticos y altos valores morales, me induce a ser mejor persona cada día.

A todos mis amigos y compañeros que nos apoyamos mutuamente en nuestra formación profesional y que hasta ahora, seguimos siendo amigos: Dayanira Arellano, Karen Manjarrez, Adrian Mendoza, Andrés Hernández, Bianey López, Karen Nava, Rosy Mendieta, Cindy Ortega, Arturo Martínez, Marisol Méndez, Oscar Rodríguez, Miguel Hernández y a todos aquellos con los que compartí alguna experiencia durante la estancia en la querida Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo principal demostrar que la metodología analítica para identificar al antígeno NS₁, anticuerpos IgM e IgG contra el virus del dengue es aplicable a muestras de suero provenientes de todo el país dentro de las condiciones del Laboratorio Central de Epidemiología, del Centro Médico Nacional “La Raza” del Instituto Mexicano del Seguro Social.

Lo anterior se demostró mediante la ejecución de tres protocolos de verificación correspondientes a cada uno de los métodos diagnósticos, ELISA de captura para el antígeno NS₁, ELISA de captura para anticuerpos IgM y ELISA de captura para anticuerpos IgG.

La necesidad de ejecutar estos protocolos fue consecuencia del sistema de gestión de calidad basado en la Norma NMX-EC-15189-IMNC-2008. Laboratorios Clínicos – Requisitos particulares para la calidad y competencia, bajo el cual está dicho laboratorio y la principal razón de dicha ejecución es dar cumplimiento al numeral 5.5.2, capítulo 5 de esta norma; donde se habla sobre los procedimientos de examen y establece que: “los métodos y procedimientos seleccionados para ser utilizados deben ser evaluados y comprobar que dan resultados satisfactorios antes de iniciar su uso para exámenes clínicos”.

En cada uno de los protocolos se examinaron 10 parámetros de desempeño, que son las propiedades, características o capacidades cuantificables del método que indican su grado de calidad. Cada uno de estos parámetros tiene especificados criterios de aceptación, basta con que se cumplan dichos criterios para que se demuestre que el método posee esa propiedad.

Al hacer el análisis de los resultados obtenidos en las tres verificaciones, todos ellos sin excepción alguna cumplieron los criterios establecidos, con lo que se demostró que dichos métodos poseen las propiedades, características y capacidades que indican un buen grado de calidad. Los métodos del Algoritmo Diagnóstico de Fiebre por Dengue y Fiebre Hemorrágica por Dengue del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica son totalmente aplicables bajo las condiciones del Laboratorio Central de Epidemiología del IMSS.

INDICE

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | ACRONIMOS..... | 7 |
| 2 | INTRODUCCION..... | 8 |
| 3 | ANTECEDENTES..... | 12 |
| 3.1 | AGENTE ETIOLÓGICO | 12 |
| 3.1.1 | <i>Morfología.....</i> | <i>12</i> |
| 3.1.2 | <i>Genoma viral.....</i> | <i>13</i> |
| 3.1.3 | <i>Proteínas codificadas por el DENV.....</i> | <i>14</i> |
| 3.2 | EPIDEMIOLOGÍA | 17 |
| 3.3 | EL VECTOR | 20 |
| 3.3.1 | <i>Transmisión viral</i> | <i>22</i> |
| 3.4 | VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA..... | 22 |
| 3.4.1 | <i>Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica.....</i> | <i>23</i> |
| 3.4.2 | <i>Definiciones operacionales de caso</i> | <i>23</i> |
| 3.4.3 | <i>Vigilancia Viroológica.....</i> | <i>25</i> |
| 3.5 | CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD | 25 |
| 3.5.1 | <i>Fases de la enfermedad.....</i> | <i>27</i> |
| 3.6 | ANÁLISIS DE RIESGO BIOLÓGICO | 28 |
| 3.7 | DIAGNÓSTICO POR LABORATORIO | 30 |
| 3.7.1 | <i>Implementación del algoritmo diagnóstico por laboratorio para FD y FHD.....</i> | <i>33</i> |
| 3.8 | VERIFICACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA DEL ALGORITMO DIAGNÓSTICO POR LABORATORIO DE FD Y FHD..... | 38 |
| 3.8.1 | <i>Requisitos de la gestión de calidad.....</i> | <i>38</i> |
| 3.8.2 | <i>Validación y verificación de métodos analíticos</i> | <i>39</i> |
| 4 | JUSTIFICACION..... | 43 |
| 5 | HIPOTESIS..... | 44 |
| 6 | OBJETIVOS..... | 44 |
| 6.1 | OBJETIVO GENERAL | 44 |
| 6.2 | OBJETIVOS PARTICULARES..... | 44 |
| 7 | ESTRATEGIA GENERAL DE TRABAJO..... | 45 |
| 8 | MATERIALES Y METODOS..... | 46 |
| 9 | RESULTADOS..... | 47 |
| 9.1 | ELISA NS ₁ | 47 |
| 9.1.1 | <i>Proporcionalidad y precisión del sistema.....</i> | <i>47</i> |
| 9.1.2 | <i>Sensibilidad y especificidad</i> | <i>49</i> |
| 9.1.3 | <i>Selectividad.....</i> | <i>50</i> |
| 9.1.4 | <i>Precisión intermedia del método.....</i> | <i>51</i> |
| 9.1.5 | <i>Estabilidad analítica de la muestra</i> | <i>52</i> |
| 9.1.6 | <i>Estabilidad de la muestra</i> | <i>54</i> |
| 9.1.7 | <i>Tolerancia</i> | <i>55</i> |
| 9.1.8 | <i>Robustez</i> | <i>56</i> |
| 9.2 | ELISA IgM..... | 59 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 9.2.1 | <i>Proporcionalidad y precisión del sistema</i> | 59 |
| 9.2.2 | <i>Sensibilidad y especificidad</i> | 60 |
| 9.2.3 | <i>Selectividad</i> | 61 |
| 9.2.4 | <i>Precisión intermedia del método</i> | 62 |
| 9.2.5 | <i>Estabilidad analítica de la muestra</i> | 62 |
| 9.2.6 | <i>Estabilidad de la muestra</i> | 64 |
| 9.2.7 | <i>Tolerancia</i> | 65 |
| 9.2.8 | <i>Robustez</i> | 67 |
| 9.3 | ELISA IgG..... | 70 |
| 9.3.1 | <i>Proporcionalidad y precisión del sistema</i> | 70 |
| 9.3.2 | <i>Sensibilidad y especificidad</i> | 71 |
| 9.3.3 | <i>Selectividad</i> | 71 |
| 9.3.4 | <i>Precisión intermedia del método</i> | 72 |
| 9.3.5 | <i>Estabilidad analítica de la muestra</i> | 73 |
| 9.3.6 | <i>Estabilidad de la muestra</i> | 74 |
| 9.3.7 | <i>Tolerancia</i> | 76 |
| 9.3.8 | <i>Robustez</i> | 77 |
| 10 | DISCUSION | 80 |
| 10.1 | PROPORCIONALIDAD Y PRECISIÓN DEL SISTEMA..... | 80 |
| 10.2 | SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD..... | 81 |
| 10.3 | SELECTIVIDAD..... | 81 |
| 10.4 | PRECISIÓN INTERMEDIA DEL MÉTODO..... | 82 |
| 10.5 | ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA..... | 83 |
| 10.6 | ESTABILIDAD DE LA MUESTRA..... | 84 |
| 10.7 | TOLERANCIA..... | 84 |
| 10.8 | ROBUSTEZ..... | 84 |
| 11 | CONCLUSIONES | 85 |
| 12 | REFERENCIAS | 86 |
| 13 | ANEXOS | 89 |
| 13.1 | DIAGRAMA DE FLUJO DEL ALGORITMO DIAGNÓSTICO POR LABORATORIO DE FD Y FHD..... | 89 |
| 13.2 | ESTRATEGIA GENERAL DE TRABAJO..... | 90 |
| 13.3 | MATERIALES Y MÉTODOS..... | 91 |
| 13.3.1 | <i>Materiales</i> | 91 |
| 13.3.2 | <i>Métodos</i> | 93 |
| 13.4 | TABLAS DE RESULTADOS..... | 96 |
| 13.4.1 | <i>ELISA NS1</i> | 96 |
| 13.4.2 | <i>ELISA IgM</i> | 109 |
| 13.4.3 | <i>ELISA IgG</i> | 123 |
| 13.5 | PROTOCOLOS (HOJAS FRONTALES)..... | 137 |
| 13.5.1 | <i>ELISA NS1</i> | 137 |
| 13.5.2 | <i>ELISA IgM</i> | 139 |
| 13.5.3 | <i>ELISA IgG</i> | 141 |

1 ACRONIMOS

| | |
|-----------------|---|
| AmDPB | Americas Dengue Prevention Board |
| CDC | Centers for Disease Control and Prevention |
| DENV-1 | Dengue Virus 1 |
| DENV-2 | Dengue Virus 2 |
| DENV-3 | Dengue Virus 3 |
| DENV-4 | Dengue Virus 4 |
| ELISA | Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Prueba de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas) |
| ETV | Enfermedades Transmitidas por Vector |
| EFE | Enfermedades Febriles y Exantemáticas |
| FD | Fiebre por Dengue |
| FHD | Fiebre Hemorrágica por Dengue |
| IgG | Inmunoglobulina G |
| IgM | Inmunoglobulina M |
| IMSS | Instituto Mexicano del Seguro Social |
| InDRE | Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológico |
| LCE | Laboratorio Central de Epidemiología |
| LESP | Laboratorios Estatales de Salud Pública |
| NS ₁ | Nonstructural Protein 1 (Proteína no estructural 1) |
| OPS | Organización Panamericana de la Salud |
| PCR | Polymerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa) |
| qRT-PCR | Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa de transcripción Inversa). |
| RNLSP | Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública |
| RPBI | Residuos Peligrosos Biológicos Infecciosos |
| SCD | Síndrome de Choque por Dengue |
| SINAVE | Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica |

2 INTRODUCCION

El dengue es una enfermedad causada por alguno de los cuatro serotipos del virus del dengue, del género *Flavivirus*, de la familia *Flaviviridae* y que son transmitidos por picadura de mosquito. Los virus del dengue se transmiten entre personas únicamente por la picadura de hembras hematófagas de ciertas especies de mosquitos del género *Aedes*. Las principales especies transmisoras son *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*. Las tres formas clínicas más comunes de presentación de la enfermedad son casos de fiebre indiferenciada, brotes de formas febriles y brotes de formas hemorrágicas, con posible complicación de síndrome de choque grave, (Guzman & Isturiz, 2010).

Para antes del 2008, menos del 50% de los casos probables de dengue en México eran confirmados por laboratorio, inclusive en periodos de epidemia; por ejemplo en el 2007, el rango promedio fue de 36.5% (Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud, 2008).

La normatividad de ese entonces, la NOM-032-SSA2-2002. Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vector (Secretaría de Salud, 2003); establecía que para el diagnóstico de dengue, "se debe realizar: aislamiento y cultivo viral en muestras de 0-5 días de inicio de fiebre, qRT-PCR en muestras de 0-10 días, determinación de IgM (ELISA) en muestras ≥ 8 y hasta 30 días de iniciada la fiebre y determinación de IgG por inhibición de la hemaglutinación en sueros pareados".

Debido a los costos y la disposición de recursos humanos y materiales, la base del diagnóstico que se utilizaba en los Laboratorios Estatales de Salud Pública (LESP) del país era la detección de IgM, siendo ésta la técnica aceptada como confirmatoria y delegando el cultivo viral y las técnicas moleculares a laboratorios de referencia.

Complementar el diagnóstico con otras técnicas se convirtió en una necesidad imperiosa. Es entonces que se propone un nuevo algoritmo diagnóstico por laboratorio para dengue, el cuál fue consensuado en cuatro diferentes reuniones entre la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública (RNLS) y el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (InDRE), así mismo fue sometido a la crítica de expertos internacionales del *grupo Americas Dengue Prevention Board (AmDPB)* en una reunión sobre vigilancia del dengue, y se ultimaron detalles durante la visita de Evaluación del Programa Nacional de Control y Prevención del Dengue en México por parte de la Organización Panamericana de la Salud (OPS). Estando ya listo el nuevo algoritmo diagnóstico por laboratorio de Fiebre por Dengue (FD) y Fiebre Hemorrágica por Dengue (FHD) del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica

(SINAVE), la solicitud por parte del InDRE a la RNLSP fue iniciar su implementación a partir del mes de abril del 2008, (InDRE, 2008).

La razón por la cual se tuvo que implementar un nuevo algoritmo radicaba en que el anterior presentaba zonas grises y el diagnóstico no era eficiente. Debido a los altos costos de implementar técnicas como aislamiento viral y PCR, los laboratorios del país solo se limitaban a buscar anticuerpos tipo IgM contra el virus. Este ensayo resulta eficaz en la detección de casos de infecciones primarias por dengue en fase aguda, pero hay que considerar las infecciones secundarias.

México es un país con numerosas zonas endémicas para dengue, por ende el riesgo de presencia de infecciones secundarias es muy elevado. En una infección secundaria, la cinética de anticuerpos es diferente a la que se observa en una infección primaria. En las infecciones secundarias el isotipo IgM se eleva poco o nada, mientras que las IgG se elevan rápidamente desde los primeros días de la enfermedad, (OPS & OMS, 2010). Este comportamiento de la respuesta inmune reduce la sensibilidad del ELISA IgM, razón por la cual se introducen otras técnicas y se modifica el flujo a seguir en la toma de decisiones sobre que técnica utilizar según las características de la muestra en ese momento.

Con la finalidad de acelerar aun más el diagnóstico en etapas tempranas, el SINAVE ha elaborado definiciones operacionales de caso, que permiten unificar criterios para la detección, notificación y clasificación de los casos de dengue. Las definiciones se caracterizan por tener elevada sensibilidad; es decir, permiten detectar la mayoría de los casos a través de los signos y síntomas más frecuentes de la enfermedad y de las pruebas de tamizaje.

Uno de los cambios es el tratar de obtener muestras dentro de los primeros cinco días después de iniciados los síntomas (fiebre); a esta muestra sería inútil buscarle anticuerpos tipo IgM pues los títulos de esta inmunoglobulina son nulos antes del tercer o hasta el quinto día de la enfermedad. (Hu *et al.*, 2011); no obstante a finales del año 2006 apareció una alternativa en formato de ELISA fácil, rápida y oportuna para aplicar en estos primeros cinco días (InDRE, 2008). Este ensayo alternativo se basa en la búsqueda de la proteína no estructural 1 (NS1) del dengue, implicada en los procesos de replicación, está reportada como un marcador eficaz de diagnóstico temprano ya que alcanza niveles muy elevados tanto en infecciones primarias, como en secundarias (Shu & Huang, 2004; Thomas *et al.*, 2010; Alcon *et al.*, 2002), y además tiene un periodo de circulación en sangre más prolongado que el RNA viral (Singh, *et al.*, 2010). Esta prueba tiene reportada una

sensibilidad entre el 80-100% dependiendo del serotipo que haya sido el infectante y una especificidad de 100% (Hu, *et al.*, 2011; Singh, *et al.*, 2010). Es así como se pretende mejorar la sensibilidad del diagnóstico, y la de incrementar el filtro para la obtención de muestras representativas para realizar vigilancia virológica.

Una prueba adicional para este algoritmo es la determinación de IgG por ELISA de captura, para detectar infecciones secundarias; tiene una sensibilidad del 94.5% y especificidad del 97.3% (InDRE, 2008). Esta viene a sustituir el ensayo de Inhibición de la Hemaglutinación (IHE) en sueros pareados para detección de IgG.

Entonces, con un nuevo algoritmo que incluya tres diferentes pruebas de ELISA (NS₁, IgM, IgG) se pretende aumentar la sensibilidad del diagnóstico temprano en áreas endémicas y epidémicas, así como reforzar la vigilancia virológica en el país, pues un diagnóstico eficaz del dengue requiere una combinación de varios ensayos (Hu *et al.*, 2011).

Este nuevo algoritmo quedó establecido en la nueva normatividad, NOM-032-SSA2-2010. Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vector (Secretaría de Salud, 2011).

Según datos proporcionados por el SINAVE y comparando los últimos dos años, en el 2012 se observó un aumento de dos veces el número de casos confirmados por dengue total, siendo el porcentaje de variación de 223.3 % y de casi tres veces de FHD con un porcentaje de variación de 284.2 % con respecto al 2011.

Lo anterior puede explicarse por tres razones, la primera que hay mayor precisión diagnóstica, la segunda por un aumento de la transmisión que se traduce en un aumento de la positividad debido al cambio de circulación de serotipos, y la tercera que un 16.4% de los casos son confirmados por la prueba IgG, la cual indica casos que se reinfectan por diferente serotipo, (InDRE, 2012).

Ahora bien, relacionado a lo anterior y haciendo énfasis en que este nuevo algoritmo diagnóstico se comenzó a implementar a partir del 2008 en los LESP de todo el país, el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), en el Laboratorio Central de Epidemiología (LCE) del Centro Médico Nacional "La Raza" se comenzó a implementar este algoritmo a partir de septiembre del 2011. La ejecución del algoritmo diagnóstico se ha realizado bajo los lineamientos emitidos por el InDRE, que según la NOM-017-SSA2-2012. Para la vigilancia epidemiológica (Secretaría de Salud, 2012), es la única institución que cuenta con la

capacidad de reconocer la competencia técnica de los laboratorios que participan en la vigilancia epidemiológica.

El LCE está implantando un sistema de gestión de calidad. Todos los métodos que utiliza son procedimientos validados (normalizados), son apropiados y satisfacen las necesidades para las que son requeridos. Si llegara a utilizar algún método no normalizado, este tendría que ser validado, documentado y autorizado antes de su uso.

Los métodos contenidos dentro del algoritmo diagnóstico de dengue son del tipo normalizado y como parte de su implementación en el LCE, deben ser verificados en su desempeño contra las especificaciones de su validación, para confirmar el desempeño analítico cuando se aplica bajo las condiciones operativas del propio LCE y determinar que es adecuado para el propósito.

La tarea principal de este proyecto es la de realizar la verificación de los métodos de ensayo para identificar al antígeno NS₁ del virus del dengue, anticuerpos del tipo IgM e IgG contra el mismo virus. Para ello se definieron y analizaron diferentes parámetros de desempeño para cada uno de los métodos analíticos utilizados, con lo cual se pretende determinar que los métodos y procedimientos utilizados para diagnosticar a este agente etiológico cumplen con todos los estándares y pueden ser utilizados de manera confiable en el LCE y en México.

3 ANTECEDENTES

3.1 Agente etiológico

Actualmente y a escala mundial, el Virus del Dengue (DENV) es causante de la infección viral más importante transmitida por la picadura de mosquito. Se cree que aproximadamente 2,500 millones de personas habita en zonas dónde el dengue es endémico (OPS, 2010). La infección por dengue puede ocasionar un padecimiento de amplio espectro, que puede resultar como una infección subclínica con fiebre indiferenciada, pasar por un cuadro febril conocido como FD, o llegar hasta formas más graves que se caracterizan por la presencia de hemorragias, que son la FHD y Síndrome de Choque por Dengue (SCD) (Malavige *et al.*, 2004).

El padecimiento es causado por cualquiera de los cuatro serotipos pertenecientes al complejo del dengue. Son cuatro serotipos antigénicamente relacionados y conocidos como DENV-1, DENV-2, DENV3, y DENV-4, los cuales pertenecen a la familia Flaviviridae y al género Flavivirus y son transmitidos por la picadura del mosquito hembra, de las especies *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*, (Fauquet, 2005).

3.1.1 Morfología

Las partículas virales son de forma esférica (figura 1) y con envoltura lipídica, de 50 nm de diámetro aproximadamente. La envoltura se deriva de las membranas celulares hospederas y constituyen del 15-20% del peso total de la partícula viral. Los carbohidratos representan del 9-10% del peso total, y son encontrados como glucolípidos y glicoproteínas (Beasley & Barret, 2008) .Los viriones contienen tres proteínas estructurales, la proteína de cápside (C), que rodea el genoma del virus, mientras que la envoltura contiene dos proteínas: la de envoltura (E) y la de membrana (M) (Malavige *et al.*, 2004).

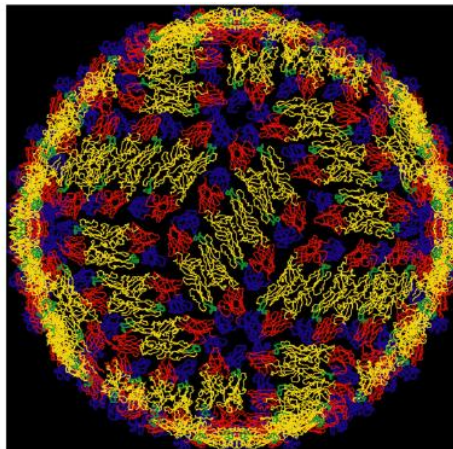
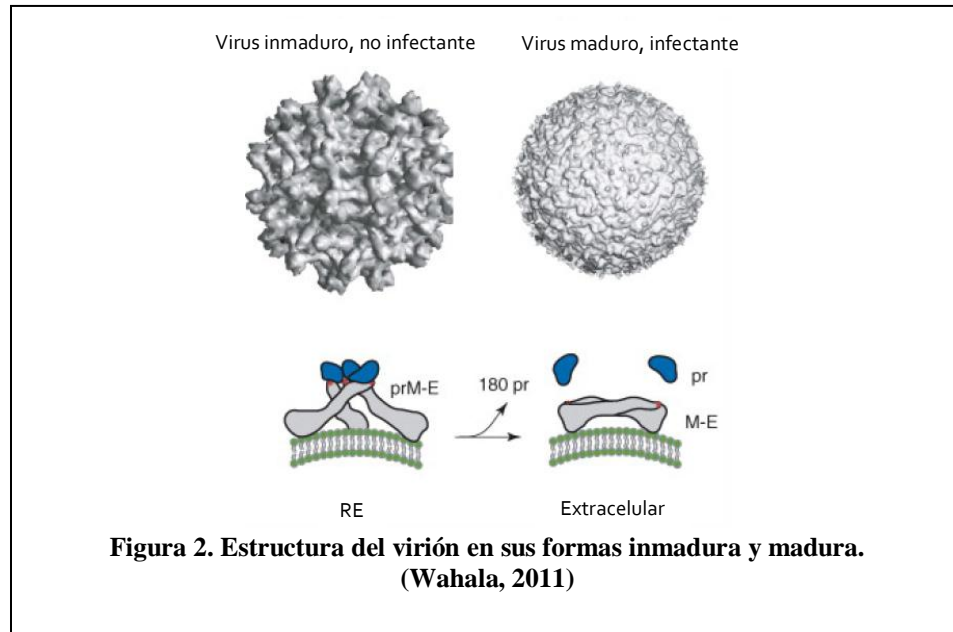


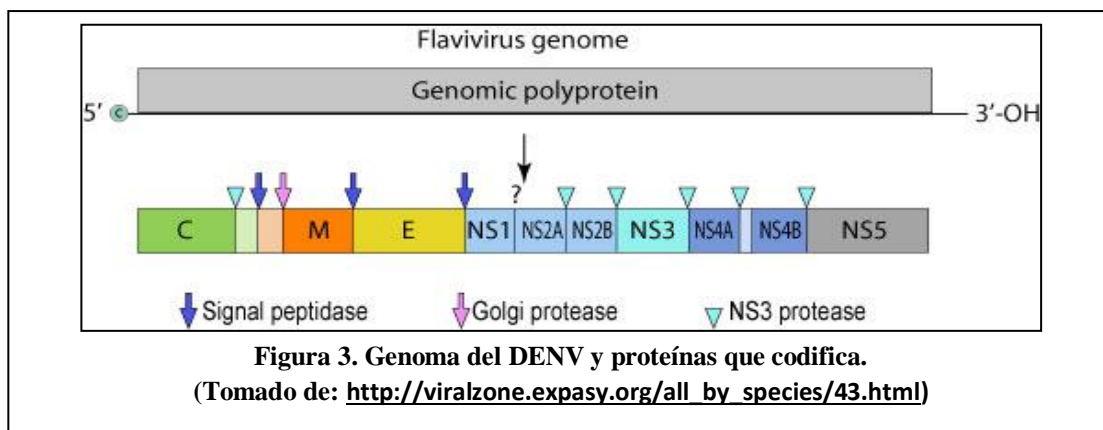
Figura 1. Estructura del virión del DENV.

Se han reconocido dos tipos de viriones (figura 2), los del tipo extracelulares maduros, que contienen proteínas E y M y viriones intracelulares inmaduros que poseen precursores de la proteína M (pr-M), la cual sufrirá un efecto proteolítico en el curso de su maduración (Wahala & Silva, 2011).



3.1.2 Genoma viral

El genoma del DENV es una molécula de RNA, cadena sencilla, sentido positivo, de aproximadamente 11,000 nucleótidos. En el extremo 5' hay una capucha tipo I ($m^7GpppAmp$) seguida de un dinucleótido muy conservado de AG, mientras que en el extremo 3' se encuentra una cola de poli-A. El genoma tiene un marco de lectura abierto de unos 10,200 nucleótidos, el cuál codifica para 10 proteínas: 3 estructurales y 7 no estructurales (Figura 3), (Mahy & Van Regenmortel, 2010).



Se han identificado distintos genotipos o linajes (virus muy relacionados en la secuencia de nucleótidos) dentro de cada serotipo, lo que destaca la extensa variabilidad genética de los serotipos del dengue. La selección parece ser un tema dominante en la evolución del virus del dengue pero de manera tal que solamente se mantienen los virus que son "adecuados" tanto para seres humanos como para los vectores. Entre ellos, los genotipos "asiáticos" de DEN-2 y DEN-3 se asocian con frecuencia a infecciones concomitantes graves. También se ha descrito diversidad viral en un mismo hospedero (cuasiespecie) en casos humanos (OPS, 2010).

3.1.3 Proteínas codificadas por el DENV

3.1.3.1 *Proteínas estructurales*

- Proteína de cápside (C)

Esta proteína (113 aminoácidos, 13-16 kDa), conforma la nucleocápside viral y está dispuesta alrededor del genoma. En particular, se han identificado dos dominios de alto carácter básico, ubicados en los extremos N y C terminales de esta proteína y que se unen específicamente a los NCR's 5' y 3' del genoma viral. Esta proteína puede encontrarse en las células infectadas en dos formas: la forma C_{anch} (proteína en forma de ancla, que corresponde a viriones inmaduros) y la forma C_{vir} que es la proteína asociada a viriones maduros (Beasley & Barret, 2008) y (Zuckerman, 2012).

La proteína core del DENV, se ha detectado en el núcleo, nucléolo, así como en el citoplasma de células infectadas por el DENV. Se ha demostrado que interactúa con una proteína celular reguladora, la ribonucleoproteína nuclear heterogénea K (hnRNPK), sugiriendo que además del rol que desempeña en cuanto al ensamblaje y la estructura del virión, pudiera estar involucrada en la regulación de la replicación viral (Beasley & Barret, 2008) .

- Proteínas de la envoltura (E y M)

La envoltura viral consiste en una bicapa lipídica en la cual están embebidas las proteínas de envoltura (E) y de membrana (M) (Wahala & Silva, 2011). La composición lipídica de la envoltura depende de la naturaleza de la membrana celular de la célula hospedera donde el virus brote.

La proteína M, se puede hallar en dos formas, dependiendo de la madurez del virus. En viriones inmaduros la proteína existe como pre-M (prM), conformada por 165 aminoácidos y glicosilada en el residuo 69 y se observa que forma un heterodímero con la proteína E (Wahala & Silva, 2011).

Esta unión E-prM es esencial para:

Un correcto plegamiento, asociación de membrana y ensamblaje de la proteína E. Sugiriendo que la prM actúa como una chaperona para el plegamiento de la proteína E, en el retículo endoplásmico.

Proteger a la proteína E de inactivación irreversible durante el transporte a la superficie celular en vesículas acidificadas generadas en el Aparato de Golgi.

La proteína E está involucrada en las principales funciones biológicas del virus. Se une a los receptores de las células hospederas, lo que favorece la fusión de membranas dependiente de la acidificación del pH, para que ocurra la endocitosis y es la hemaglutinina viral. (Malavige *et al.*, 2004). Es una proteína de 495 aminoácidos y esta glicosilada en los residuos 69 y 155; es el principal blanco de los anticuerpos neutralizantes y se ha observado que mutaciones en esta, influyen significativamente en la función y virulencia del virus. Además esta proteína, es altamente conservada, contiene 12 residuos conservados de cisteína, que forman 6 puentes disulfuro intermoleculares. Los residuos del 98 al 111 son los más conservados y se han detectado cambios estructurales en esta región seguido de un tratamiento de disminución del pH del virus. Al bajar el pH se induce la activación de la actividad de la fusión de membranas, que juega un papel importante en la infectividad del virus (Beasley & Barret, 2008).

3.1.3.2 Proteínas no estructurales

Son siete las proteínas del tipo no estructural, que se sintetizan en las células infectadas.

- NS1: proteína glicosilada de 44-49 kDa (353-354 aminoácidos), existe primero como un dímero lábil a la temperatura, pero puede ser encontrada en otras formas oligoméricas con actividades funcionales variadas. Se le ha encontrado asociada a la forma replicada de doble cadena del RNA, indicando que está involucrada en la replicación del RNA viral. Se cree que también juega un papel importante en el ensamblaje y la maduración.

- NS₂A: proteína tipo hidrofóbica y pequeña. Se cree que actúa como antagonista de la respuesta inmune innata y que influye directamente a la replicación del RNA viral, ya que se le ha encontrado unida específicamente a la región 3' no codificante de la plantilla del RNA viral y a otras proteínas asociadas a la replicación.
- NS₂B: es un cofactor requerido para la actividad proteolítica de la proteasa de la proteína NS₃. Es igualmente del tipo hidrofóbico y de tamaño pequeño. Tiene un dominio central hidrofílico unido por segmentos hidrofóbicos (Beasley & Barret, 2008).
- NS₃: es la segunda más grande (67-70 kDa; 618-623 aminoácidos). Es multifuncional, pues es una proteasa viral involucrada en la escisión de la poliproteína viral traducida (Beasley & Barret, 2008). Un tercio del extremo amino terminal, junto con la NS₂B forman el complejo viral de la serinproteasa. La porción carboxiterminal, contiene el dominio RNA de la helicasa, que participa en la replicación del RNA, y es probable que tenga cierta actividad como RNA trifosfatasa, lo que conlleva a la probable formación de la capucha del extremo 5' del RNA viral.
- NS₄A: es también una proteína pequeña e hidrofóbica. Se le ha hallado asociada a las proteínas NS₃/NS₅ y al RNA viral en su forma replicativa de doble cadena, influyendo significativamente en la replicación del RNA viral, anclando el complejo de replicación.
- NS₄B: ha sido identificada en asociación con membranas citoplasmáticas e involucrada con la replicación viral. Funciona como un antagonista del interferón.
- NS₅: es la proteína más grande y la mejor conservada, con 104-106 kDa; 900-905 aminoácidos. Entre sus funciones están la del extremo carboxiterminal, que codifica la enzima RdRp (RNA-dependent RNA polymerase), también conocida como replicasa que cataliza la replicación del RNA a partir de una plantilla de RNA, mientras que el extremo amino terminal contiene metiltransferasa. Se encuentra distribuida en dos lugares, en el citoplasma y en el núcleo.

Se ha propuesto que las proteínas NS₂A, NS₂B Y NS₄A, tienen una función de "viroporinas". Se ha visto que la expresión de estas proteínas en células de mamíferos, altera la permeabilidad de la membrana e inhiben el crecimiento. En células infectadas estas proteínas forman poros en las membranas celulares induciendo efecto citopático, (Beasley & Barret, 2008).

3.2 Epidemiología

Según la OMS, es indudable que la prevalencia del dengue ha visto un incremento en las últimas décadas. Es la enfermedad viral transmitida por mosquito de más rápida propagación en el mundo. Cerca del 40% de la población mundial vive en zonas endémicas de la enfermedad, y afecta prácticamente todas las regiones del mundo, exceptuando el continente Europeo.

Se comporta como epidemia cuando existen las condiciones apropiadas. La presencia de ciertas condiciones de endemidad y epidemidad, tales como la abundancia de grandes territorios infestados de mosquitos *Aedes*, grupos humanos susceptibles y la continua introducción y/o circulación de uno o más serotipos, favorecen las epidemias de FD y FHD. Los parámetros ambientales como la temperatura y la precipitación afectan la demografía y el comportamiento de los vectores; por lo tanto, el clima, el incremento desordenado de la población global, los viajes internacionales, la pobreza, y la falta de programas sustentables a varios niveles se asumen como factores contribuyentes. (Guzman & Isturiz, 2010)

En México, el dengue se encuentra presente desde la década de los años setenta con variaciones anuales en su incidencia y brotes epidémicos de diferentes magnitudes; las entidades con mayor presencia del virus son las localizadas al sur-sureste del territorio nacional, la zona del Pacífico y del Golfo. En esas regiones, la transmisión se presenta con mayor persistencia en siete entidades federativas que concentran ocho de cada 10 casos confirmados, lo que es atribuible a factores tales como la circulación viral, presencia y abundancia del vector, migración, densidad poblacional, intensificación de los fenómenos hidrometeorológicos y otros factores específicos. (Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud, 2008).

Adentrándonos un poco en cifras y en particular las de los últimos dos años, el panorama epidemiológico en México (InDRE, 2011 e InDRE, 2012) se resume en las siguientes tablas:

La tabla 1 muestra el número total de casos confirmados de dengue en México en los años 2011 y 2012 y las cifras respectivas a los casos de FD y de FHD en los mismos años.

Tabla 1. Panorama Epidemiológico de FD y FHD 2011 y 2012.

| Indicador | 2011 | 2012 |
|--------------------------|-------------|-------------|
| Casos FD | 10,970 | 32,662 |
| Casos de FHD | 4,608 | 17,706 |
| Total de casos de Dengue | 15,578 | 50,368 |
| Defunciones por FHD | 50 | 64 |
| Letalidad | 1.09% | 0.36% |

La tabla 2 se refiere al número de casos y el porcentaje de las tres entidades que tuvieron mayor número de notificaciones del total de casos confirmados:

Tabla 2. Entidades con mayor número de casos confirmados de Dengue en los años 2011 y 2012.

| Entidad | 2011 | | Entidad | 2012 | |
|---------------------|--------------------------|-------------------|---------------------|--------------------------|-------------------|
| | Casos confirmados | Porcentaje | | Casos confirmados | Porcentaje |
| Yucatán | 6,032 | 38.72 % | Veracruz | 12,572 | 24.96 % |
| Veracruz | 1,647 | 10.57 % | Yucatán | 5,654 | 11.22 % |
| Quintana Roo | 1,580 | 10.14 % | Guerrero | 4,505 | 8.94 % |
| Entidades restantes | 6,319 | 40.56 % | Entidades restantes | 27,637 | 54.87 % |

La tabla 3 nos muestra que la incidencia de FD y FHD se dio de manera muy similar para ambas, afectando principalmente a tres entidades:

Tabla 3. Entidades con mayor número de casos confirmados de FD Y FHD en 2011 y 2012.

| 2011 | | | | 2012 | | | |
|----------------|------------------------|----------------|------------------------|----------------|------------------------|----------------|------------------------|
| FD | | FHD | | FD | | FHD | |
| Entidad | Número de casos | Entidad | Número de casos | Entidad | Número de casos | Entidad | Número de casos |
| Yucatán | 3,982 | Yucatán | 2,050 | Veracruz | 7,531 | Veracruz | 5,041 |
| Veracruz | 996 | Quintana-Roo | 897 | Yucatán | 3,157 | Yucatán | 2,497 |
| Quintana-Roo | 683 | Veracruz | 651 | Guerrero | 2,606 | Guerrero | 1,899 |

En cuanto a grupos etarios y género, se observó lo siguiente:

La tabla 4 refiere los grupos etarios con mayor presencia de casos, tanto para FD, como para FHD.

Tabla 4. Casos confirmados de FD y FHD por grupo etario en 2011 y 2012.

| 2011 | | | | 2012 | | | |
|---------------------|-------------------|---------------------|-------------------|---------------------|-------------------|---------------------|-------------------|
| FD | | FHD | | FD | | FHD | |
| <i>Grupo etario</i> | <i>Porcentaje</i> | <i>Grupo etario</i> | <i>Porcentaje</i> | <i>Grupo etario</i> | <i>Porcentaje</i> | <i>Grupo etario</i> | <i>Porcentaje</i> |
| 15-19 años | 16.49% | 15-19 | 16.92% | 15-19 | 15.32 % | 15-19 | 16.00 % |
| 10-14 años | 14.40% | 20-24 | 13.45% | 10-14 | 14.28 % | 20-24 | 12.09 % |
| 20-24 años | 11.12% | 25-29 | 10.41% | 20-24 | 11.63 % | 10-14 | 10.54 % |
| Grupos restantes | 57.99% | Grupos restantes | 59.22% | Grupos restantes | 58.75 % | Grupos restantes | 61.35 % |

La tabla 5 deja ver que género tiene más presencia de FD y FHD.

Tabla 5. Casos confirmados de FD y FHD por género en 2011 y 2012.

| 2011 | | | | 2012 | | | |
|---------------|-------------------|---------------|-------------------|---------------|-------------------|---------------|-------------------|
| FD | | FHD | | FD | | FHD | |
| <i>Género</i> | <i>Porcentaje</i> | <i>Género</i> | <i>Porcentaje</i> | <i>Género</i> | <i>Porcentaje</i> | <i>Género</i> | <i>Porcentaje</i> |
| Femenino | 54% | Femenino | 50% | Femenino | 55 % | Femenino | 50 % |
| Masculino | 46% | Masculino | 50% | Masculino | 45 % | Masculino | 50 % |

A través de la historia se ha observado que el dengue se presenta en brotes cíclicos y están asociados a los serotipos de DENV circulantes. Asimismo se ha visto que independientemente de que pueden estar presentes hasta los cuatro serotipos de dengue, existe predominancia de alguno de ellos al concentrar anualmente en promedio el 85% de los aislamientos realizados (CONAVE, 2011).

El periodo 1995 -1999 fue dominado por el DENV-3, seguido por el DENV-2 del 2000 al 2005 y desde el 2006 el serotipo predominante ha sido el DENV-1. El DEN-4 se ha presentado de

manera aislada y hasta ahora sin significancia relevante en los brotes de este padecimiento. En los últimos seis años, el seguimiento del serotipo viral muestra que el DENV1 ha predominado, como ya se había dicho con anterioridad. La tabla 6 muestra información más detallada sobre el seguimiento de los serotipos en los últimos cuatro años (CONAVE, 2011).

Tabla 6. Predominancia de serotipos virales de DENV de 2009-2011.

| Año | Serotipo predominante | Otros serotipos identificados |
|----------|-----------------------|--|
| 2009* | DENV-1 (2,390 casos) | DENV-2 (491 casos), DENV-3 (2 casos en Jalisco) DENV-4 (1 caso en Chiapas) |
| 2010** | DENV-1 (1,340 casos) | DENV-2 (255 casos), DENV-3 (3 casos en Guerrero) DENV-4 (8 casos en Chiapas y 1 en San Luis Potosí) |
| 2011*** | DENV-1 (865 casos) | DENV-2 (582 casos), DENV-3 (1 caso en Quintana Roo), DENV-4 (20 casos en Chiapas, 4 en Jalisco y 1 en Oaxaca y Veracruz cada uno) |
| 2012**** | DENV-1 (2,833 casos) | DENV-2 (2,663 casos), DENV-3 (9 casos), DENV-4 (74 casos) |

*(InDRE, 2009), ***(InDRE, 2010), *****(InDRE, 2011), ******(InDRE, 2012)

Comparando los últimos dos años, en el 2012 se observó un aumento de dos veces el número de casos confirmados por dengue total, siendo el porcentaje de variación de 223.3 % y de casi tres veces de FHD con un porcentaje de variación de 284.2 % con respecto al 2011.

Lo anterior puede explicarse por tres razones, la primera que hay mayor precisión diagnóstica, la segunda por un aumento de la transmisión que se traduce en un aumento de la positividad debido al cambio de circulación de serotipos, y la tercera que un 16.4% de los casos son confirmados por la prueba IgG, la cual indica casos que se reinfectan por diferente serotipo, (InDRE, 2012).

3.3 El vector

Como ya se mencionó, los diferentes serotipos del DENV pertenecen a la familia Flavivirus y se transmiten a los humanos mediante picaduras de mosquitos hembras hematófagas infectadas del género *Aedes* (*Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Aedes polynesiensis*).

En base al hecho de que los flavivirus son transmitidos entre hospederos vertebrados, por mosquitos o garrapatas (artrópodos), han sido nombrados "arbovirus" (Halstead, 2008; Krauss, 2003)

El principal vector es la especie *Aedes aegypty*, este mosquito es una especie tropical y subtropical ampliamente distribuida alrededor del mundo, especialmente entre las latitudes 35°N y 35°S (Secretaría de Salud, 2005; Mandell, 2006 2; OPS, 2010). Ellos descansan al interior de las casas, principalmente en salas de estar y recámaras, lo que maximiza el contacto vector-humano y minimiza la exposición del vector a los insecticidas esparcidos en el exterior, contribuyendo a la dificultad en el control del insecto. Las etapas inmaduras se pueden criar en hábitats cubiertos de agua, principalmente en recipientes artificiales estrechamente asociados con viviendas humanas y a menudo bajo techo. Los huevecillos sobreviven largos periodos y son resistentes a la desecación. Una disposición inadecuada de la basura y las malas o nulas condiciones del servicio de drenaje, ambas consecuencia de una urbanización mal planeada, pudieran resultar en una elevación de la densidad poblacional de los mosquitos, sobre todo en áreas endémicas (Malavige *et al.*, 2004).

Otras especies de moscos a considerar como vectores del virus del dengue son el *Aedes albopictus*, *Aedes polynesiensis* y varias especies del complejo *Aedes scutellaris*, pero solo en áreas aisladas geográficamente y en circunstancias especiales (Halstead, 2008). Cabe mencionar que en décadas recientes *A. albopictus* se ha propagado de Asia a África, las Américas y Europa, con la notable ayuda del comercio internacional de llantas usadas, en las cuales se depositan los huevos cuando contienen agua de lluvia.

La población de larvas de mosquitos se incrementa significativamente durante las épocas de lluvia. Esta es la razón por la cual las epidemias de dengue tienden a coincidir con las estaciones lluviosas. Además la temperatura ambiental y la humedad relativa afectan la propagación viral en los mosquitos; las tasas se elevan en climas parecidos a las épocas lluviosas. Las temperaturas ambientales también afectan la fase aguda de viremia en los mosquitos hembra, siendo más cortos a temperaturas altas.

Después de que un mosquito pica a un humano infectado, los virus del dengue entran al mosquito adulto hembra. Los virus se replican inicialmente en el intestino medio, alcanzan la hemolinfa, y entonces ganan acceso a diferentes tejidos del mosquito. Después de la replicación viral en las glándulas salivales, el mosquito infectado puede transmitir el virus a otro humano. Estudios ultraestructurales han demostrado partículas virales en el sistema nervioso, glándulas salivales, intestino anterior y medio, tejido graso, células epidérmicas,

ovario y revestimiento celular interno del mosquito. En contraste, el músculo, el intestino grueso y los túbulos de Malpighi no tienen presencia de partículas virales.

Los mosquitos infectados tienen un tiempo de alimentación más largo. Esto contribuye a la eficiencia del *A. aegypti* como vector del virus del dengue. Este incremento en los tiempos de alimentación, se debe a la infección por el virus, pues se afectan los órganos que controlan o influyen en las actividades asociadas con la alimentación.

Varios estudios sugieren la existencia de una transmisión transovárica del virus del dengue, permitiendo la propagación del virus a la progenie. Este proceso actúa como un reservorio del virus durante periodos interepidémicos (sin ninguna participación humana o de otro hospedero vertebrado). La transmisión sexual también se ha reportado dándose del macho a la hembra, pero no de la forma contraria (Malavige *et al.*, 2004).

3.3.1 Transmisión viral

El ser humano es el principal hospedero del virus. El vector se infecta del virus del dengue cuando pica a algún humano en etapa de viremia (etapa que dura en promedio cinco días). El virus que está circulando en sangre es ingerido por los mosquitos hembra, e infecta el intestino medio del mosquito, posteriormente hay propagación sistémica durante un período de 8 a 12 días (período de incubación extrínseco). Después el mosquito permanece infeccioso durante el resto de su vida, razón por la cual el virus se transmite a otros seres humanos durante la picadura y alimentación subsiguiente del mosquito (Secretaría de Salud, 2005 y OPS, 2010).

Existen varios factores que pueden influir en la dinámica de la transmisión del virus, incluidos factores ambientales y climáticos, interacciones entre hospederos y patógenos y factores inmunológicos de la población. Estos factores son determinantes en la epidemia de enfermedades transmitidas por vector, (OPS, 2010).

3.4 Vigilancia Epidemiológica

La vigilancia epidemiológica es el estudio permanente y dinámico del estado de salud en la población, su principal propósito es presentar opciones que conlleven a la toma de decisiones. Operativamente incluye la recopilación, procesamiento y análisis de los daños y riesgos en salud. De acuerdo con la estructura del Sistema Nacional de Salud y de la

Secretaría de Salud, corresponde a la Dirección General Adjunta de Epidemiología coordinar la elaboración de las normas y procedimientos para la vigilancia epidemiológica de dengue en México (InDRE/SINAVE, 2008).

3.4.1 Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica

El SINAVE capta, registra y analiza los datos de morbilidad, mortalidad, daños y riesgos en salud (en este caso específicamente para dengue) a través del Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica (SUIVE).

3.4.2 Definiciones operacionales de caso

Para propósitos de la vigilancia epidemiológica, se han elaborado definiciones operacionales de caso para poder unificar los criterios para la detección, notificación y clasificación de los casos de dengue. Estas definiciones se caracterizan por tener elevada sensibilidad pues se requiere detectar la mayoría de los casos a través de los signos y síntomas más frecuentes de la enfermedad y de pruebas de tamizaje (InDRE/SINAVE, 2008 y CONAVE, 2011).

La confirmación del diagnóstico está dada por los estudios de laboratorio, por lo que es fundamental contar con los resultados virológicos, serológicos y de gabinete correspondientes para el adecuado seguimiento del caso hasta su clasificación final (InDRE/SINAVE, 2008).

Caso Sospechoso de Fiebre por Dengue: Toda persona de cualquier edad que resida o proceda de una región en la que haya transmisión de la enfermedad y que presente cuadro febril inespecífico o compatible con infección viral.

Caso Probable de Fiebre por Dengue: Todo caso sospechoso que presente fiebre y dos o más de las siguientes características: cefalea, mialgias, artralgias, exantema o dolor retroocular. En menores de 5 años, el único signo a considerar puede ser la fiebre.

Caso Confirmado de Fiebre por Dengue: Todo caso probable en el que se confirme infección reciente por denguevirus mediante técnicas de laboratorio, o que esté asociado epidemiológicamente a otro caso confirmado y no se disponga de resultado de laboratorio.

Caso Probable de Fiebre Hemorrágica por Dengue: Toda persona que además de un cuadro probable de Fiebre por Dengue desarrolle fiebre y una o más de las siguientes características: datos de fuga de plasma (ascitis, derrame pleural, edema, hipoalbuminemia); o datos de fragilidad capilar (petequias, equimosis, hematomas); o hemorragias a cualquier nivel (gingivorragia, hematemesis, metrorragia); o trombocitopenia menor a 100 mil plaquetas por mL³ o hemoconcentración con uno o más de los siguientes datos: incremento del hematocrito (Hto) 20% o más en la fase aguda; decremento del Hto en 20% después del tratamiento; tendencia del Hto en muestras secuenciales (por ejemplo, 40, 43, 45, etc.); relación hematocrito/hemoglobina (Hto/Hb): sugestivo 3.2 a 3.4, indicativo 3.5 o mayor; o hipoalbuminemia.

Caso Confirmado de Fiebre Hemorrágica por Dengue: Toda persona con un cuadro probable de Fiebre Hemorrágica por Dengue confirmado por laboratorio que, además, presente lo siguiente:

Datos de fuga de plasma evidenciada por cualquiera de los siguientes:

CLINICA: Edema, piel moteada, ascitis o derrame pleural

LABORATORIO: Medición de la hemoglobina y el hematocrito, elevación en 20% en etapa aguda, disminución de 20% en etapa de convalecencia, o elevación del hematocrito o la hemoglobina en forma secuencial (a partir del tercer día) o hipoalbuminemia.

GABINETE: Ultrasonido (líquido perivisceral y en cavidad abdominal o torácica) y radiología (derrame pleural o ascitis).

Más uno de los siguientes datos:

Evidencia de fragilidad capilar: prueba de torniquete positiva (a partir del tercer día); (petequias, equimosis, hematomas, etc.)

Trombocitopenia menor de 100 mil plaquetas por mL³

Caso Probable de Síndrome de Choque por Dengue: Toda persona con cuadro probable de FD o FHD y que presente súbitamente datos de insuficiencia circulatoria

(pulso rápido y débil, extremidades frías); alteraciones en el estado de conciencia (confusión mental); tensión arterial disminuida o reducción en la tensión diferencial sistólica-diastólica menor a 20 mm/Hg, ejemplo 90/80 o 80/70, etc.; o bien, estado de choque profundo.

Caso Confirmado de Síndrome de Choque por Dengue: Todo caso probable de SCD en el que se confirme infección reciente por dengue mediante técnicas de laboratorio.

3.4.3 Vigilancia Viroológica

Una parte importante de la vigilancia epidemiológica de dengue es la vigilancia virológica, la cual analiza la distribución anual de los diferentes serotipos de DENV. Esto permite identificar serotipos asociados a cuadros de mayor severidad o predecir la posible variación cíclica de estos serotipos y, por tanto, el aumento de la susceptibilidad y el mayor impacto de la enfermedad (Vazquez, 2011).

Esta vigilancia virológica la lleva a cabo el InDRE, operando de la siguiente manera: todos los LESP enviarán los días martes la base nominal completa acumulada de datos en formato electrónico. La base será procesada por el InDRE para realizar la selección aleatoria de las muestras que serán solicitadas. Durante la semana posterior a la recepción de la base electrónica se informará a los LESP, vía correo electrónico, la relación de muestras que deberán enviar y la fecha en que deberán realizar el envío.

En el caso de FD el InDRE seleccionará el 10% de las muestras positivas a NS₁, para FHD se seleccionará el 100% de las muestras positivas a NS₁, que serán procesadas para aislamiento viral. Además de aislamiento viral, en todas las formas graves y en casos de extrema urgencia de FHD el InDRE realizará RT-PCR.

Por otra parte para la evaluación del nuevo algoritmo el InDRE también realizará la selección aleatoria del 10% de las muestras negativas (para IgM, IgG o NS₁), que les serán solicitadas dos semanas después a la recepción de la base nominal. (InDRE, 2008)

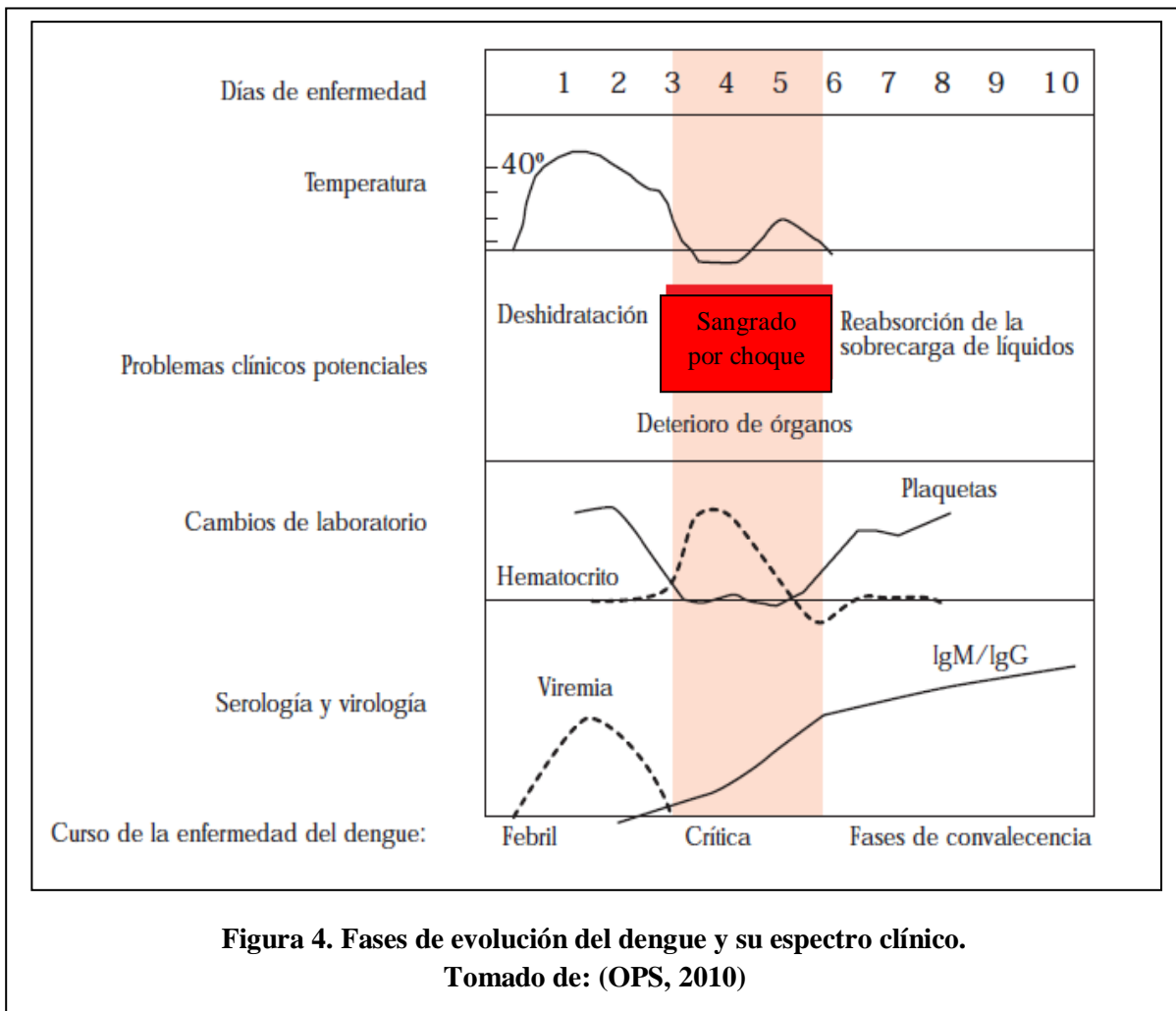
3.5 Características clínicas de la enfermedad

La infección con el virus de dengue (DENV) puede resultar como una infección subclínica, con fiebre indiferenciada, pasando por un cuadro febril parecido a influenza conocido como

fiebre por dengue, hasta manifestación severa con presencia de hemorragias, denominadas fiebre hemorrágica por dengue, o evolucionar hacia un síndrome de choque por dengue.

La infección por dengue es una enfermedad sistémica y dinámica. Presenta un amplio espectro clínico que incluye manifestaciones clínicas graves y no graves.

Después del período de incubación, la enfermedad comienza abruptamente y le siguen tres fases de evolución: la febril, la crítica y la de convalecencia (figura 4).



A pesar de la complejidad de las manifestaciones que esta enfermedad genera, si se actúa correcta y oportunamente se pueden salvar muchas vidas, ya que el manejo es sencillo y económico. Detectar infecciones en etapas tempranas y llevar un seguimiento de las manifestaciones clínicas en cada fase de la enfermedad es de suma importancia para mantener controlados los casos y llegar a un buen final clínico.

3.5.1 Fases de la enfermedad

Fase febril: El desarrollo de fiebre alta, de manera abrupta, es común. La fase febril dura de 2 a 7 días y puede acompañarse de rubor facial, eritema de la piel, dolor corporal generalizado, mialgias, artralgias y cefalea. Puede presentarse dolor de garganta, faringe dilatada por agrandamiento de sus vasos sanguíneos e inyección conjuntival (ojos enrojecidos), así como anorexia, náuseas y vómito.

Los estadios tempranos de esta fase, son difíciles de diferenciar clínicamente de otras enfermedades febriles sin relación alguna con el dengue. Si la prueba del torniquete en esta fase resulta positiva, aumentan las probabilidades de que sea dengue.

Pudieran presentarse manifestaciones hemorrágicas leves (petequias y sangrado de mucosas por ejemplo, nasal y de las encías). El sangrado vaginal masivo (mujeres en edad fértil) y el sangrado gastrointestinal pueden ocurrir en esta fase, pero no es común. El hígado a menudo está aumentado de tamaño y blando después de algunos días de fiebre. Las anormalidades se empiezan a manifestar en el cuadro hemático, observándose una reducción progresiva del número total de glóbulos blancos.

Fase crítica: Esta fase inicia cuando la fiebre disminuye, que baja alrededor de los 37.5 °C, 38 °C o menos y permanece por debajo de este valor (usualmente en los días 3 a 7 de la enfermedad). En este momento pudiera presentarse un aumento en la permeabilidad capilar, y en los valores del hematocrito. La extravasación de plasma dura generalmente entre 24 y 48 horas, seguido de una leucopenia progresiva y la disminución del número de plaquetas. Los pacientes que no presentan aumento de la permeabilidad capilar mejoran, mientras que los que tienen un aumento de la permeabilidad capilar pueden empeorar como resultado de la pérdida del volumen plasmático.

Cuando hay una pérdida crítica del volumen plasmático debida a la extravasación, puede presentarse un choque. Durante un choque prolongado se presenta hipoperfusión, resultando en deterioro orgánico progresivo, acidosis metabólica y coagulación intravascular diseminada, que a su vez lleva a una hemorragia seria que hace que el hematocrito disminuya, ya no se presenta leucopenia, sino que el número total de glóbulos blancos puede aumentar en los pacientes con sangrado grave.

Fase de recuperación: Si el paciente sobrevive a la fase crítica, en las siguientes 48 a 72 horas tiene lugar una reabsorción gradual de los líquidos del compartimiento extravascular. Mejora el bienestar general, regresa el apetito, disminuyen los síntomas gastrointestinales, se

estabiliza el estado hemodinámico y se presenta diuresis. El hematocrito se estabiliza o puede ser menor debido al efecto de dilución de los líquidos reabsorbidos. El conteo de leucocitos generalmente comienza a subir inmediatamente después de la disminución de la fiebre, aunque la recuperación del número de plaquetas generalmente es posterior al del número de leucocitos.

3.6 Análisis de riesgo biológico

La evaluación del riesgo biológico es de suma importancia para la bioseguridad en el laboratorio. Existen muchas herramientas para ayudar a evaluar el riesgo que implica un procedimiento o un experimento determinado, pero el componente más importante es el juicio profesional.

Las evaluaciones del riesgo deben ser efectuadas por las personas que mejor conozcan las características particulares de los organismos con los que se va a trabajar, el equipo y los procedimientos que van a emplearse, los modelos animales que pueden utilizarse y el equipo y los medios de contención disponibles.

Una de las herramientas más útiles de que se dispone para llevar a cabo una evaluación del riesgo microbiológico es la asignación de los agentes microbiológicos a uno de los grupos de riesgo, pero esto no basta, es necesario tener en cuenta otros factores como la patogenicidad, la vía natural de infección, además de otras vías de infección derivadas de manipulaciones en el laboratorio (parenteral, aérea, por ingestión), la estabilidad del agente en el ambiente, la concentración del agente y el volumen del material concentrado que va a manipularse, la presencia de un hospedero apropiado (personas o animales) y la disponibilidad local de intervenciones profilácticas o terapéuticas eficaces, entre otras (OMS, 2005).

Sobre la base de la información obtenida durante la evaluación de riesgos, se podrá asignar un nivel de bioseguridad al trabajo previsto, seleccionar el equipo de protección apropiado para el personal, y elaborar procedimientos normalizados de trabajo que incorporen otras intervenciones de seguridad con el fin de velar por la máxima seguridad en la realización del trabajo.

Las muestras que se procesarán durante el trabajo de esta tesis son sueros de pacientes potencialmente infectados con algún serotipo del virus del dengue. No obstante estas

muestras son fuente de riesgo, ya que pueden contener otros microorganismos infecciosos. Son muestras clínicas o epidemiológicas para las que se dispone de información limitada, por lo que conviene que la manipulación de las muestras se realice con prudencia.

Los *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), designan a los Dengue Virus como microorganismos infecciosos del Grupo 2 de riesgo de la OMS (*Centers for Disease Control and Prevention*, 2009), este grupo representa riesgo individual moderado y riesgo poblacional bajo. Los agentes patógenos designados a este grupo de riesgo, pueden provocar enfermedades humanas o animales pero tienen pocas probabilidades de entrañar un riesgo grave para el personal de laboratorio, la población, el ganado o el medio ambiente. Las rutas de transmisión incluyen la existencia de alguna lesión cutánea, ingestión y exposición de membranas mucosas. El contacto en el laboratorio puede provocar una infección grave, pero existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces y el riesgo de propagación es limitado.

Por lo anterior las instalaciones requeridas para trabajar corresponden a las de un Laboratorio de nivel 2 de bioseguridad, las cuáles son cubiertas por el LCE.

Las principales exigencias de este tipo de laboratorio, son:

- Acceso limitado

- Símbolos de riesgo biológico

- Técnicas microbiológicas apropiadas

- Precaución con los punzocortantes

- Manuales que especifiquen cualquier método de descontaminación y desecho de Residuos Peligrosos Biológicos Infecciosos (RPBI).

- Políticas de Vigilancia Médica

- Barreras de contención primaria y equipo de protección personal:

 - Cabinas de Bioseguridad u otros dispositivos físicos usados para la manipulación de agentes infecciosos que generan salpicaduras y aerosoles.

 - Equipo de Protección Primaria: batas de laboratorio, guantes, cubre bocas y lentes de seguridad.

- Barreras de contención secundaria

- Bancos de laboratorio, una tarja y una autoclave.

La desinfección del laboratorio implica tratamiento de las superficies con un desinfectante eficiente como es el etanol al 70% e hipoclorito de sodio al 5%. La desinfección de cabinas de

seguridad biológica, se realiza con luz UV por quince minutos y posterior a esta desinfectar con etanol al 70%, antes y después de utilizarla.

Los desechos que se generan, en su mayoría corresponden a materiales RPBI que se clasifican dentro del grupo de los no anatómicos sólidos, por lo que son colocados en bolsa roja.

Existen residuos líquidos potencialmente infectantes que son colocados en un recipiente con cloro, donde se inactivan por 24 hrs para su posterior desecho al drenaje.

Los materiales reutilizables, son inactivados con etanol o hipoclorito, lavados y preparados para su posterior esterilización.

Los residuos que no están contaminados con agentes peligrosos, pueden ir a la basura municipal en bolsa negra o verde (en el caso del IMSS).

3.7 Diagnóstico por Laboratorio

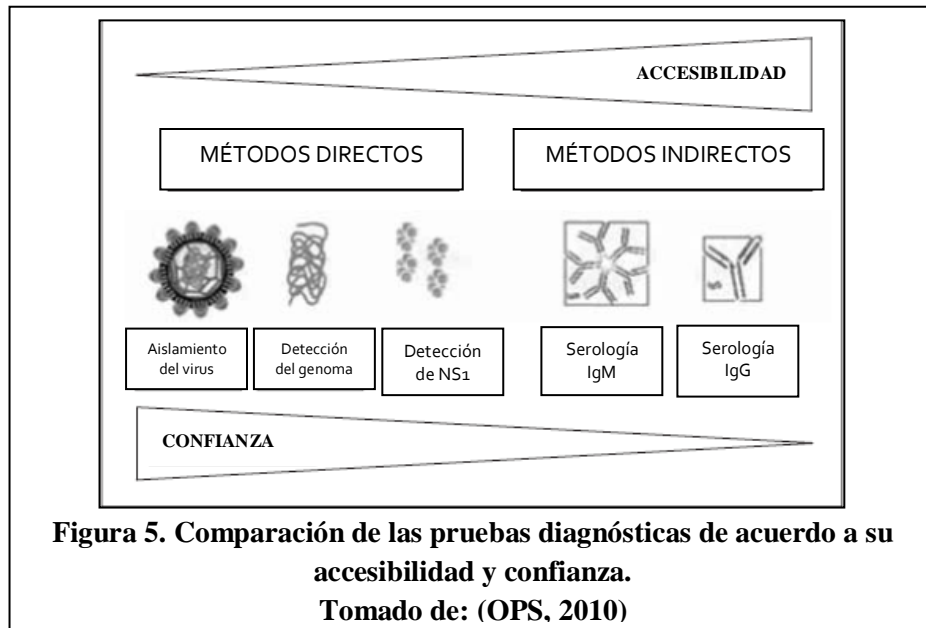
Poder realizar un diagnóstico oportuno y eficaz del dengue es de suma importancia para la atención clínica, pues implica la detección temprana de casos graves, la confirmación de casos y el diagnóstico diferencial con otros padecimientos infecciosos, actividades de vigilancia y control de brotes.

Existen diversos exámenes de laboratorio útiles para confirmar la infección por el virus del dengue y pueden ser, el aislamiento del virus, la detección del ácido nucleico viral, de antígenos y de anticuerpos (Guzman, 2004 y OPS, 2010). La utilización de cada uno de ellos dependerá de la finalidad con la que se hacen las pruebas, el tipo de laboratorio, la capacitación técnica del personal y los costos.

La accesibilidad de cada una de las pruebas es variable; en general las técnicas con elevada sensibilidad y especificidad requieren de experiencia y capacitación técnica y de tecnologías más complejas, haciéndolas menos accesibles en comparación con las de menor sensibilidad y especificidad, ya que al sacrificar estos parámetros ofrecen gran accesibilidad, al ser de mayor rapidez y fácil aplicación.

Como lo muestra la figura 5, podemos clasificar las técnicas en directas e indirectas: las primeras corresponden a aquellas que detectan al virus mismo (aislamiento viral, el ácido

nucleico o algún antígeno), mientras que las segundas son las que detectan la respuesta que el virus generó en el hospedero, que implica la detección de anticuerpos. Existe una relación inversa entre la accesibilidad de la prueba y la confianza en los resultados.



Las técnicas de laboratorio para la detección de infecciones por el virus de dengue, se determinan dependiendo del tiempo de iniciada la fiebre.

Un mosquito infectado al alimentarse, inyecta su saliva infestada del virus a un hospedero, supongamos un humano. El periodo de incubación dura de tres a siete días (antes de que se inicie la fiebre). El virus se adhiere y replica en las células dendríticas de la piel, sigue replicando y se disemina a distintos órganos linfoides del cuerpo, produciéndose una viremia aproximadamente en los tres a cinco días posteriores a la inoculación y que puede durar otros cuatro a cinco días. Así mismo el inicio de la fiebre y otros síntomas ocurren 24 horas después del comienzo de la viremia y dura aproximadamente de 4-5 días, seguida del cese de la fiebre.

En este periodo el virus y el antígeno viral pueden ser detectados en el suero. Los métodos empleados son:

Métodos virológicos: útiles para aislar el virus, así como para identificar su serotipo.

Cultivo celular: se utilizan células de mosquitos [C6/36 (*A. albopictus*), AP61 (*A. pseudoscutellaris*)] y en células de mamífero [Vero (riñón de mono verde), BHK21 (riñón de hámster)].

Biología molecular: se emplean las técnicas de RT-PCR en tiempo real.

Métodos inmunoenzimáticos: de utilidad debido a las altas concentraciones de antígeno viral NS1 durante la fase aguda de la enfermedad.

ELISA: no determina el serotipo viral, solo si es infección por algún DENV.

Después del sexto día de iniciada la fiebre se pueden detectar anticuerpos, para lo cual se utilizan métodos serológicos de diagnóstico, que corresponde al ensayo de ELISA de captura. Aquí es importante diferenciar que la respuesta de anticuerpos generada, difiere según el estado inmunitario del individuo, generándose así una infección primaria o una del tipo secundaria.

- *Infección primaria:* En personas que no han estado infectadas con el virus del dengue o que no han sido infectadas o inmunizadas con algún otro flavivirus, la respuesta que generan es del tipo primaria y humoral. Los anticuerpos IgM son el primer isotipo de inmunoglobulinas que aparecen. El aumento es lento, y es posible detectarlo desde el tercer día posterior al inicio de la fiebre en un 50% de los pacientes. Al quinto día se detecta en el 80% de los individuos, y al décimo en un 90% de ellos. El pico máximo se logra ver a los quince días y decae a niveles no detectables en los siguientes dos o tres meses. Los anticuerpos IgG se pueden detectar al final de la primera semana en títulos bajos y aumentan lentamente desde entonces, son detectables varios meses después o incluso de por vida.
- *Infección secundaria:* La respuesta secundaria se presenta en individuos que habían estado expuestos a uno o más flavivirus, ya sea por infección natural o por inmunización. La inmunidad homóloga contra el mismo serotipo de DENV es de por vida, existe un periodo corto de protección cruzada frente a otros DENV u otros flavivirus, pero una vez terminado este periodo, la posibilidad de infectarse es alta (Endy, T., [et.al], 2008).

El primer isotipo en aparecer es el IgG, se puede detectar desde etapas febriles, se incrementa rápidamente y es generado por la respuesta inmune de memoria o anamnésica, estos anticuerpos perduran por 10 meses o inclusive de por vida. A la

par, se genera una respuesta inmune primaria, generada por los nuevos epítomos del virus, clonas vírgenes son estimuladas por estos epítomos y se generan anticuerpos del tipo IgM. La magnitud de la respuesta está condicionada al número de epítomos nuevos que se reconozcan y generalmente siempre resulta menor la cantidad de IgM generada en una respuesta secundaria.

La sintomatología del dengue es muy variable, muchos de los síntomas son inespecíficos, por lo cual no se puede confiar solo en un diagnóstico basado en la clínica. Realizar un diagnóstico temprano por laboratorio es importantísimo, pues hay pacientes que evolucionan rápidamente de formas leves a graves.

3.7.1 Implementación del algoritmo diagnóstico por laboratorio para FD y FHD.

La necesidad de mejorar el diagnóstico oportuno del dengue, llevó al Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (InDRE) a desarrollar un nuevo algoritmo de diagnóstico en el que se incluyó una combinación de todas las técnicas antes mencionadas. Este nuevo algoritmo fue propuesto y consensado en distintas reuniones entre los laboratorios de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública (RNLSP) y el InDRE.

La implementación de este nuevo algoritmo derivó de dos necesidades básicas: la primera, la de mejorar el porcentaje de casos confirmados por laboratorio, con respecto de los casos probables utilizando una sola muestra, y la segunda, la de aumentar la vigilancia virológica en el país. Finalmente la solicitud por parte del InDRE a la RNLSP, fue iniciar la implementación a partir del mes de abril de 2008 (InDRE, 2008).

Particularmente la inclusión al algoritmo diagnóstico de la técnica de detección del antígeno NS₁, reside en que se buscaban técnicas diferentes a la búsqueda de anticuerpos en la fase aguda de la enfermedad. La glicoproteína NS₁ es producida por todos los flavivirus en grandes cantidades, tanto en infecciones primarias como en secundarias (Shu & Huang, 2004; Thomas *et al.*, 2010; Alcon *et al.*, 2002). Esta proteína de tipo no estructural, interviene en procesos de replicación viral, por lo cual se encuentra en niveles elevados en los primeros días de la enfermedad (1-5 días después de iniciada la fiebre), lo que resulta ventajoso para realizar un diagnóstico temprano y para utilizarlo como un marcador de viremia. También se ha observado que elevados niveles de NS₁ se correlacionan con desarrollo de FHD, así mismo se ha visto que es más común encontrar niveles altos de esta proteína en pacientes con FHD, que en aquellos con FD (Guzman & Kouri, 2004; Alcon *et al.*, 2002; Thomas *et al.*, 2010; Shu & Huang, 2004; Pawitan, 2011).

Desde el año 2000 se han hecho pruebas del rendimiento y utilidad de la técnica para detección de antígenos NS1 por ELISA (Guzman & Kouri, 2004). A finales del año 2006 apareció una alternativa en formato de ELISA más fácil, rápida y oportuna para aplicar en los primeros días. Esta prueba tiene reportada una sensibilidad entre el 80-100% dependiendo del serotipo que haya sido el infectante y una especificidad de 100% .(InDRE, 2008)

Es entonces que esta prueba se consideró para utilizarse en el nuevo algoritmo y a pesar de que por sí misma la prueba no detecta serotipos virales, es de gran utilidad ya que favorece la detección temprana de la enfermedad y sirve como punto de partida para tamizar aquellas muestras que son idóneas para identificar el serotipo viral.

La Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2010, para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vector, establece en su numeral 7.1.2 los procedimientos para el diagnóstico del dengue. Este numeral explica detalladamente, desde la toma de muestra, el procesamiento y manejo de la misma, así como el algoritmo diagnóstico por laboratorio de FD y FHD.

La muestra obtenida debe ser sangre, (5 mL aproximadamente), que será procesada para separar el suero (2.5 mL aprox.) y enviarlo al laboratorio correspondiente para el ensayo. Es importante que desde la toma, hasta su llegada al laboratorio se mantenga en refrigeración (4-5°C). Así mismo, la muestra debe venir acompañada del formato único de envío de muestras o del formato de estudio de caso de FD y FHD.

Teniendo la muestra, se establece el número de días desde el inicio de la fiebre, hasta la toma de muestra y se inicia el algoritmo dependiendo de este número (diagrama 1, anexo 13.1):

- Para muestras de 0-5 días. Las técnicas alternativas para descartar o confirmar un caso probable son:
 - ❖ Determinación del antígeno NS1.
 - Positiva.** Se confirma caso
 - Dudosa.** Se repite por duplicado para la misma prueba. Si vuelve a resultar dudosa, pasa a la siguiente determinación.
 - Negativa.** Se procede como se indica a continuación.
 - ❖ Determinación de IgM por ELISA, únicamente para las muestras que tengan entre 4-5 días de haber iniciado la fiebre.

Positiva. Se confirma caso.

Dudosa. Se repite por duplicado para la misma prueba. Si vuelve a resultar dudosa, pasa a la siguiente determinación.

Negativa. Se procede con la siguiente determinación.

- ❖ Determinación de IgG por ELISA. Únicamente para muestras que estén entre 0-3 días después del inicio de los síntomas.

Positiva. Se confirma caso.

Dudosa. Se repite por duplicado para la misma prueba. Si vuelve a resultar dudosa, se debe enviar al InDRE para referencia.

Negativa. Una muestra negativa a las tres pruebas previas se considera negativa a dengue y se continúa con el diagnóstico diferencial para EFE (Enfermedades Febriles y Exantemáticas o Leptospira, Rickettsias, Hantavirus (en caso de signos hemorrágicos). Ante casos de fiebre icterohemorrágica y viajeros de zona endémica se sugiere realizar diagnóstico diferencial para Fiebre Amarilla.

Para muestras de más de 6 días. Se inicia el procedimiento con:

- ❖ Determinación de IgM por ELISA

Positiva. Se confirma caso.

Dudosa. Se repite por duplicado para la misma prueba. Si vuelve a resultar dudosa, pasa a la siguiente determinación.

Negativa. Se procede con la siguiente determinación.

- ❖ Determinación de IgG por ELISA.

Positiva. Se confirma caso.

Dudosa. Se repite por duplicado para la misma prueba. Si vuelve a resultar dudosa, pasa a la siguiente determinación.

Negativa. Se procede con la siguiente determinación. Se procede con la siguiente determinación. Una muestra negativa a las tres pruebas previas se considera negativa a dengue y se continúa con el diagnóstico diferencial para EFE o Leptospira, Rickettsias, Hantavirus (en caso de signos hemorrágicos). Ante casos de fiebre icterohemorrágica y viajeros de zona endémica se sugiere realizar diagnóstico diferencial para fiebre amarilla.

La vigilancia virológica para identificar los serotipos circulantes se debe hacer mediante:

- ❖ Aislamiento viral
- ❖ En todas las formas graves de FD y FHD se debe realizar RT-PCR

3.7.1.1 Implementación del Algoritmo Diagnóstico por Laboratorio de FD y FHD en el IMSS

Los Laboratorios Clínicos del IMSS cuentan con una modalidad de “Servicio Integral de Pruebas de Laboratorio” para poder solicitar diferentes ensayos que se encuentran enmarcados en diversas partidas. Esta modalidad incluye la instalación de equipos, mantenimiento preventivo y correctivo de los equipos y la dotación de insumos y controles de calidad.

El catálogo de Servicios Integrales tiene incluidos ensayos que se pueden utilizar para el diagnóstico de varios padecimientos sujetos a vigilancia epidemiológica como dengue, VIH, tuberculosis, rotavirus, enfermedades bacterianas invasivas, sarampión, rubéola, tos ferina, chagas, hepatitis.

El IMSS particularmente el LCE de CMN “La Raza” cuenta con la infraestructura y capacidad humana para iniciar el diagnóstico del dengue. En septiembre del 2011 se ejecutó por vez primera el algoritmo diagnóstico por laboratorio de FD y FHD, del SINAVE, bajos los lineamientos del InDRE, que según el marco jurídico vigente, la NOM-017-SSA2-2012. Para la vigilancia epidemiológica; es la única institución con la capacidad de reconocer la competencia técnica de los laboratorios que participan en la vigilancia epidemiológica. El apego a los lineamientos del InDRE, permitirá que los resultados emitidos por los laboratorios clínicos del IMSS se vean reflejados en el SINAVE.

El proceso general de las muestras que arriban al LCE es el siguiente:

- Recepción de muestras: En el LCE se cuenta con un área de recepción de muestras, dentro de la cual se reciben las muestras provenientes de toda la República Mexicana. En particular, las muestras de dengue deben cumplir con ciertos requerimientos que implican tanto la documentación pertinente y el embalaje, así como de las características físicas y el estado de esta.

- Características de documentación. Los documentos que deben acompañar la muestra son:
 - ❖ Oficio de solicitud de prueba
 - ❖ Relación de las muestras
 - ❖ Formato único de envío de muestra biológica
 - ❖ Tener el historial clínico de cada paciente
 - ❖ Que cumpla con los días de tránsito (7 días)

- Características de empaque:
 - ❖ Deben venir en un empaque secundario (caja de cartón), bien sellada.
 - ❖ Cumplir con la red fría (en hielera, con refrigerantes o hielo seco).
 - ❖ El recipiente o empaque primario debe ser un tubo de 10-15 mL aprox.
 - ❖ Este tubo que contiene a la muestra, debe estar herméticamente cerrado y rotulado.

- Características físicas:
 - ❖ La muestra debe ser suero (Se debe enviar el suero ya separado del paquete globular).
 - ❖ En cantidad suficiente (2-3 mL), contenido en un tubo de 10-15 mL, bien sellado.
 - ❖ No debe presentar lipemia, hemólisis, estar icterica o contaminada con crecimiento bacteriano u otros artefactos.

Toda muestra que no cumpla estrictamente con cada uno de estos requerimientos será rechazada.

- Foliado y clasificación de muestras: Se asigna folio interno a toda muestra que arribe al LCE, independientemente que sea aceptada o no; las muestras se dan de alta en una base de datos para Dengue, y de acuerdo al historial clínico, donde se debe especificar la fecha de inicio de la fiebre y la fecha de toma de la muestra son clasificadas en dos grupos (muestras cuya ELISA inicial será la determinación de NS1 ó muestras que tendrán como ELISA inicial la determinación de anticuerpos IgM).

- Inicio del algoritmo: Las muestras entran al algoritmo y la prueba inicial correspondiente está dada según la clasificación asignada anteriormente. Por lo anterior la prueba inicial puede ser ELISA NS1 ó ELISA IgM, y de ahí según los resultados obtenidos pasará a qRT-PCR o a ELISA IgG.

El LCE ya contaba con la infraestructura para realizar diagnóstico molecular de influenza y para su máximo aprovechamiento se ha integrado a su marco analítico el ensayo confirmatorio de dengue por esta misma técnica. Todas las muestras que resultan positivas a la determinación del antígeno viral NS1 por ELISA son procesadas por qRT-PCR, esta prueba también requiere de suero para su realización y es de utilidad para identificar los serotipos circulantes y tener así información para hacer el seguimiento sobre la vigilancia virológica.

3.8 Verificación de la metodología analítica del Algoritmo Diagnóstico por Laboratorio de FD y FHD.

3.8.1 Requisitos de la gestión de calidad

La Gestión de Calidad se vale de ciertos requisitos, (Instituto Mexicano de Normalización y Certificación, 2006) como son:

- La Organización
- Sistema de gestión
- Control de documentos
- Revisión de los pedidos, ofertas y contratos
- Subcontratación de ensayos y calibraciones
- Compras de servicios y suministros
- Servicio al cliente
- Quejas
- Control de trabajos de ensayos o de calibraciones no conformes
- Mejora
- Acciones correctivas
- Acciones preventivas
- Control de registros
- Auditorías internas
- Revisiones por la dirección

El laboratorio debe establecer, implementar y mantener un sistema de gestión apropiado al alcance de sus actividades. Debe documentar sus políticas, sistemas, programas, procedimientos e instrucciones tanto como sea necesario para asegurar la calidad de los resultados de los ensayos o calibraciones. La documentación del sistema debe ser

comunicada al personal pertinente, debe ser comprendida por él, debe estar a su disposición y debe ser implementada por él.

Todo lo anterior se está implementado en el LCE, así mismo es necesario cumplir con ciertos requisitos técnicos. Muchos factores determinan la exactitud y la confiabilidad de los ensayos o de las calibraciones realizadas por un laboratorio. Estos factores incluyen elementos provenientes de:

- Los factores humanos
- Las instalaciones y condiciones ambientales
- Los métodos de ensayo y de calibración, y de la validación de los métodos
- De los equipos
- De la trazabilidad de las mediciones
- Del muestreo
- De la manipulación de los ítems de ensayo y de calibración

El grado con el que estos factores contribuyen a la incertidumbre total de la medición difiere considerablemente según los ensayos y tipos de ensayos. El laboratorio debe tener en cuenta estos factores al desarrollar los métodos y procedimientos de ensayo y de calibración, en la formación y calificación del personal, así como de la selección y calibración de los equipos utilizados.

3.8.2 Validación y verificación de métodos analíticos

Dentro de toda esta amplia gama de factores, la validación y/o verificación de métodos analíticos es lo que nos atañe en el presente trabajo. Según la NMX-EC-17025-IMNC-2006. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración, (Instituto Mexicano de Normalización y Certificación, 2006) un laboratorio debe aplicar métodos y procedimientos adecuados para todos los ensayos dentro de su alcance. Estos métodos deben satisfacer las necesidades del cliente y ser apropiados para los ensayos o calibraciones que realiza. Se deben utilizar preferentemente métodos publicados como normas internacionales, regionales o nacionales, por organizaciones técnicas reconocidas, o en libros o revistas científicas especializados, o especificados por el fabricante del equipo y son conocidos como métodos normalizados. En caso de que se utilicen métodos desarrollados por el laboratorio, o métodos normalizados empleados fuera del alcance previsto estos deben ser validados.

Una validación es la confirmación, a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto. Se deben validar los métodos desarrollados por el laboratorio y todos los métodos no normalizados (En el LCE, para el diagnóstico de dengue, se utilizan métodos del tipo normalizados, métodos ya verificados, especificados por el fabricante y son los que han sido aceptados por el InDRE.

Una verificación implica, mediante la aportación de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos especificados para un método. La verificación consiste en evaluar el desempeño del método para demostrar que cumple con los requerimientos para el uso previsto, que fueron especificados como resultado de su validación. El LCE ha generado protocolos de verificación de los ELISAS para NS₁, IgG e IgM, estos métodos dentro de la clasificación según su propósito analítico, están encaminados a establecer la presencia de un analito a un límite.

El sistema de gestión del LCE está basado en la NMX -EC-15189-IMNC-2008. Laboratorios Clínicos – Requisitos particulares para la calidad y competencia, (IMNC, 2008), y con el objetivo de dar cumplimiento al numeral 5.5.2, del capítulo 5 (donde se habla sobre los procedimientos de examen y establece que: “los métodos y procedimientos seleccionados para ser utilizados deben ser evaluados y comprobar que dan resultados satisfactorios antes de iniciar su uso para exámenes clínicos”), se han ejecutado los protocolos de verificación antes mencionados de los métodos de ensayo por serología del diagnóstico de dengue.

3.8.2.1 Parámetros de desempeño

Para efectuar una validación o en su defecto una verificación se tienen que evaluar diferentes parámetros de desempeño del método; son las propiedades, características o capacidades cuantificables del método que indican su grado de calidad; incluyen: exactitud, efecto de matriz, repetibilidad, reproducibilidad, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, intervalo analítico, sensibilidad, robustez. Son todas esas características relacionadas con los resultados obtenibles por el método (CENAM/EMA, 2008).

Los métodos analíticos se pueden clasificar de varias formas, de acuerdo a una función:

- Función de su estado normativo
 - ❖ Métodos normalizados

- ❖ Métodos no normalizados
- Función de la naturaleza de la respuesta analítica
 - ❖ Métodos físicos
 - ❖ Métodos químicos
 - ❖ Métodos biológicos
- Función de la matriz
 - ❖ Métodos de matriz química
 - ❖ Métodos de matriz biológica
- Función de su propósito analítico
 - ❖ Métodos para cuantificar el analito (cantidad)
 - ❖ Métodos para semicuantificar el analito (orden)
 - ❖ Métodos para establecer la presencia del analito a un límite (mayor o menor)
 - ❖ Métodos para identificar el analito (presente o ausente)

En los métodos analíticos del tipo límite (los que maneja el algoritmo de dengue), se recomienda que los parámetros de desempeño evaluados durante la verificación sean los siguientes:

- **Precisión.** Grado de concordancia entre los valores de una serie repetida de ensayos, utilizando una muestra homogénea, bajo condiciones establecidas y proporcionalidad del sistema.
- **Especificidad.** Es la capacidad de determinar el analito inequívocamente en la presencia de componentes los cuales se espera que estén presentes. Comúnmente puede incluir impurezas, degradantes, matriz, entre otros.
- **Selectividad.** La habilidad de un método para determinar exactamente y específicamente el analito de interés en la presencia de otros componentes en la matriz bajo condiciones establecidas de prueba.
- **Precisión intermedia del método.** Capacidad de un método de ser reproducido por diferentes analistas en diferentes días de análisis, manteniendo sus características de especificidad y sensibilidad.

- **Estabilidad analítica de la muestra.** Estabilidad de una señal dentro de la metodología analítica a diferentes condiciones
- **Estabilidad de la muestra.** Estabilidad de un analito en una muestra antes de ser procesada por el método.
- **Robustez.** Capacidad de un procedimiento analítico de no ser afectado por pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método, provee una indicación de su confiabilidad en condiciones de uso normales.
- **Sensibilidad.** Es la relación entre la señal obtenida de un sistema de medición y la correspondiente concentración de analito, es decir, la pendiente de la función de calibración y no es sinónimo de límite de detección. Cuando la función de calibración es una recta, la sensibilidad analítica es constante en todo el intervalo de medida. Por el contrario, con funciones de calibración diferentes de la recta, la sensibilidad varía en función de la concentración del analito, (CENAM/EMA, 2008)

El parámetro de sensibilidad, no es un requisito obligatorio para un método del tipo límite, sin embargo aunque los métodos diagnósticos del algoritmo de dengue pertenecen a esa clasificación, en estas verificaciones se han evaluado.

4 JUSTIFICACION

Las Enfermedades Transmitidas por Vector (ETV) representan un importante problema de salud pública en México. En el país la ETV más importante es el dengue y es una arbovirosis muy asociada al ambiente urbano doméstico, a los hábitos de la población y a la carencia de servicios básicos como el suministro de agua, así como la falta de recolección de basura y desechos de la vivienda. En el continente americano el dengue se considera la enfermedad re-emergente más importante y sus formas hemorrágicas son cada vez de mayor relevancia, debido al aumento progresivo en el número de defunciones (Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud, 2008).

El dengue constituye uno de los principales desafíos para el control y la vigilancia epidemiológica en este siglo XXI. El reto principal para la prevención y control del dengue en México es hacer más eficientes las acciones anticipatorias para evitar la aparición de brotes y, en su caso, atenderlos de forma oportuna y evitar su dispersión. Es por eso que a partir del 2008 un nuevo y mejorado algoritmo para el diagnóstico de dengue se puso en marcha a nivel nacional, según las especificaciones del InDRE.

En el IMSS se implementaron ensayos que se pueden utilizar para el diagnóstico de varios padecimientos sujetos a vigilancia epidemiológica, como es el caso del dengue. El algoritmo antes mencionado para el diagnóstico de dengue y sus métodos diagnósticos se ejecutaron por primera vez en el LCE a finales de septiembre del 2011 bajo los lineamientos del InDRE.

En el LCE se está implementando un Sistema de Gestión de Calidad, basado en la NMX -EC-15189-IMNC-2008 "Laboratorios Clínicos – Requisitos particulares para la calidad y competencia", y con el objetivo de dar cumplimiento al numeral 5.5.2 de los procedimientos de examen que establece: "los métodos y procedimientos seleccionados para ser utilizados deben ser evaluados y comprobar que dan resultados satisfactorios antes de iniciar su uso para exámenes clínicos".

Lo anterior lleva a la necesidad de realizar la verificación de los métodos de ensayo del algoritmo diagnóstico para FD y FHD para corroborar que la implementación de éstos es aplicable a las condiciones del laboratorio.

5 HIPOTESIS

Al realizar la verificación de los métodos de diagnóstico del algoritmo diagnóstico para FD y FHD, se espera que los resultados obtenidos respalden y den validez al nuevo algoritmo diagnóstico de FD y FHD propuesto por el SINAVE.

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Demostrar que los métodos analíticos para identificar al antígeno NS₁, anticuerpos IgM e IgG contra el virus del dengue son aplicables a muestras de suero provenientes de todo el país dentro de las condiciones del LCE.

6.2 Objetivos particulares

- Verificar el método para la detección de antígenos NS₁ del virus del dengue por ELISA de captura, mediante la demostración de diversos parámetros de desempeño contenidos en el protocolo de evaluación y comprobación de dicho método analítico.
- Verificar el método para la detección de anticuerpos IgM contra el virus del dengue por ELISA de captura, mediante la demostración de diversos parámetros de desempeño contenidos en el protocolo de evaluación y comprobación de dicho método analítico.
- Verificar el método para la detección de anticuerpos IgG contra el virus del dengue por ELISA de captura, mediante la demostración de diversos parámetros de desempeño contenidos en el protocolo de evaluación y comprobación de dicho método analítico.
- Analizar los resultados de la verificación de los protocolos anteriores y demostrar su aplicabilidad en el LCE.

7 ESTRATEGIA GENERAL DE TRABAJO

El diagrama 2, del anexo 13.2 muestra la estrategia seguida para la realización del presente trabajo. Las muestras de suero provenientes de diversas delegaciones del IMSS arribaron al LCE con una definición operacional de caso sospechoso de dengue. Por su parte, antes de que estas muestras comenzarán a llegar, dicho laboratorio había desarrollado un análisis de riesgo biológico, tomando en cuenta el tipo de muestra y el tipo de virus que se pretendía detectar, así como otros agentes que pudieran estar presentes en las muestras y que son comunes en áreas de trabajo de este tipo. Para disminuir los riesgos laborales por la exposición a muestras biológicas infecciosas, se acataron todos los requisitos necesarios para trabajar en un Laboratorio de Nivel de Bioseguridad 2.

Una vez desarrollado el programa de análisis de riesgo biológico, se procedió a implementar el algoritmo diagnóstico por laboratorio de FD y FHD del SINAVE, las muestras enviadas al LCE entraron al algoritmo sin problema alguno.

Finalmente para dar mayor validez todos los resultados emitidos por el LCE y como consecuencia del sistema de gestión implantado en el laboratorio, era necesario realizar la verificación de los métodos de ensayo del algoritmo para demostrar que los resultados son válidos trabajando bajo las condiciones del LCE.

8 MATERIALES Y METODOS

Los materiales utilizados se enlistan en el anexo 13.3.1 Además es importante mencionar la procedencia y preparación de las muestras utilizadas. Parte de las muestras provienen de mezclas elaboradas a partir de muestras pertenecientes al banco de sueros del LCE. Para ello se recurrió a la base de datos del banco, donde se seleccionaron muestras positivas y negativas al antígeno NS₁, a anticuerpos IgM, y a anticuerpos IgG. Estas muestras arribaron al LCE con fines diagnósticos, entraron al algoritmo diagnóstico y después de realizadas las pruebas pertinentes se emitió el resultado obtenido.

La mezcla de muestras correspondientes a NS₁ se conformó de la selección de 355 muestras positivas a NS₁ y de 270 muestras negativas a los tres diferentes ELISAS. Por su parte la mezcla de muestras correspondiente a IgM se conjuntó de la selección de 98 muestras positivas a anticuerpos IgM y de 55 muestras negativas a los tres diferentes ELISAS y para IgG las mezclas se elaboraron a partir de la selección de 98 muestras positivas a IgG y de 55 muestras negativas a los tres ELISAS. De cada uno de los viales se tomaron 20 uL y se conjuntaron en 3 tubos de 10 mL correspondientes a cada ELISA, se mezclaron bien y se sometieron al ensayo de ELISA NS₁, ELISA IgM y ELISA IgG según correspondía. Confirmados los resultados, los Sueros Negativos (SN) se alicuotaron en volumen necesario para cada parámetro de evaluación y se almacenaron a -70°. Los Sueros Positivos a nivel Alto (SPA) se sometieron a pruebas de diluciones que iban desde 1:2 hasta 1:1200, para obtener la dilución de trabajo del Suero Positivo a Nivel Bajo (SPB). Se seleccionó la dilución que dio Unidades Panbio más bajas que las del SPA, pero lo suficientemente altas para que aun fueran detectadas como positivas. Los SPA y SPB se alicuotaron en volumen suficiente para cada prueba y se almacenaron a -70°C. Estos SN, SPA Y SPB se utilizaron en los parámetros de selectividad, precisión intermedia del método, estabilidad analítica de la muestra, estabilidad de la muestra, tolerancia y robustez.

Para el parámetro de selectividad además del SN, se utilizaron sueros positivos a influenza A (H₁N₁), obtenidos de un banco de sueros del LCE recolectadas durante la contingencia del 2009. Las muestras positivas a rubéola y sarampión provienen de testigos positivos de dos equipos de diagnóstico por el ensayo ELISA, de SIEMENS y que se utilizan en el mismo laboratorio para el diagnóstico de rubéola y sarampión. Finalmente cuatro de los parámetros estudiados: proporcionalidad y precisión del sistema, sensibilidad y especificidad requerían como muestra un reactivo del propio equipo diagnóstico, el reactivo calibrador. El método de cada uno de los ELISAS verificados, (ELISA NS₁, ELISA IgM y ELISA IgG), se describe en el anexo 13.3.2.

9 RESULTADOS

Desde que se puso en marcha el algoritmo diagnóstico de FD y FHD en las instalaciones de LCE en septiembre del 2011, con el objetivo de funcionar como un laboratorio de referencia para el IMSS, miles de muestras provenientes de diversas delegaciones del IMSS en el país han sido examinadas. Los equipos de diagnóstico utilizados en estas verificaciones son de marca comercial (Panbio) y por ende ya están validados, por lo que el resultado obtenido con ellos es considerado confiable, sin embargo la calidad va más allá y es por eso que se llevó a cabo la ejecución de protocolos de verificación, para así asegurar que estos equipos de diagnóstico (métodos de ensayo del tipo serológico, técnica ELISA), son igual de eficientes pero aplicadas bajo las condiciones del LCE.

Se ejecutaron tres protocolos, uno para ELISA NS₁ (Anexo 13.5.1), otro para ELISA IgM (Anexo 13.5.2) y uno más para ELISA IgG (Anexo 13.5.3).

Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

9.1 ELISA NS₁

El protocolo de ELISA NS₁ indica la evaluación de 10 diferentes parámetros, los cuáles se describen a continuación:

9.1.1 Proporcionalidad y precisión del sistema

En este primer parámetro de desempeño se evaluó si el método de ELISA de captura del antígeno viral NS₁ tiene proporcionalidad y precisión.

La precisión es el grado de concordancia entre los valores de una serie repetida de ensayos, utilizando una muestra homogénea, se trabajó bajo condiciones establecidas y el sistema presente proporcionalidad.

Para evaluar la precisión se puso a prueba la variable de intensidad de respuesta (absorbancia), generada por el reactivo calibrador del equipo de diagnóstico (ELISA de NS₁). Por su parte la proporcionalidad se examinó, mediante el planteamiento de tres diluciones, una de ellas corresponde a la dilución original indicada en el inserto para realizar el diagnóstico (Dil. 1:2), las otras dos se realizaron de manera que una fuera mayor y otra menor a la dilución 1:2.

Para cada dilución se realizaron una serie de repeticiones y se determinó la absorbancia de cada una. A partir de estos datos se calculó la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación (CV) de cada tira o dilución. El CV es la relación entre la media y la variabilidad que presenta la variable en estudio. A menor CV hay mayor homogeneidad y alto grado de concordancia entre los valores en una serie repetida de ensayos, por lo tanto valores bajos de CV son los ideales.

Asimismo se ejecutaron dos pruebas adicionales, la de independencia de Pearson y la de asociación de Spearman.

Con la primera se determinó que entre las dos variables existe independencia (entiéndase por independencia entre dos variables, cuando la distribución de una de las variables es similar sea cual sea el nivel en que examinemos la otra).

Con la segunda prueba, la de asociación de Spearman, se evaluó la intensidad con que se asocian las dos variables. Mientras más nos acerquemos al valor positivo 1 (+1), se dice que ambas variables se asocian directamente de manera muy estrecha.

En el protocolo de verificación se indica que los criterios de aceptación para este parámetro son:

- Para la combinación tira – dilución:
 - ❖ El coeficiente de variación no debe exceder el 20% ($CV \leq 20\%$).
- Para cada tira de análisis:
 - ❖ Prueba de independencia de Pearson: $Pr\chi^2 < 0.05$.
 - ❖ Medida de asociación de Spearman: $r^2 \geq 0.98$.
- Para las dos tiras de análisis:
 - ❖ Prueba de independencia de Pearson: $Pr\chi^2 < 0.05$.
 - ❖ Medida de asociación de Spearman: $r^2 \geq 0.98$.

Los resultados de las absorbancias obtenidas en la corrida se muestran en la tabla 7 y la tabla 8, (anexo 13.4).

La tabla 9 muestra los resultados obtenidos para la prueba de independencia de Pearson y medida de asociación de Spearman, por cada tira y por las dos tiras.

Tabla 9. Prueba de independencia de Pearson y Medida de asociación de Spearman por cada tira y por las dos tiras.

| Prueba de independencia de Pearson y medida de asociación de Spearman | | | |
|---|----------|-------------|-------|
| | χ^2 | Pr χ^2 | r^2 |
| Tira 1 | 14 | 0.0073 | 1.000 |
| Tira 2 | 14 | 0.0073 | 1.000 |
| Tira 1 y 2 | 28 | <0.0001 | 1.000 |

9.1.2 Sensibilidad y especificidad

La sensibilidad es la probabilidad de que la respuesta analítica resulte positiva cuando en la muestra estudiada está realmente presente el sustrato de interés diagnóstico en los límites de detección o por arriba de ellos.

La especificidad es la probabilidad de que la respuesta analítica resulte negativa debido a que en la muestra estudiada no existe físicamente el sustrato o sustancia de interés diagnóstico o se encuentra por debajo de los límites de detección.

Para evaluar estos parámetros se realizaron tres pruebas durante cinco días, dando un total de quince repeticiones bajo las mismas condiciones analíticas (analista, corrida analítica, equipos, instrumentos, reactivos y soluciones). Se sometieron a examen los testigos positivo y negativo del equipo de diagnóstico (los cuáles fungieron como un testigo verdadero positivo y un testigo verdadero negativo, respectivamente). Si el método que examinamos es sensible y específico, esperamos que los resultados den negativos al tratarse del testigo negativo y viceversa para el testigo positivo, y que cumplan con los siguientes criterios de aceptación:

- **Sensibilidad:** El límite inferior de confianza al 95% para la sensibilidad excede 0.8 (LIC(S) \geq 0.8).
- **Especificidad:** El límite inferior de confianza al 95% para la especificidad excede 0.8 (LIC(E) \geq 0.8).

Los resultados de las absorbancias de las cinco corridas realizadas, se muestran en la tabla 10, las unidades Panbio correspondientes a esa absorbancia y el resultado correspondiente se describen en la tabla 11, mientras que la tabla 12 muestra una tabla de orden de contingencia con dos criterios de clasificación, (Anexo 13.4).

La tabla 13 indica el cálculo de sensibilidad y especificidad del método.

Tabla 13. Cálculo de la sensibilidad y especificidad del método, a un intervalo de confianza al 95% LIC(S), LSC(S) y LIC (E), LSC (E).

| Clasificación verdadera de la muestra | Clasificación de la muestra por el método analítico | | |
|---------------------------------------|---|-----------|-----------|
| | Positiva | Negativa | Total |
| Positivo | 15 | 0 | 15 |
| Negativo | 0 | 15 | 15 |
| Total | 15 | 15 | 15 |

| | |
|----------------------|------------|
| Sensibilidad | S=1 |
| Especificidad | E=1 |

9.1.3 Selectividad

La selectividad es la propiedad de un método que le permite poder determinar analitos particulares en mezclas o matrices sin interferencias de otros componentes con un comportamiento similar. En un método analítico la selectividad se evalúa aplicando la prueba al mismo número de muestras o testigos verdaderos positivos y de testigos verdaderos negativos, investigando el comportamiento del método analítico en 2 poblaciones diferentes: los testigos positivos verdaderos y en los testigos negativos verdaderos.

Para evaluar la selectividad en la verificación del ELISA NS₁ se utilizaron los testigos positivo y negativo, además de muestras de suero ya confirmadas como negativas para dengue, muestras de suero positivas al virus de la influenza tipo A, al virus de sarampión y al virus de rubéola. Se decidió probar estos virus ya que son algunos de los otros agentes etiológicos que se diagnostican en el LCE, para evaluar la presencia de reacciones cruzadas con estos virus.

Se realizaron dos ensayos en días diferentes, bajo las mismas condiciones de trabajo y por el mismo analista. En cada ensayo se probaron testigos positivos verdaderos (muestras de suero positivas al virus de influenza A, al virus de sarampión y al de rubéola) y testigos negativos verdaderos (muestras de suero negativas al antígeno viral NS1 del dengue).

Para demostrar que este método posee selectividad se deben cumplir una serie de criterios, que son:

- Validez de la prueba para cada placa (CALIBRADORES):
 - ❖ $UP_{TN} < 9$
 - ❖ $UP_{TP} > 11$

- Selectividad para la muestra de cada placa:
 - ❖ $UP_{SN} < 9$
 - ❖ $UP_{IA} < 9$
 - ❖ $UP_{Sa} < 9$
 - ❖ $UP_{Ru} < 9$

La tabla 14 muestra los resultados de absorbancia de cada placa y tabla 15 muestra las unidades Panbio y el resultado correspondiente de cada placa, (anexo 13.4).

9.1.4 Precisión intermedia del método

Se dice que un método posee precisión intermedia cuando puede ser reproducido por diferentes analistas en diferentes días de análisis, manteniendo sus características de especificidad y sensibilidad.

Para evaluar este parámetro se realizaron cuatro repeticiones, dos por cada analista. Los parámetros a cumplir son:

- Validez de la prueba para cada placa de la combinación analista día.
 - ❖ $UP_{TN} < 9$
 - ❖ $UP_{TP} > 11$

- Repetibilidad del método.
 - ❖ $UP_{SN} < 9$ en cada placa de la combinación analista – día.
 - ❖ $UP_{SPB} > 11$ en cada placa de la combinación analista – día.

- ❖ $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 11$ en cada placa de la combinación analista – día.
- Reproducibilidad entre días / analista.
 - ❖ $UP_{SN} < 9$ para las placas de los dos días de cada analista.
 - ❖ $UP_{SPB} > 11$ para las placas de los dos días de cada analista.
 - ❖ $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 11$ para las placas de los dos días de cada analista.
- Reproducibilidad entre analista.
 - ❖ $UP_{SN} < 9$ para las placas de los dos analistas.
 - ❖ $UP_{SPB} > 11$ para las placas de los dos analista.
 - ❖ $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 11$ para las placas de los dos analistas.

Los registros de absorbancias por los dos analistas en dos diferentes días cada uno se muestran en la tabla 16, la tabla 17 exhibe las unidades Panbio (anexo 13.4).

9.1.5 Estabilidad analítica de la muestra

Con este parámetro pretendemos demostrar que la señal dentro de la metodología analítica a diferentes condiciones posee estabilidad.

Este parámetro se evaluó realizando cuatro combinaciones diferentes, dónde se probaron dos condiciones: el tiempo de incubación para desarrollo del color azul y el tiempo de reposo después de generado el color amarillo.

- Desarrollo del color azul: esto ocurre en el momento del procedimiento dónde se añade un sistema de sustrato incoloro (tetrametilbencidina / peróxido de hidrógeno) llamado “cromógeno TMB”. La enzima peroxidasa de rábano, si se encuentra presente y utilizando el poder reductor del peróxido de hidrógeno, cataliza la oxidación del sustrato tetrametilbencidina convirtiéndose en un compuesto colorido azul.

Aquí entra la primera variación, la metodología experimental expuesta en el inserto del equipo de diagnóstico, indica que el tiempo de incubación una vez añadido el cromógeno TMB es de 10 minutos. Los tiempos de incubación probados fueron de 7 minutos y 13 minutos.

- El desarrollo del color amarillo se genera cuando la reacción entre la enzima peroxidasa y el sustrato se interrumpe añadiendo una “solución de paro”, que es una sustancia ácida. En estas condiciones ácidas el TMB oxidado cambia a amarillo. El cambio de color indica la presencia del antígeno NS1 del dengue en la muestra de ensayo.

Según el inserto tenemos un tiempo de 30 minutos para leer la placa una vez generado el color, pues después de ese tiempo no se asegura la estabilidad. Los tiempos de reposo probados para la lectura fueron a los 25 minutos y a los 35 minutos de haber cambiado al color amarillo.

Los criterios de aceptación que debe cumplir este método para que sea considerado con buena estabilidad analítica:

- Validez de la prueba para cada placa.
 - ❖ $UP_N < 9$
 - ❖ $UP_P > 11$
- Estabilidad de la señal analítica al tiempo de incubación de desarrollo del color azul.
 - ❖ $UP_{SN} < 9$ en las placas TAA, TAB, TBA y TBB.
 - ❖ $UP_{SPB} > 11$ en las placas TAA y TAB.
 - ❖ $UP_{SPB} > 11$ en las placas TBA y TBB.
 - ❖ UP_{SPB} de las placas TBA y TBB debe ser concordante al de las placas TAA y TAB.
 - ❖ $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 11$ en las placas TAA y TAB.
 - ❖ $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 11$ en las placas TBA y TBB.
 - ❖ UP_{SPA} de las placas TBA y TBB debe ser concordante al de las placas TAA y TAB.
- Estabilidad de la señal analítica al tiempo de incubación de reposo una vez generado el color amarillo.
 - ❖ $UP_{SN} < 9$ en las placas TAA, TAB, TBA y TBB.
 - ❖ $UP_{SPB} > 11$ en las placas TAA y TBA.
 - ❖ $UP_{SPB} > 11$ en las placas TAB y TBB.
 - ❖ UP_{SPB} de las placas TAA y TBA debe ser concordante al de las placas TAB y TBB.
 - ❖ $UP_{SPA} > 11 > UP_{SPB}$ en las placas TAA y TBA.

- ❖ $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 11$ en las placas TAB y TBB.
- ❖ UP_{SPA} de las placas TAA y TBA debe ser concordante al de las placas TAB y TBB.

Las tablas 18 y 19 muestran los resultados obtenidos en este parámetro de estudio, (anexo 13.4).

9.1.6 Estabilidad de la muestra

Otro de los parámetros revisados fue el de estabilidad de la muestra, que busca evaluar la estabilidad de un analito en una muestra antes de ser procesada por el método.

La estabilidad del analito se probó bajo cinco condiciones diferentes:

- ❖ CE₀: determinación al momento de obtener la muestra.
- ❖ CE₁: muestras almacenadas por 24 horas de 2 a 8 °C.
- ❖ CE₂: muestras almacenadas por 48 horas en congelación (-20 °C o menos).
- ❖ CE₃: muestras almacenadas en hielo por 60 minutos.
- ❖ CE₄: muestras a la condición de mesa de laboratorio ó temperatura ambiente por 60 minutos.

Para demostrar que este criterio se cumple, debe acreditar lo siguiente:

- Validez de la prueba para cada placa de cada condición de almacenaje.
 - ❖ $UP_N < 9$
 - ❖ $UP_P > 11$
- Estabilidad de la muestra almacenada por 24 horas de 2 a 8 °C.
 - ❖ $UP_{SN} < 9$ en las placas CE₀ y CE₁.
 - ❖ $UP_{SPB} > 11$ en las en las placas CE₀ y CE₁.
 - ❖ $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 11$ en las placas CE₀ y CE₁.
- Estabilidad de la muestra almacenada por 48 horas en congelación (-20 °C o menos).
 - ❖ $UP_{SN} < 9$ en las placas CE₀ y CE₂.
 - ❖ $UP_{SPB} > 11$ en las en las placas CE₀ y CE₂.
 - ❖ $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 11$ en las placas CE₀ y CE₂.
- Estabilidad de la muestra almacenada en hielo por 60 minutos.

- ❖ $UP_{SN} < 9$ en las placas CEo y CE₃.
 - ❖ $UP_{SPB} > 11$ en las en las placas CEo y CE₃.
 - ❖ $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 11$ en las placas CEo y CE₃.
- Estabilidad de la muestra almacenada a la condición de mesa de laboratorio por 60 minutos.
 - ❖ $UP_{SN} < 9$ en las placas CEo y CE₄.
 - ❖ $UP_{SPB} > 11$ en las en las placas CEo y CE₄.
 - ❖ $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 11$ en las placas CEo y CE₄.

Para ver los resultados consultar las tablas 20 y 21 en el anexo 13.4.

9.1.7 Tolerancia

La prueba de tolerancia mide la capacidad de un método analítico a cambios de situaciones críticas, por ejemplo la utilización de algunos de los reactivos críticos de otros lotes y que estos cambios no afecten el resultado final.

En el presente estudio se verificó la tolerancia del método al cambio de lote de dos reactivos del equipo de diagnóstico:

- Cromógeno TMB
- Anticuerpo monoclonal anti NS₁ conjugado con HRP

Se realizaron tres tratamientos con los dos lotes de reactivos críticos (tabla 22), las determinaciones se hicieron por triplicado, de suero negativo, suero positivo a nivel bajo y suero positivo a nivel alto para el antígeno NS₁ del virus del dengue por un mismo analista utilizando los mismos testigos, reactivos, soluciones, equipos, instrumentos; pero variando los lotes del anticuerpo monoclonal conjugado y del cromógeno.

Los tratamientos fueron los siguientes:

- Lote del cromógeno TMB y del anticuerpo monoclonal Anti NS₁ MAb conjugado con HRP del propio equipo para el diagnóstico (T₁).
- Lote del cromógeno TMB de otro equipo de diagnóstico y lote del anticuerpo monoclonal Anti NS₁ MAb conjugado con HRP del propio equipo diagnóstico (T₂).
- Lote del cromógeno TMB del propio equipo diagnóstico y del anticuerpo monoclonal Anti NS₁ MAb conjugado con HRP de otro equipo de diagnóstico (T₃).

Tabla 22. Número de lotes de los equipos de diagnóstico.

| | |
|------------------------------|-------------|
| Equipo para el diagnóstico 1 | Lote: 11236 |
| Equipo para el diagnóstico 2 | Lote: 12004 |

Los criterios de aceptación, planteados para esta prueba son:

- Validez de la prueba para cada placa de cada tratamiento.
 - ❖ $UP_N < 9$
 - ❖ $UP_P > 11$

- Tolerancia para el lote de TMB:
 - ❖ $UP_{SN} < 9$ para los tratamientos T₁ y T₂.
 - ❖ $UP_{SPB} > 11$ para los tratamientos T₁ y T₂.
 - ❖ $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 11$ para los tratamientos T₁ y T₂.

- Tolerancia para el lote del Anticuerpo monoclonal Anti NS₁ MAb conjugado con HRP.
 - ❖ $UP_{SN} < 9$ para los tratamientos T₁ y T₃.
 - ❖ $UP_{SPB} > 11$ para los tratamientos T₁ y T₃.
 - ❖ $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 11$ para los tratamientos T₁ y T₃.

Los resultados están disponibles en el anexo 13.4 en las tablas 23 y 24.

9.1.8 Robustez

Para la evaluación del parámetro de robustez se realizó un diseño de Plackett-Burman, que es un diseño de tamizado que permite establecer la relación entre variables de estudio y la variable respuesta. Es un diseño completamente ortogonal que reduce substancialmente el número de experimentos a realizarse con un elevado número de variables.

Los factores que se van a estudiar son:

- Volumen del Mab anti-NS₁ conjugado con HRP o factor A.
- Primer tiempo de incubación de la placa o factor C.
- Primera temperatura de incubación de la placa o factor D.
- Segundo tiempo de incubación (formación del conjugado) o factor E.
- Segunda temperatura de incubación (formación del conjugado) o factor G.

Utilizando el diseño de Plackett Burman para un estudio de 5 factores, se obtiene que este procedimiento se lleve a cabo para 8 combinaciones o tratamientos de los factores bajo estudio. Para ello es necesario fijar el nivel bajo (-) y nivel alto (+) de los factores. En la tabla 25 se indica el valor respectivo del nivel bajo y alto de cada factor.

Tabla 25. Nivel bajo y alto de cada factor.

| FACTOR | CÓDIGO | VALOR DEL NIVEL BAJO (-) | VALOR DEL NIVEL ALTO (+) |
|---|--------|--------------------------|--------------------------|
| Volumen del Mab anti-NS1 conjugado con HRP | A | 90 mL | 110 mL |
| Primer tiempo de incubación de la placa | C | 50 minutos | 70 minutos |
| Primera temperatura de incubación de la placa | D | 35 °C | 39 °C |
| Segundo tiempo de incubación de la placa (formación del conjugado) | E | 50 minutos | 70 minutos |
| Segunda temperatura de incubación de la placa (formación del conjugado) | G | 35 °C | 39 °C |

Ya fijados los niveles altos y bajos de cada factor se establecen las ocho diversas combinaciones, que muestran los niveles de trabajo para cada factor, tabla 26.

Tabla 26. Tratamientos con sus respectivos niveles de cada factor.

| CORRIDA O TRATAMIENTO | NIVEL DEL FACTOR / VALOR DEL NIVEL DEL FACTOR | | | | |
|-----------------------|---|------------|-----------|------------|-----------|
| | A | C | D | E | G |
| T1 | + / 110 mL | - / 50 min | + / 39 °C | - / 50 min | + / 39 °C |
| T2 | + / 110 mL | - / 50 min | - / 35 °C | + / 70 min | + / 39 °C |
| T3 | + / 110 mL | + / 70 min | - / 35 °C | - / 50 min | - / 35 °C |
| T4 | - / 90 mL | + / 70 min | + / 39 °C | - / 50 min | + / 39 °C |
| T5 | + / 110 mL | + / 70 min | + / 39 °C | + / 70 min | - / 35 °C |
| T6 | - / 90 mL | - / 50 min | + / 39 °C | + / 70 min | - / 35 °C |
| T7 | - / 90 mL | + / 70 min | - / 35 °C | + / 70 min | + / 39 °C |
| T8 | - / 90 mL | - / 50 min | - / 35 °C | - / 50 min | - / 35 °C |

Los resultados generados en cada tratamiento deben cumplir con los siguientes criterios de aceptación:

- Validez de la prueba para cada placa de cada tratamiento.
 - ❖ $UP_N < 9$
 - ❖ $UP_P > 11$

- Para el factor volumen del Mab anti-NS₁ conjugado con HRP (A):
 - ❖ $UP_{SN} < 9$ en las placas 1, 2, 3, 5 y 4, 6, 7, 8 y concordantes.
 - ❖ $UP_{SPB} > 11$ en las placas 1, 2, 3, 5 y 4, 6, 7, 8 y concordantes.
 - ❖ $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 11$ en las placas 1, 2, 3, 5 y 4, 6, 7, 8 y concordantes.

- Para el factor primer tiempo de incubación de la placa (C):
 - ❖ $UP_{SN} < 9$ en las placas 3, 4, 5, 7 y 1, 2, 6, 8 y concordantes.
 - ❖ $UP_{SPB} > 11$ en las placas 3, 4, 5, 7 y 1, 2, 6, 8 y concordantes.
 - ❖ $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 11$ en las placas 3, 4, 5, 7 y 1, 2, 6, 8 y concordantes.

- Para el factor primera temperatura de incubación de la placa (D):
 - ❖ $UP_{SN} < 9$ en las placas 1, 4, 5, 6 y 2, 3, 7, 8 y concordantes.
 - ❖ $UP_{SPB} > 11$ en las placas 1, 4, 5, 6 y 2, 3, 7, 8 y concordantes.
 - ❖ $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 11$ en las placas 1, 4, 5, 6 y 2, 3, 7, 8 y concordantes.

- Para el factor segundo tiempo de incubación de la placa (formación del conjugado) (E):
 - ❖ $UP_{SN} < 9$ en las placas 2, 5, 6, 7 y 1, 3, 4, 8 y concordantes.
 - ❖ $UP_{SPB} > 11$ en las placas 2, 5, 6, 7 y 1, 3, 4, 8 y concordantes.
 - ❖ $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 11$ en las placas 2, 5, 6, 7 y 1, 3, 4, 8 y concordantes.

- Para el factor segunda temperatura de incubación de la placa (formación del conjugado) (G)
 - ❖ $UP_{SN} < 9$ en las placas 1, 2, 4, 7 y 3, 5, 6, 8 y concordantes.
 - ❖ $UP_{SPB} > 11$ en las placas 1, 2, 4, 7 y 3, 5, 6, 8 y concordantes.
 - ❖ $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 11$ en las placas 1, 2, 4, 7 y 3, 5, 6, 8 y concordantes.

Los resultados se muestran en las tablas 27 y 28 (Anexo 13.4).

9.2 ELISA IgM

Los parámetros evaluados en el protocolo de ELISA IgM fueron:

9.2.1 Proporcionalidad y precisión del sistema

La verificación de la metodología de ELISA IgM para dengue, sigue en esencia el mismo desarrollo que en el ELISA NS₁, los parámetros evaluados son exactamente los mismos y quizá las únicas variaciones son las que implica la metodología de cada equipo para el diagnóstico.

Para que este parámetro sea aceptado requiere que los resultados generados cumplan los siguientes criterios de aceptación:

- Para la combinación tira – dilución:
 - ❖ El coeficiente de variación no debe exceder el 20% ($CV \leq 20\%$).

- Para cada tira de análisis:
 - ❖ Prueba de independencia de Pearson: $Pr\chi^2 < 0.05$.
 - ❖ Medida de asociación de Spearman: $r^2 \geq 0.98$.

- Para las dos tiras de análisis:
 - ❖ Prueba de independencia de Pearson: $Pr\chi^2 < 0.05$.
 - ❖ Medida de asociación de Spearman: $r^2 \geq 0.98$.

Los resultados de la absorbancias se muestran en las tablas 29 y 30, descritas en el anexo 13.4.

La tabla 31 exhibe los resultados obtenidos para la prueba de independencia de Pearson y medida de asociación de Spearman, por cada tira y por las dos tiras.

Tabla 31. Medida Prueba de independencia de Pearson y Medida de asociación de Spearman por cada tira y por las dos tiras.

| Prueba de independencia entre orden de concentración y orden de respuesta | | | |
|---|----------|-------------|-------|
| | χ^2 | Pr χ^2 | r^2 |
| Tira 1 | 14 | 0.0073 | 1.000 |
| Tira 2 | 14 | 0.0073 | 1.000 |
| Tira 1 y 2 | 28 | <0.0001 | 1.000 |

9.2.2 Sensibilidad y especificidad

Para la sensibilidad y la especificidad los criterios de aceptación son:

- **Sensibilidad:** El límite inferior de confianza al 95% para la sensibilidad excede 0.8 (LIC(S) \geq 0.8).
- **Especificidad:** El límite inferior de confianza al 95% para la especificad excede 0.8 (LIC (E) \geq 0.8).

Las absorbancias obtenidas en las cinco placas realizadas se describen en la tabla 32, la tabla 33 corresponde a las unidades Panbio calculadas a partir de las absorbancias. La tabla 34 es de contingencia, con dos criterios de clasificación para los testigos. Estas tablas se pueden consultar en el anexo 14.4.

La tabla 35 exhibe el valor de sensibilidad y especificidad del método evaluado.

Tabla 35. Cálculo de la sensibilidad y especificidad, con intervalos de confianza al 95% (LIC y LSC(S) y LIC y LSC (E)).

| Clasificación verdadera de la muestra | Clasificación de la muestra por el método analítico | | |
|---------------------------------------|---|----------|-------|
| | Positiva | Negativa | Total |
| Positivo | 15 | 0 | 15 |
| Negativo | 0 | 15 | 15 |
| Total | 15 | 15 | 15 |

| | |
|---------------|-----|
| Sensibilidad | S=1 |
| Especificidad | E=1 |

9.2.3 Selectividad

Para evaluar la selectividad de la metodología de ELISA IgM, se utilizaron los testigos positivo, negativo y calibradores del equipo de diagnóstico, además de muestras de suero ya confirmadas como negativas para dengue, muestras de suero positivo al virus de la influenza tipo A, al virus de sarampión y al virus de rubéola. Se decidieron probar estos virus ya que son algunos de los otros agentes etiológicos que se diagnostican el LCE, por lo que se evalúa la presencia de reacciones cruzadas de estos virus en las métodos para diagnosticar dengue.

En el protocolo de verificación del ELISA IgM se propusieron estos criterios de aceptación:

- Validez de la prueba para cada placa (CALIBRADORES):
 - ❖ $UP_{TN} < 9$
 - ❖ $UP_{TP} > 11$

- Selectividad para muestra de cada placa:
 - ❖ $UP_{SN} < 9$
 - ❖ $UP_{IA} < 9$
 - ❖ $UP_{Sa} < 9$
 - ❖ $UP_{Ru} < 9$

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 36 y tabla 37. Ver anexo 14.4.

9.2.4 Precisión intermedia del método

Para determinar si el método de ELISA IgM presenta precisión intermedia, los resultados obtenidos durante las pruebas deben cumplir los siguientes criterios de aceptación:

- Validez de la prueba para cada placa de la combinación analista día.
 - ❖ $UP_{TN} < 9$
 - ❖ $UP_{TP} > 11$

- Repetibilidad del método.
 - ❖ $UP_{SN} < 9$ en cada placa de la combinación analista – día.
 - ❖ $UP_{SPB} > 11$ en cada placa de la combinación analista – día.
 - ❖ $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 11$ en cada placa de la combinación analista – día.

- Reproducibilidad entre días / analista.
 - ❖ $UP_{SN} < 9$ para las placas de los dos días de cada analista.
 - ❖ $UP_{SPB} > 11$ para las placas de los dos días de cada analista.
 - ❖ $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 11$ para las placas de los dos días de cada analista.

- Reproducibilidad entre analista.
 - ❖ $UP_{SN} < 9$ para las placas de los dos analistas.
 - ❖ $UP_{SPB} > 11$ para las placas de los dos analista.
 - ❖ $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 11$ para las placas de los dos analistas.

Para ver los resultados consultar las tablas 38 y 39 en el anexo 14.4.

9.2.5 Estabilidad analítica de la muestra

Este parámetro se evaluó realizando cuatro combinaciones diferentes, dónde se probaron dos variaciones: el tiempo de incubación para desarrollo del color azul y el tiempo de reposo después de generado el color amarillo.

- Desarrollo del color azul: esto ocurre en el momento del procedimiento dónde se añade un sistema de sustrato incoloro (tetrametilbencidina / peróxido de hidrógeno) llamado "cromógeno TMB". La enzima peroxidasa de rábano, si se encuentra

presente y utilizando el poder reductor del peróxido de hidrógeno, cataliza la oxidación del sustrato tetrametilbencidina convirtiéndose en un compuesto colorido azul.

Aquí entra la primera variación, la metodología experimental expuesta en el inserto del equipo de diagnóstico, indica que el tiempo de incubación una vez añadido el cromógeno TMB es de 10 minutos. Los tiempos de incubación probados fueron de 7 minutos y 13 minutos.

- El desarrollo del color amarillo se genera cuando la reacción entre la enzima peroxidasa y el sustrato se interrumpe añadiendo una "solución de paro", que es una sustancia ácida. En estas condiciones ácidas el TMB cambia a amarillo. El cambio de color indica la presencia de anticuerpos del tipo IgM para dengue en la muestra de ensayo.

Según el inserto tenemos un tiempo de 30 minutos para leer la placa una vez generado el color, pues después de ese tiempo no se asegura la estabilidad. Los tiempos de reposo probados para la lectura fueron a los 25 minutos y a los 35 minutos de haber cambiado al color amarillo.

Se habla de estabilidad analítica de la muestra, cuando la señal dentro de una metodología analítica a diferentes condiciones presenta estabilidad. Los criterios de aceptación que debe cumplir este método para que sea considerado con buena estabilidad analítica de la muestra son:

- Validez de la prueba para cada placa.
 - ❖ $UP_N < 9$
 - ❖ $UP_P > 11$
- Estabilidad de la señal analítica al tiempo de incubación de desarrollo del color azul.
 - ❖ $UP_{SN} < 9$ en las placas TAA, TAB, TBA y TBB.
 - ❖ $UP_{SPB} > 11$ en las placas TAA y TAB.
 - ❖ $UP_{SPB} > 11$ en las placas TBA y TBB.
 - ❖ UP_{SPB} de las placas TBA y TBB debe ser concordante al de las placas TAA y TAB.
 - ❖ $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 11$ en las placas TAA y TAB.
 - ❖ $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 11$ en las placas TBA y TBB.

- ❖ UP_{SPA} de las placas TBA y TBB debe ser concordante al de las placas TAA y TAB.
- Estabilidad de la señal analítica al tiempo de incubación de reposo una vez generado el color amarillo.
 - ❖ $UP_{SN} < 9$ en las placas TAA, TAB, TBA y TBB.
 - ❖ $UP_{SPB} > 11$ en las placas TAA y TBA.
 - ❖ $UP_{SPB} > 11$ en las placas TAB y TBB.
 - ❖ UP_{SPB} de las placas TAA y TBA debe ser concordante al de las placas TAB y TBB.
 - ❖ $UP_{SPA} > 11 > UP_{SPB}$ en las placas TAA y TBA.
 - ❖ $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 11$ en las placas TAB y TBB.
 - ❖ UP_{SPA} de las placas TAA y TBA debe ser concordante al de las placas TAB y TBB.

Los resultados se exhiben en la tabla 40 y la tabla 41, ver anexo 14.4.

9.2.6 Estabilidad de la muestra

Este parámetro es importante pues demuestra que un analito es estable en una muestra antes de ser procesada por el método.

- La estabilidad del analito se probó en cinco diferentes condiciones.
 - ❖ CE0: determinación al momento de obtener la muestra.
 - ❖ CE1: muestras almacenadas por 24 horas de 2 a 8 °C.
 - ❖ CE2: muestras almacenadas por 48 horas en congelación (-20 °C o menos).
 - ❖ CE3: muestras almacenadas en hielo por 60 minutos.
 - ❖ CE4: muestras a la condición de mesa de laboratorio ó temperatura ambiente por 60 minutos.

Los criterios de aceptación planteados en el protocolo de verificación son:

- Validez de la prueba para cada placa de cada condición de almacenaje.
 - ❖ $UP_N < 9$
 - ❖ $UP_P > 11$
- Estabilidad de la muestra almacenada por 24 horas de 2 a 8 °C.

- ❖ $UP_{SN} < 9$ en las placas CEo y CE1.
- ❖ $UP_{SPB} > 11$ en las en las placas CEo y CE1.
- ❖ $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 11$ en las placas CEo y CE1.
- Estabilidad de la muestra almacenada por 48 horas en congelación (-20 °C o menos).
 - ❖ $UP_{SN} < 9$ en las placas CEo y CE2.
 - ❖ $UP_{SPB} > 11$ en las en las placas CEo y CE2.
 - ❖ $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 11$ en las placas CEo y CE2.
- Estabilidad de la muestra almacenada en hielo por 60 minutos.
 - ❖ $UP_{SN} < 9$ en las placas CEo y CE3.
 - ❖ $UP_{SPB} > 11$ en las en las placas CEo y CE3.
 - ❖ $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 11$ en las placas CEo y CE3.
- Estabilidad de la muestra almacenada a la condición de mesa de laboratorio por 60 minutos.
 - ❖ $UP_{SN} < 9$ en las placas CEo y CE4.
 - ❖ $UP_{SPB} > 11$ en las en las placas CEo y CE4.
 - ❖ $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 11$ en las placas CEo y CE4.

Los resultados se muestran en las tablas 42 y 43, anexo 14.4.

9.2.7 Tolerancia

Decir que un método posee tolerancia, significa que tiene la capacidad de tolerar cambios en situaciones críticas, como por ejemplo la utilización de algunos de los reactivos críticos provenientes de diferentes lotes y que estos cambios no afecten el resultado final.

En el presente estudio se verificó la tolerancia del método al cambio de lote de reactivos críticos como son:

- Cromógeno TMB
- Antígenos de Dengue 1-4 (recombinantes)
- Anticuerpos monoclonales contra el virus del dengue (serotipos 1-4), conjugado con HRP.

Se realizaron cuatro tratamientos con dos diferentes lotes de estos reactivos (tabla 44); se llevaron a cabo las determinaciones por triplicado de suero negativo, suero positivo a nivel bajo y suero positivo a nivel alto de anticuerpos IgM de dengue por un mismo analista

utilizando los mismos testigos, soluciones, equipos, instrumentos, modificando los lotes de los reactivos críticos mencionados.

Las variaciones de cada tratamiento son las siguientes:

- Lote del cromógeno TMB, del antígeno y del AcMo (trazador) del propio equipo diagnóstico (T₁).
- Lote del cromógeno TMB de otro equipo diagnóstico y del antígeno y AcMo (trazador) del propio equipo (T₂).
- Lote del cromógeno TMB del propio equipo diagnóstico, del antígeno de otro equipo para el diagnóstico y del AcMo (trazador) del propio equipo (T₃).
- Lote del cromógeno TMB del propio equipo diagnóstico, y del antígeno y del AcMo de otro equipo diagnóstico (T₄).

Los criterios de aceptación que se deben cumplir para dar válida la prueba y decir que el método tiene tolerancia son los siguientes:

- Validez de la prueba para cada placa de cada tratamiento.
 - ❖ $UP_N < 9$
 - ❖ $UP_P > 11$
- Tolerancia para el lote de TMB:
 - ❖ $UP_{SN} < 9$ para los tratamientos T₁ y T₂.
 - ❖ $UP_{SNB} > 11$ para los tratamientos T₁ y T₂.
 - ❖ $UP_{SNA} > UP_{SNB} > 11$ para los tratamientos T₁ y T₂.
- Tolerancia para el lote de antígeno.
 - ❖ $UP_{SN} < 9$ para los tratamientos T₁ y T₃.
 - ❖ $UP_{SNB} > 11$ para los tratamientos T₁ y T₃.
 - ❖ $UP_{SNA} > UP_{SNB} > 11$ para los tratamientos T₁ y T₃.
- Tolerancia para el lote del AcMo (trazador).
 - ❖ $UP_{SN} < 9$ para los tratamientos T₁ y T₄.
 - ❖ $UP_{SNB} > 11$ para los tratamientos T₁ y T₄.
 - ❖ $UP_{SNA} > UP_{SNB} > 11$ para los tratamientos T₁ y T₄.

Tabla 44. Número de lote de los diferentes equipos para el diagnóstico utilizados para evaluar este parámetro.

| | |
|------------------------------|-------------|
| Equipo para el diagnóstico 1 | Lote: 11089 |
| Equipo para el diagnóstico 2 | Lote: 12032 |

Los resultados correspondientes a este parámetro se muestran en las tablas 45 y 46 del anexo 14.4.

9.2.8 Robustez

Como en el protocolo anterior para la evaluación del parámetro de robustez se evaluaron varios factores, esta vez se verificó que el método analítico es robusto a 6 factores:

- Dilución del antígeno o factor A.
- Tiempo de realizada la mezcla del AcMo (trazador) y del antígeno diluido (Ag) o factor B.
- Primer tiempo de incubación (AcMo – Ag – placa) o factor C.
- Primera temperatura de incubación (AcMo – Ag – placa) o factor D.
- Segundo tiempo de incubación (AcMo – Ag – placa) o factor F.
- Segunda temperatura de incubación (AcMo – Ag – placa) o factor G.

Utilizando el diseño de Placket Burman para un estudio de 6 factores, se obtienen 8 combinaciones o tratamientos de los factores bajo estudio, ver tabla 47. Para ello es necesario fijar los valores de nivel bajo (-) y de nivel alto (+) de los factores.

Tabla 47. Valores de nivel bajo y alto de cada factor.

| FACTOR | CÓDIGO | VALOR DEL NIVEL BAJO (-) | VALOR DEL NIVEL ALTO (+) |
|---|--------|--------------------------|--------------------------|
| Dilución del antígeno | A | 1/200 | 1/300 |
| Tiempo de realizada la primera mezcla del AcMo (trazador) y del antígeno diluido (Ag) | B | 50 minutos | 70 minutos |
| Primer tiempo de incubación (AcMo – Ag – placa) | C | 50 minutos | 70 minutos |
| Primera temperatura de incubación (AcMo – Ag – placa) | D | 35 °C | 39 °C |
| Segundo tiempo de incubación (AcMo – Ag – placa) | F | 50 minutos | 70 minutos |
| Segunda temperatura de incubación (AcMo – Ag – placa) | G | 35 °C | 39 °C |

Las ocho diferentes combinaciones o tratamientos se muestran a continuación, en la tabla 48:

Tabla 48. Combinaciones de los factores en cada tratamiento.

| CORRIDA O TRATAMIENTO | NIVEL DEL FACTOR / VALOR DEL NIVEL DEL FACTOR | | | | | |
|-----------------------|---|------------|------------|-----------|------------|-----------|
| | A | B | C | D | F | G |
| 1 | + / 300 | - / 50 min | - / 50 min | + / 39 °C | + / 70 min | + / 39 °C |
| 2 | + / 300 | + / 70 min | - / 50 min | - / 35 °C | - / 50 min | + / 39 °C |
| 3 | + / 300 | + / 70 min | + / 70 min | - / 35 °C | + / 70 min | - / 35 °C |
| 4 | - / 200 | + / 70 min | + / 70 min | + / 39 °C | - / 50 min | + / 39 °C |
| 5 | + / 300 | - / 50 min | + / 70 min | + / 39 °C | - / 50 min | - / 35 °C |
| 6 | - / 200 | + / 70 min | - / 50 min | + / 39 °C | + / 70 min | - / 35 °C |
| 7 | - / 200 | - / 50 min | + / 70 min | - / 35 °C | + / 70 min | + / 39 °C |
| 8 | - / 200 | - / 50 min | - / 50 min | - / 35 °C | - / 50 min | - / 35 °C |

En cada condición de análisis o tratamiento se lleva a cabo la determinación de las muestras por triplicado (suero negativo, suero positivo a nivel bajo y suero positivo a nivel alto de anticuerpos IgM de dengue por un mismo analista utilizando los mismos testigos, reactivos, soluciones, equipos, instrumentos.

Para esta prueba los criterios de aceptación son:

- Validez de la prueba para cada placa de cada tratamiento.
 - ❖ $UP_N < 9$
 - ❖ $UP_P > 11$

Robustez

- Para el factor dilución del antígeno (A).
 - ❖ $UP_{SN} < 9$ en las placas 1, 2, 3, 5 y 4, 6, 7, 8 y concordantes.
 - ❖ $UP_{SPB} > 11$ en las placas 1, 2, 3, 5 y 4, 6, 7, 8 y concordantes.
 - ❖ $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 11$ en las placas 1, 2, 3, 5 y 4, 6, 7, 8 y concordantes.
- Para el factor tiempo de realizada la primera mezcla del AcMo (trazador) y del antígeno diluido (Ag) (B).
 - ❖ $UP_{SN} < 9$ en las placas 2, 3, 4, 6 y 1, 5, 7, 8 y concordantes.
 - ❖ $UP_{SPB} > 11$ en las placas 2, 3, 4, 6 y 1, 5, 7, 8 y concordantes.

- ❖ $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 11$ en las placas 2, 3, 4, 6 y 1, 5, 7, 8 y concordantes.
- Para el factor primer tiempo de incubación (AcMo – Ag – placa) (C).
 - ❖ $UP_{SN} < 9$ en las placas 3, 4, 5, 7 y 1, 2, 6, 8 y concordantes.
 - ❖ $UP_{SPB} > 11$ en las placas 3, 4, 5, 7 y 1, 2, 6, 8 y concordantes.
 - ❖ $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 11$ en las placas 3, 4, 5, 7 y 1, 2, 6, 8 y concordantes.
- Para el factor primera temperatura de incubación (AcMo – Ag – placa) (D).
 - ❖ $UP_{SN} < 9$ en las placas 1, 4, 5, 6 y 2, 3, 7, 8 y concordantes.
 - ❖ $UP_{SPB} > 11$ en las placas 1, 4, 5, 6 y 2, 3, 7, 8 y concordantes.
 - ❖ $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 11$ en las placas 1, 4, 5, 6 y 2, 3, 7, 8 y concordantes.
- Para el factor Segundo tiempo de incubación (AcMo – Ag – placa) (F).
 - ❖ $UP_{SN} < 9$ en las placas 1, 3, 6, 7 y 2, 4, 5, 8 y concordantes.
 - ❖ $UP_{SPB} > 11$ en las placas 1, 3, 6, 7 y 2, 4, 5 y concordantes.
 - ❖ $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 11$ en las placas 1, 3, 6, 7 y 2, 4, 5 y concordantes.
- Para el factor segunda temperatura de incubación (AcMo – Ag – placa) (AcMo – Ag – placa) (G).
 - ❖ $UP_{SN} < 9$ en las placas 1, 2, 4, 7 y 3, 5, 6, 8 y concordantes.
 - ❖ $UP_{SPB} > 11$ en las placas 1, 2, 4, 7 y 3, 5, 6, 8 y concordantes.
 - ❖ $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 11$ en las placas 1, 2, 4, 7 y 3, 5, 6, 8 y concordantes.

Para ver los resultados consultar el anexo 14.4, tablas 49 y 50.

9.3 ELISA IgG

La verificación de la metodología de ELISA IgG para dengue, es idéntica a la del ELISA IgM, los parámetros evaluados son exactamente los mismos, con muy pocas variaciones en su metodología.

9.3.1 Proporcionalidad y precisión del sistema

Para que este parámetro sea aceptado requiere que los resultados generados cumplan los siguientes criterios de aceptación:

- Para la combinación tira – dilución:
 - ❖ El coeficiente de variación no debe exceder el 20% ($CV \leq 20\%$).
- Para cada tira de análisis:
 - ❖ Prueba de independencia de Pearson: $Pr\chi^2 < 0.05$.
 - ❖ Medida de asociación de Spearman: $r^2 \geq 0.98$.
- Para las dos tiras de análisis
 - ❖ Prueba de independencia de Pearson: $Pr\chi^2 < 0.05$.
 - ❖ Medida de asociación de Spearman: $r^2 \geq 0.98$.

Los resultados de las placas se visualizan en las tablas 51 y 52 anexo 14.4. La tabla 53 muestra la prueba de independencia de Pearson y la medida de asociación de Spearman de las tiras.

Tabla 53. Prueba χ^2 de independencia de Pearson y medida de asociación de Spearman (r^2)

| Prueba de independencia entre orden de concentración y orden de respuesta | | | |
|---|----------|------------|-------|
| | χ^2 | $Pr\chi^2$ | r^2 |
| Tira 1 | 14 | 0.0073 | 1.000 |
| Tira 2 | 14 | 0.0073 | 1.000 |
| Tira 1 y 2 | 28 | <0.0001 | 1.000 |

9.3.2 Sensibilidad y especificidad

Para la sensibilidad y la especificidad los criterios de aceptación son:

- **Sensibilidad:** El límite inferior de confianza al 95% para la sensibilidad excede 0.8 (LIC(S) \geq 0.8).
- **Especificidad:** El límite inferior de confianza al 95% para la especificidad excede 0.8 (LIC(E) \geq 0.8).

Para ver los resultados consultar el anexo 14.4, tablas 54, 55 y 56. La tabla 57 muestra el cálculo de sensibilidad y especificidad del método.

Tabla 57. Cálculo de la sensibilidad (s) y especificidad (e) del método, así como su intervalo de confianza al 95% (LIC(S), LSC(S) y LIC (E), LSC (E)).

| Clasificación verdadera de la muestra | Clasificación de la muestra por el método analítico | | |
|---------------------------------------|---|----------|-------|
| | Positiva | Negativa | Total |
| Positivo | 9 | 0 | 9 |
| Negativo | 0 | 9 | 9 |
| Total | 9 | 9 | 18 |

| | | |
|----------------------|-----------------|------------|
| Sensibilidad | $S = a / (a+c)$ | S=1 |
| Especificidad | $E = d / (b+d)$ | E=1 |

9.3.3 Selectividad

Para evaluar la selectividad de la metodología de ELISA IgG, se utilizaron los testigos positivo, negativo y calibradores del equipo diagnóstico, además de muestras de suero ya confirmadas como negativas para dengue, muestras de suero positivo al virus de la influenza tipo A, al virus de sarampión y al virus de rubéola. Se decidieron probar estos virus ya que son algunos de los otros agentes etiológicos que se diagnostican el LCE, por lo que se evalúa la presencia de reacciones cruzadas de estos virus en los métodos para diagnosticar dengue.

Para aceptar este parámetro se propusieron los siguientes criterios de aceptación:

- Validez de la prueba para cada placa (CALIBRADORES):
 - ❖ $UP_{TN} < 18$
 - ❖ $UP_{TP} > 22$

- Selectividad para muestra de cada placa:
 - ❖ $UP_{SN} < 18$
 - ❖ $UP_{IA} < 18$
 - ❖ $UP_{Sa} < 18$
 - ❖ $UP_{Ru} < 18$

Los resultados de las placas de este parámetro se describen en las tablas 58 y 59 del anexo 14.4.

9.3.4 Precisión intermedia del método

Para determinar si el método de ELISA IgG presenta precisión intermedia (para que pueda ser reproducido por diferentes analistas en diferentes días de análisis, manteniendo sus características de especificidad y sensibilidad) los resultados obtenidos durante las pruebas deben cumplir los siguientes criterios de aceptación:

- Validez de la prueba para cada placa de la combinación analista día.
 - ❖ $UP_{TN} < 18$
 - ❖ $UP_{TP} > 22$

- Repetibilidad del método.
 - ❖ $UP_{SN} < 18$ en cada placa de la combinación analista – día.
 - ❖ $UP_{SPB} > 22$ en cada placa de la combinación analista – día.
 - ❖ $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 22$ en cada placa de la combinación analista – día.

- Reproducibilidad entre días / analista.
 - ❖ $UP_{SN} < 18$ para las placas de los dos días de cada analista.
 - ❖ $UP_{SPB} > 22$ para las placas de los dos días de cada analista.
 - ❖ $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 22$ para las placas de los dos días de cada analista.

- Reproducibilidad entre analista.
 - ❖ $UP_{SN} < 18$ para las placas de los dos analistas.
 - ❖ $UP_{SPB} > 22$ para las placas de los dos analista.
 - ❖ $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 22$ para las placas de los dos analistas.

Para consultar los resultados, dirigirse al anexo 14.4 en las tablas 60 y 61.

9.3.5 Estabilidad analítica de la muestra

Este parámetro se evaluó realizando cuatro combinaciones diferentes, probando dos variaciones: el tiempo de incubación para desarrollo del color azul y el tiempo de reposo después de generado el color amarillo.

- Desarrollo del color azul: esto ocurre en el momento del procedimiento dónde se añade un sistema de sustrato incoloro (tetrametilbencidina / peróxido de hidrógeno) llamado "cromógeno TMB". La enzima peroxidasa de rábano, si se encuentra presente y utilizando el poder reductor del peróxido de hidrógeno, cataliza la oxidación del sustrato tetrametilbencidina convirtiéndose en un compuesto colorido azul.

Aquí entra la primera variación, la metodología experimental expuesta en el inserto del equipo diagnóstico, indica que el tiempo de incubación una vez añadido el cromógeno TMB es de 10 minutos. Los tiempos de incubación probados fueron de 7 minutos y 13 minutos.

- El desarrollo del color amarillo se genera cuando la reacción entre la enzima peroxidasa y el sustrato se interrumpe añadiendo una "solución de paro", que es una sustancia ácida. En estas condiciones ácidas el TMB cambia a amarillo. El cambio de color indica la presencia de anticuerpos del tipo IgG para dengue en la muestra de ensayo.

Según el inserto tenemos un tiempo de 30 minutos para leer la placa una vez generado el color, pues después de ese tiempo no se asegura la estabilidad. Los tiempos de reposo probados para la lectura fueron a los 25 minutos y a los 35 minutos de haber cambiado al color amarillo.

Se habla de estabilidad analítica de la muestra, cuando la señal dentro de una metodología analítica a diferentes condiciones presenta estabilidad. Los criterios de aceptación que debe cumplir este método para que sea considerado con buena estabilidad analítica de la muestra son:

- Validez de la prueba para cada placa.
 - ❖ $UP_N < 18$
 - ❖ $UP_P > 22$

- Estabilidad de la señal analítica al tiempo de incubación de desarrollo del color azul.
 - ❖ $UP_{SN} < 18$ en las placas TAA, TAB, TBA y TBB.
 - ❖ $UP_{SPB} > 22$ en las placas TAA y TAB.
 - ❖ $UP_{SPB} > 22$ en las placas TBA y TBB.
 - ❖ UP_{SPB} de las placas TBA y TBB debe ser concordante al de las placas TAA y TAB.
 - ❖ $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 22$ en las placas TAA y TAB.
 - ❖ $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 22$ en las placas TBA y TBB.
 - ❖ UP_{SPA} de las placas TBA y TBB debe ser concordante al de las placas TAA y TAB.

- Estabilidad de la señal analítica al tiempo de incubación de reposo una vez generado el color amarillo.
 - ❖ $UP_{SN} < 18$ en las placas TAA, TAB, TBA y TBB.
 - ❖ $UP_{SPB} > 22$ en las placas TAA y TBA.
 - ❖ $UP_{SPB} > 22$ en las placas TAB y TBB.
 - ❖ UP_{SPB} de las placas TAA y TBA debe ser concordante al de las placas TAB y TBB.
 - ❖ $UP_{SPA} > 22 > UP_{SPB}$ en las placas TAA y TBA.
 - ❖ $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 22$ en las placas TAB y TBB.
 - ❖ UP_{SPA} de las placas TAA y TBA debe ser concordante al de las placas TAB y TBB.

Las tablas 62, 63 y 64 muestran los resultados de este parámetro, ver anexo 14.4.

9.3.6 Estabilidad de la muestra

Este parámetro es importante pues demuestra que un analito es estable en una muestra antes de ser procesada por el método.

- La estabilidad del analito se probó en cinco diferentes condiciones.
 - ❖ CE₀: determinación al momento de obtener la muestra.
 - ❖ CE₁: muestras almacenadas por 24 horas de 2 a 8 °C.
 - ❖ CE₂: muestras almacenadas por 48 horas en congelación (-20 °C o menos).
 - ❖ CE₃: muestras almacenadas en hielo por 60 minutos.
 - ❖ CE₄: muestras a la condición de mesa de laboratorio ó temperatura ambiente por 60 minutos.

Los criterios de aceptación planteados en el protocolo de verificación son:

- Validez de la prueba para cada placa de cada condición de almacenaje.
 - ❖ $UP_N < 18$
 - ❖ $UP_P > 22$
- Estabilidad de la muestra almacenada por 24 horas de 2 a 8 °C.
 - ❖ $UP_{SN} < 18$ en las placas CE₀ y CE₁.
 - ❖ $UP_{SPB} > 22$ en las en las placas CE₀ y CE₁.
 - ❖ $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 22$ en las placas CE₀ y CE₁.
- Estabilidad de la muestra almacenada por 48 horas en congelación (-20 °C o menos).
 - ❖ $UP_{SN} < 18$ en las placas CE₀ y CE₂.
 - ❖ $UP_{SPB} > 22$ en las en las placas CE₀ y CE₂.
 - ❖ $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 22$ en las placas CE₀ y CE₂.
- Estabilidad de la muestra almacenada en hielo por 60 minutos.
 - ❖ $UP_{SN} < 18$ en las placas CE₀ y CE₃.
 - ❖ $UP_{SPB} > 22$ en las en las placas CE₀ y CE₃.
 - ❖ $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 22$ en las placas CE₀ y CE₃.
- Estabilidad de la muestra almacenada a la condición de mesa de laboratorio por 60 minutos.
 - ❖ $UP_{SN} < 18$ en las placas CE₀ y CE₄.
 - ❖ $UP_{SPB} > 22$ en las en las placas CE₀ y CE₄.
 - ❖ $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 22$ en las placas CE₀ y CE₄.

Los resultados se muestran en las tablas 65 y 66, ver anexo 14.4.

9.3.7 Tolerancia

Para esta metodología de detección de anticuerpos tipo IgG para dengue, se verificará la tolerancia del método al cambio de lote de reactivos críticos como son:

- Cromógeno TMB
- Antígenos de Dengue 1-4 (recombinantes)
- Anticuerpos monoclonales contra el virus del dengue (serotipos 1-4), conjugado con HRP.

Se realizaron cuatro tratamientos con dos diferentes lotes de estos reactivos; se llevaron a cabo las determinaciones por triplicado de suero negativo, suero positivo a nivel bajo y suero positivo a nivel alto de anticuerpos IgG de dengue por un mismo analista utilizando los mismos testigos, soluciones, equipos, instrumentos, modificando los lotes de los reactivos críticos mencionados.

Las variaciones de cada tratamiento son las siguientes:

- Lote del cromógeno TMB, del antígeno y del AcMo (trazador) del propio equipo (T₁).
- Lote del cromógeno TMB de otro equipo y del antígeno y AcMo (trazador) del propio equipo diagnóstico (T₂).
- Lote del cromógeno TMB del propio equipo diagnóstico, del antígeno de otro equipo y del AcMo (trazador) del propio equipo para diagnóstico (T₃).
- Lote del cromógeno TMB del propio equipo, del antígeno y del AcMo de otro equipo (T₄).

Los registros de absorbancia y unidades Panbio no mostraron falsos positivos o falsos negativos, la respuesta analítica de las muestras fue buena, tanto en los sueros positivos a nivel alto, como en los sueros positivos a nivel bajo, siendo la respuesta analítica más elevada en los sueros positivos altos. Lo anterior demuestra que las determinaciones no se ven afectadas por la presencia de reactivos de otro equipo para diagnóstico con diferente lote (cromógeno TMB, antígeno y AcMo), lo que significa existe tolerancia a diferentes lotes.

Los criterios de aceptación que se deben cumplir para dar válida la prueba y decir que el método tiene tolerancia son los siguientes:

- Validez de la prueba para cada placa de cada tratamiento.
- ❖ $UP_N < 18$
- ❖ $UP_P > 22$

- Tolerancia para el lote de TMB:
 - ❖ $UP_{SN} < 18$ para los tratamientos T₁ y T₂.
 - ❖ $UP_{SNB} > 22$ para los tratamientos T₁ y T₂.
 - ❖ $UP_{SNA} > UP_{SNB} > 22$ para los tratamientos T₁ y T₂.

- Tolerancia para el lote de antígeno.
 - ❖ $UP_{SN} < 18$ para los tratamientos T₁ y T₃.
 - ❖ $UP_{SNB} > 22$ para los tratamientos T₁ y T₃.
 - ❖ $UP_{SNA} > UP_{SNB} > 22$ para los tratamientos T₁ y T₃.

- Tolerancia para el lote del AcMo (trazador).
 - ❖ $UP_{SN} < 18$ para los tratamientos T₁ y T₄.
 - ❖ $UP_{SNB} > 22$ para los tratamientos T₁ y T₄.
 - ❖ $UP_{SNA} > UP_{SNB} > 22$ para los tratamientos T₁ y T₄.

Los números de lote de los equipos de diagnóstico utilizados en este parámetro se muestran en la tabla 67.

Tabla 67. Número de lote de los diferentes equipos para el diagnóstico utilizados para evaluar este parámetro.

| EQUIPO PARA EL DIAGNÓSTICO | LOTE |
|------------------------------|-------|
| Equipo para el diagnóstico 1 | 11185 |
| Equipo para el diagnóstico 2 | 11353 |

Los registros de absorbancia y unidades Panbio se muestran en las tablas 68 y 69 respectivamente, ver anexo 13.4.

9.3.8 Robustez

Para evaluar este parámetro se verificó que el método analítico es robusto a 6 factores:

- Dilución del antígeno o factor A.
- Tiempo de realizada la mezcla del AcMo (trazador) y del antígeno diluido (Ag) o factor B.
- Primer tiempo de incubación (AcMo – Ag – placa) o factor C.
- Primera temperatura de incubación (AcMo – Ag – placa) o factor D.
- Segundo tiempo de incubación (AcMo – Ag – placa) o factor F.
- Segunda temperatura de incubación (AcMo – Ag – placa) o factor G.

Utilizando el diseño de Plackett Burman para un estudio de 6 factores, se obtienen 8 combinaciones o tratamientos de los factores bajo estudio, tabla 70. Para ello es necesario fijar los valores de nivel bajo (-) y de nivel alto (+) de los factores.

Tabla 70. Valores de nivel bajo y alto de cada factor.

| FACTOR | CÓDIGO | VALOR DEL NIVEL BAJO (-) | VALOR DEL NIVEL ALTO (+) |
|---|--------|--------------------------|--------------------------|
| Dilución del antígeno | A | 1/200 | 1/300 |
| Tiempo de realizada la primera mezcla del AcMo (trazador) y del antígeno diluido (Ag) | B | 50 minutos | 70 minutos |
| Primer tiempo de incubación (AcMo – Ag – placa) | C | 50 minutos | 70 minutos |
| Primera temperatura de incubación (AcMo – Ag – placa) | D | 35 °C | 39 °C |
| Segundo tiempo de incubación (AcMo – Ag – placa) | F | 50 minutos | 70 minutos |
| Segunda temperatura de incubación (AcMo – Ag – placa) | G | 35 °C | 39 °C |

Las ocho diferentes combinaciones se muestran a continuación en la tabla 71.

Tabla 71. Combinaciones de los factores en cada tratamiento.

| CORRIDA O TRATAMIENTO | NIVEL DEL FACTOR / VALOR DEL NIVEL DEL FACTOR | | | | | |
|-----------------------|---|------------|------------|-----------|------------|-----------|
| | A | B | C | D | F | G |
| 1 | + / 300 | - / 50 min | - / 50 min | + / 39 °C | + / 70 min | + / 39 °C |
| 2 | + / 300 | + / 70 min | - / 50 min | - / 35 °C | - / 50 min | + / 39 °C |
| 3 | + / 300 | + / 70 min | + / 70 min | - / 35 °C | + / 70 min | - / 35 °C |
| 4 | - / 200 | + / 70 min | + / 70 min | + / 39 °C | - / 50 min | + / 39 °C |
| 5 | + / 300 | - / 50 min | + / 70 min | + / 39 °C | - / 50 min | - / 35 °C |
| 6 | - / 200 | + / 70 min | - / 50 min | + / 39 °C | + / 70 min | - / 35 °C |
| 7 | - / 200 | - / 50 min | + / 70 min | - / 35 °C | + / 70 min | + / 39 °C |
| 8 | - / 200 | - / 50 min | - / 50 min | - / 35 °C | - / 50 min | - / 35 °C |

En cada condición de análisis o tratamiento se lleva a cabo la determinación de las muestras por triplicado (suero negativo, suero positivo a nivel bajo y suero positivo a nivel alto de anticuerpos IgG de dengue por un mismo analista utilizando los mismos testigos, reactivos, soluciones, equipos, instrumentos).

Para esta prueba los criterios de aceptación son:

- Validez de la prueba para cada placa de cada tratamiento.
- ❖ $UP_N < 18$
- ❖ $UP_P > 22$

- Para el factor dilución del antígeno (A).
 - ❖ $UP_{SN} < 18$ en las placas 1, 2, 3, 5 y 4, 6, 7, 8 y concordantes.
 - ❖ $UP_{SPB} > 22$ en las placas 1, 2, 3, 5 y 4, 6, 7, 8 y concordantes.
 - ❖ $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 22$ en las placas 1, 2, 3, 5 y 4, 6, 7, 8 y concordantes.

- Para el factor tiempo de realizada la primera mezcla del AcMo (trazador) y del antígeno diluido (Ag) (B).
 - ❖ $UP_{SN} < 18$ en las placas 2, 3, 4, 6 y 1, 5, 7, 8 y concordantes.
 - ❖ $UP_{SPB} > 22$ en las placas 2, 3, 4, 6 y 1, 5, 7, 8 y concordantes.
 - ❖ $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 22$ en las placas 2, 3, 4, 6 y 1, 5, 7, 8 y concordantes.

- Para el factor primer tiempo de incubación (AcMo – Ag – placa) (C).
 - ❖ $UP_{SN} < 18$ en las placas 3, 4, 5, 7 y 1, 2, 6, 8 y concordantes.
 - ❖ $UP_{SPB} > 22$ en las placas 3, 4, 5, 7 y 1, 2, 6, 8 y concordantes.
 - ❖ $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 22$ en las placas 3, 4, 5, 7 y 1, 2, 6, 8 y concordantes.

- Para el factor primera temperatura de incubación (AcMo – Ag – placa) (D).
 - ❖ $UP_{SN} < 18$ en las placas 1, 4, 5, 6 y 2, 3, 7, 8 y concordantes.
 - ❖ $UP_{SPB} > 22$ en las placas 1, 4, 5, 6 y 2, 3, 7, 8 y concordantes.
 - ❖ $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 22$ en las placas 1, 4, 5, 6 y 2, 3, 7, 8 y concordantes.

- Para el factor Segundo tiempo de incubación (AcMo – Ag – placa) (F).
 - ❖ $UP_{SN} < 18$ en las placas 1, 3, 6, 7 y 2, 4, 5, 8 y concordantes.
 - ❖ $UP_{SPB} > 22$ en las placas 1, 3, 6, 7 y 2, 4, 5 y concordantes.
 - ❖ $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 22$ en las placas 1, 3, 6, 7 y 2, 4, 5 y concordantes.

- Para el factor segunda temperatura de incubación (AcMo – Ag – placa) (AcMo – Ag – placa) (G).
 - ❖ $UP_{SN} < 18$ en las placas 1, 2, 4, 7 y 3, 5, 6, 8 y concordantes.
 - ❖ $UP_{SPB} > 22$ en las placas 1, 2, 4, 7 y 3, 5, 6, 8 y concordantes.
 - ❖ $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 22$ en las placas 1, 2, 4, 7 y 3, 5, 6, 8 y concordantes.

Los resultados se muestran en las tablas 72 y 72, del anexo 13.4.

10 DISCUSION

Una vez realizado el análisis de los datos obtenidos en cada verificación, podemos determinar si cada uno de ellos cumple con los criterios de aceptación propuestos en los protocolos de verificación.

Para la verificación de las técnicas serológicas del algoritmo diagnóstico por laboratorio de FD y FHD, (ELISA de captura del antígeno viral NS1, ELISA de captura de anticuerpos IgM e IgG de dengue), se plantearon evaluar 10 parámetros de desempeño, para cada una:

10.1 Proporcionalidad y precisión del sistema

Para los tres métodos, ELISA NS1, ELISA IgM y ELISA IgG los coeficientes de variación obtenidos fueron:

- **NS1:** Tira 1 (Dil. 50%): 6.594%; Tira 2 (Dil. 100%): 7.145% y Tira 3 (Dil. 200%): 9.6490.
- **IgM:** Tira 1 (Dil. 50%): 15.947%; Tira 2 (Dil. 100%): 6.435 y Tira 3 (Dil. 200%): 3.556.
- **IgG:** Tira 1 (Dil. 50%): 3.06%; Tira 2 (Dil. 100%): 4.40 y Tira 3 (Dil. 200%): 5.26.

Ninguno de los CV en las tres diluciones de cada una de las ELISAS excede el 20%, cumplen con los límites establecidos, lo que significa que existe precisión en el método.

Los valores obtenidos en la prueba χ^2 de independencia de Pearson, entre los criterios de clasificación (χ^2 , Pr χ^2) para cada tira, fue de 0.0073 cada una; para ambas tiras la prueba χ^2 de independencia de Pearson, entre los criterios de clasificación (χ^2 , Pr χ^2) fue menor a 0.0001, por lo que al no exceder el criterio establecido en el protocolo, decimos que entre las dos variables (orden de concentración y orden de intensidad de respuesta) hay independencia.

Las medidas de asociación de Spearman (r^2) calculadas para cada tira por separado y para las dos tiras juntas fueron de 1.000, lo que significa un alto grado de asociación entre las variables evaluadas.

10.2 Sensibilidad y especificidad

Para los tres diferentes ensayos de ELISA, las lecturas de absorbancia y por ende la conversión a unidades Panbio del testigo positivo, el testigo negativo y los calibradores se mantiene constante y concuerda con la clasificación verdadera de la muestra; por lo tanto su sensibilidad y especificidad es del 100%; debido a que no hay variabilidad no se pueden definir límites de confianza ya que estos son iguales a la unidad, por lo tanto se cumple con los criterios de aceptación.

10.3 Selectividad

A partir de las lecturas de densidad óptica de cada una de las placas se obtienen las unidades Panbio de las muestras. En cada uno de los métodos se examinaron los testigos negativos, los testigos positivos y muestras de sueros positivos al virus de influenza H1N1, virus de sarampión y virus de rubéola.

En el caso del ELISA NS₁, para el testigo positivo (TP) el valor de la unidad Panbio es >11 y para el testigo negativo (TN) es <9. Para las muestras con presencia de influenza A (IA), sarampión (Sa) y rubéola (Ru) las unidades Panbio se encuentran <9. Estos resultados cumplen con los parámetros, lo que significa que la metodología es específica para el antígeno NS₁, ya que solo en la presencia de éste la prueba da positiva, demostrando selectividad.

Para el ensayo de ELISA IgM, observamos que el valor de la unidad Panbio del TP es >11 y el TN es <9. Para las muestras con presencia de influenza A, sarampión y rubéola, las unidades Panbio se encuentran <9. Lo que indican estos resultados es que la metodología es específica para anticuerpos IgM contra dengue, ya que solo en la presencia de éstos la prueba resulta positiva, demostrando selectividad.

Finalmente en el tercer ensayo el de ELISA IgG, los resultados fueron similares, la unidad Panbio del TP es >22 y el TN es <18. Para las muestras con presencia de los otros virus se encuentran <18. Estos resultados reflejan que la metodología es específica para anticuerpos IgG contra dengue, ya que solo en la presencia de éstos la prueba da positiva, demostrando selectividad.

10.4 Precisión intermedia del método

Para este parámetro se requirió de un analista adicional, el cuál ejecutó la metodología correspondiente a cada ELISA en diferentes días de análisis, bajo las mismas condiciones.

Para el ELISA NS₁, la unidad Panbio del TP es >11, mientras que la del TN es < 9, lo anterior da validez a la prueba para cada placa.

El método posee repetitibilidad ya que la unidad Panbio del SN es < 9, en cada placa de la combinación analista-día. La unidad del SPB (Suero positivo a nivel bajo) es > 11 y la unidad del SPA (Suero positivo a nivel alto) es > a las unidad Panbio del SPB y por ende > de 11.

La reproducibilidad entre días/analista también se cumple, ya que en las placas de los dos días de cada analista las unidades Panbio de los SN son < 9, las unidades del SPB son > 11 y las unidades del SPA son > a las unidades Panbio de los SPB y por ende > 11.

Entre los analistas también existe reproducibilidad, pues entre las palcas de los dos analistas las unidades Panbio de los SN son < 9, las unidades del SPB son > 11 y las unidades del SPA son > a las unidades Panbio de los SPB y por ende > que 11.

La sensibilidad y especificidad se siguen conservando en el método a pesar de que fue desarrollado por dos analistas diferentes y en días diferentes de análisis, lo anterior se demuestra al observar como las absorbancias aumentan con respecto a la concentración (en los SPA Y SPB, ya que el SPB fue obtenido a partir de diluciones realizadas al SPA), al cumplir con todos los criterios de aceptación establecidos se comprueba que el método es capaz de ser reproducido por diferentes analistas en diferentes días de análisis por lo que posee precisión intermedia del método.

Por su parte, el ELISA IgM fue evaluada de la misma forma que la anterior, los criterios de aceptación son los mismos y todos se cumplen sin excepción. Primero que nada cada placa realizada, tiene validez; el método posee repetitibilidad en cada placa de la combinación analista-día, tiene reproducibilidad entre las placas realizadas por cada analista en diferentes días, y entre los analistas también existe reproducibilidad.

La sensibilidad y especificidad se siguen conservando en el método y al cumplir sin excepción todos los criterios de aceptación, se determina que el método es capaz de ser

reproducido por diferentes analistas en diferentes días de análisis, posee entonces, precisión intermedia del método.

El ELISA IgG es en cuanto a la metodología, es idéntico al ELISA IgM, solo que los valores de las unidades Panbio, que determinan si un resultado es positivo o negativo, son diferentes, por ende los criterios de aceptación poseen diferentes valores, pero en esencia la metodología y las evaluaciones son las mismas.

La unidad Panbio del TP es >22 , mientras que la del TN es < 18 , lo anterior da validez a la prueba para cada placa.

El método posee repetitibilidad ya que la unidad Panbio del SN es < 18 , en cada placa de la combinación analista-día. La unidad del SPB (Suero positivo a nivel bajo) es > 22 y la unidad del SPA (Suero positivo a nivel alto) es $>$ a las unidades Panbio del SPB y por ende $>$ de 22.

La reproducibilidad entre días/analista también se cumple, ya que en las placas de los dos días de cada analista las unidades Panbio de los SN son < 18 , las unidades del SPB son > 22 y las unidades del SPA son $>$ a las unidades Panbio de los SPB y por ende $>$ que 22.

Entre los analistas también existe reproducibilidad, pues entre las placas de los dos analistas las unidades Panbio de los SN son < 18 las unidades del SPB son > 22 y las unidades del SPA son $>$ a las unidades Panbio de los SPB y por ende $>$ que 22.

La sensibilidad y especificidad se siguen conservando en el método y al cumplir con todos los criterios de aceptación establecidos se comprueba que el método es capaz de ser reproducido por diferentes analistas en diferentes días de análisis, por lo tanto posee precisión intermedia del método.

10.5 Estabilidad analítica de la muestra

Sin excepción alguna, en los tres métodos evaluados todos los criterios de aceptación se cumplieron favorablemente, podemos decir que la estabilidad de la señal analítica al tiempo de incubación de desarrollo del color azul y la estabilidad de la señal analítica al tiempo de incubación de reposo una vez generado el color amarillo, las cuáles se ven reflejadas en los valores de las unidades Panbio en las condiciones y tiempos propuestos, no presentan alteración en los resultados de la determinación, por los que estos métodos presentan estabilidad analítica.

10.6 Estabilidad de la muestra

Realizando la comparación de las unidades Panbio obtenidas a partir de muestras recién preparadas (CE0) y de muestras preservadas a diferentes condiciones de temperatura y tiempo (CE1, CE2, CE3, CE4) se demuestra que se conserva la proporcionalidad y con las unidades Panbio calculadas de las muestras analizadas bajo las condiciones propuestas por el método, se comprueba que los analitos (antígeno NS1 del dengue virus, anticuerpos tipo IgM y tipo IgG, contra denguevirus) son estables.

10.7 Tolerancia

Los registros de absorbancia y unidades Panbio no mostraron falsos positivos o falsos negativos, la respuesta analítica de las muestras fue buena, tanto en los sueros positivos a nivel alto, como en los sueros positivos a nivel bajo, siendo la respuesta analítica más elevada en los sueros positivos altos. Lo anterior demuestra que las determinaciones no se ven afectadas por la presencia de reactivos de otro equipo de diagnóstico con diferente lote, lo que significa existe tolerancia a diferentes lotes.

10.8 Robustez

La robustez es la capacidad de un procedimiento analítico de no ser afectado por pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método, provee una indicación de su confiabilidad en condiciones de uso normales.

Absolutamente todas las placas cumplen con los criterios de aceptación. Se demuestra que los factores evaluados para robustez no alteran los resultados esperados, tanto en los testigos (positivo, negativo y calibradores) como en las muestras de suero positivo a nivel bajo y alto, así como el suero negativo. Los datos fueron corroborados por ANOVA arrojando una probabilidad >0.05 lo que indica que no hay interacción entre factores.

El LCE tiene un informe de la verificación, donde se indica que los tres protocolos de los métodos de ensayo verificados, ELISA NS1, ELISA IgM y ELISA IgG, cumplen satisfactoriamente los criterios de aceptación de cada uno los parámetros de desempeño evaluados, lo que indica que los métodos poseen esas características y por ende tienen alto grado de confiabilidad para el diagnóstico.

11 CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en todos los parámetros de desempeño de los tres protocolos de verificación ejecutados (ELISA NS₁, ELISA IgM y ELISA IgG), se demuestra que los métodos de ensayo para identificar al antígeno viral NS₁ y anticuerpos IgM e IgG contra el virus del dengue son aplicables a muestras de suero provenientes de todo el país dentro de las condiciones del Laboratorio Central de Epidemiología.

Los resultados obtenidos en este trabajo respaldan y dan validez al nuevo algoritmo diagnóstico de Fiebre por Dengue y Fiebre Hemorrágica por Dengue propuesto por el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica a través del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológico en 2008, ya que al ser ejecutado en el Laboratorio Central de Epidemiología, laboratorio de referencia del Instituto Mexicano del Seguro Social, donde se confirman los casos probables de dengue en la población derechohabiente, se ha demostrado la gran versatilidad de los equipos utilizados para el diagnóstico serológico de este padecimiento en todo el país, por lo que la hipótesis se acepta.

12 REFERENCIAS

- Alcon, S., Talarmin, A., Debruyne, M., Falconar, A., Deubel, V., & Flamand, M. (2002). Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *J.Clin.Microbiol.*, 40, 376-381.
- Beasley, D. & Barret, A. (2008). The Infectious Agent. In S.Halstead (Ed.), *Dengue. Tropical Medicine. Science and Practice* (London. Imperial College Press.
- CENAM, EMA. Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico; México, Abril 2008.
- Centers for Disease Control and Prevention (2009). *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*. (5° Ed. ed.) Atlanta. U.S. Department of Health and Human Services.
- CONAVE (2011). *Alerta epidemiológica Dengue. Circulación de DENV-3 en México* (Rep. No. DGE/2011/03/DENGUE). D.F.. SINAVE.
- Endy, T., [et.al.] (2008). Diagnosis of Dengue Virus Infectious. In S.Halstead (Ed.), *Dengue. Tropical Medicine* (pp. 327-361). London. Imperial College Press.
- Fauquet, C. M. et. a. (2005). *Virus Taxonomy*. San Diego. Elsevier.Guzman, A. & Isturiz, R. E. (2010).
- Update on the global spread of dengue. *Int.J.Antimicrob.Agents*, 36 Suppl 1, S40-S42.
- Guzman, M. G. & Kouri, G. (2004). Dengue diagnosis, advances and challenges. *Int.J.Infect.Dis.*, 8, 69-80.
- Halstead, S. (2008). Epidemiology. In S.Halstead (Ed.), *Dengue. Tropical Medicine* (pp. 77-82). London. Imperial College Press.
- Hu, D., [et al]. (2011). Kinetics of non-structural protein 1, IgM and IgG antibodies in dengue type 1 primary infection. *Viol.J.*, 8, 47.
- InDRE & RNLSP (2008). *Procedimiento para la aplicación del nuevo algoritmo para diagnóstico por laboratorio de Fiebre por Dengue y Fiebre Hemorrágica por Dengue* D.F.. CENAVECE-InDRE.
- InDRE/SINAVE (2008). *Lineamientos para la Vigilancia Epidemiológica de Fiebre por Dengue y Fiebre Hemorrágica por Dengue*, México. Secretaría de Salud.

InDRE (2009). Panorama Epidemiológico de Fiebre por Dengue y Fiebre por Dengue Hemorrágico en entidades Federativas. [Semana Epidemiológica 52 (27 Diciembre al 2 Enero 2010)]. México, Secretaría de Salud.

InDRE (2010). Panorama Epidemiológico de Fiebre por Dengue y Fiebre por Dengue Hemorrágico en entidades Federativas. [Semana Epidemiológica 52 (27 Diciembre del 2009 al 2 Enero 2010)]. México, Secretaría de Salud.

InDRE (2011). Panorama Epidemiológico de Fiebre por Dengue y Fiebre por Dengue Hemorrágico en entidades Federativas. [Semana Epidemiológica 52. Cierre Preliminar 2011]. México, Secretaría de Salud.

InDRE (2012). Panorama Epidemiológico de Fiebre por Dengue y Fiebre por Dengue Hemorrágico en entidades Federativas. [Semana Epidemiológica 52. Actualizada al 31 de diciembre de 2012)]. México, Secretaría de Salud.

Instituto Mexicano de Normalización y Certificación (2006) NMX-EC-17025-IMNC-2006. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración.

Instituto Mexicano de Normalización y Certificación (2008). NORMA Mexicana NMX -EC-15189-IMNC-2008. Laboratorios Clínicos – Requisitos particulares para la calidad y competencia.

Krauss, H. et. a. (2003). *Zoonoses. Infectious diseases transmissible from animals*. (Third Edition ed.) Washington. American Society of Microbiology. Mahy, B. & Van Regenmortel, M. (2010).

Flaviviruses. General Features. In T.J.Chambers (Ed.), *Desk Encyclopedia of Human and Medical Virology* (pp. 77-82). Madrid. Academic Press, Elsevier. Malavige, G. N., Fernando, S., Fernando, D. J., & Seneviratne, S. L. (2004). Dengue viral infections. *Postgrad.Med.J.*, 80, 588-601.

Mandell, G., [et.al] (2006). Enfermedades Infecciosas. Principios y Práctica. In T.Tsai, D. Vaughn, & T. Solomon (Eds.), *Flavivirus (fiebre amarilla, dengue, fiebre del dengue hemorrágico, encefalitis japonesa, encefalitis del Nilo Occidental, encefalitis transmitida por garrapatas)* (2 ed., pp. 1926-1947). Madrid. Elsevier.

OMS (2005). *Manual de bioseguridad en el laboratorio*. (3° ed.) Ginebra. Organización Mundial de la Salud.

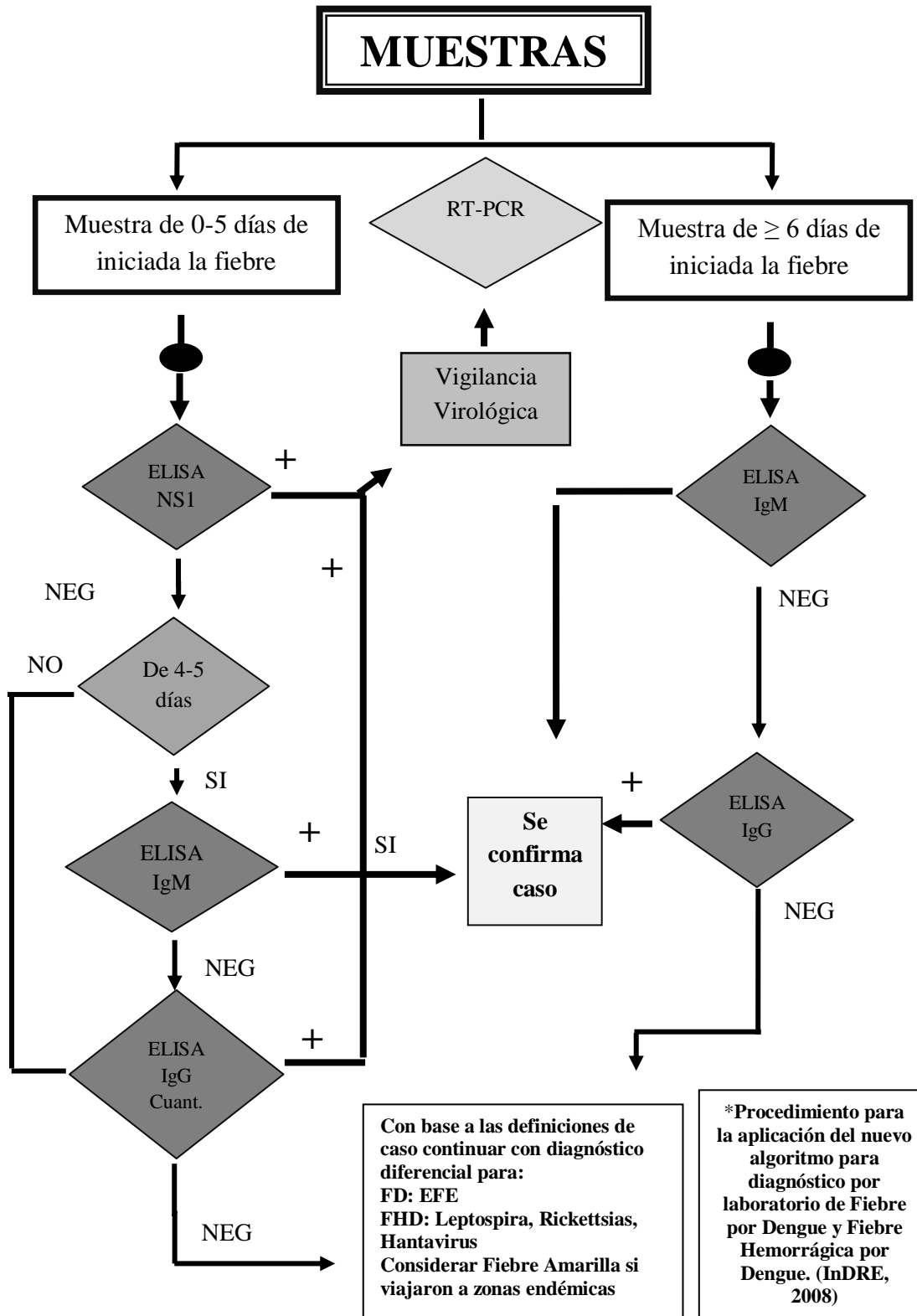
OPS & OMS (2010). Dengue. Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control. La Paz. OPS/OMS.

- Pawitan, J. A. (2011). Dengue virus infection. predictors for severe dengue. *Acta Med.Indones.*, 43, 129-135.
- Secretaría de Salud. (2002). NORMA Oficial Mexicana NOM 032-SSA2-2002 Para la Vigilancia Epidemiológica, Prevención y Control de las Enfermedades Transmitidas por Vector.
- Secretaría de Salud. (2005). Manual para la Vigilancia, Diagnóstico, Prevención y Control del Dengue . 1-129. D.F., Secretaria de Salud.
- Secretaría de Salud. (2011). NORMA Oficial Mexicana NOM 032-SSA2-2010 Para la Vigilancia Epidemiológica, Prevención y Control de las Enfermedades Transmitidas por Vector.
- Secretaría de Salud. (2012). NORMA Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-2012 Para la Vigilancia Epidemiológica.
- Shu, P. Y. & Huang, J. H. (2004). Current advances in dengue diagnosis. *Clin.Diagn.Lab Immunol.*, 11, 642-650.
- Singh, M. P., et al. (2010). Nonstructural protein NS1. Giving a new structure to dengue diagnosis. *J.Clin.Microbiol.*, 48, 4688-4689.
- Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud (2008). *Programa de Acción Específico 2007-2012. Dengue* D.F.. Secretaría de Salud.
- Thomas, L., Najioullah, F., Verlaeten, O., Martial, J., Briclher, S., Kaidomar, S. et al. (2010). Relationship between nonstructural protein 1 detection and plasma virus load in Dengue patients. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, 83, 696-699.
- Vazquez, P. M. (2011). Serotipos de dengue en México durante 2009 y 2010. [2], 103-110. D.F., Boletín del Hospital Infantil de México.
- Wahala, W. M. & Silva, A. M. (2011). The human antibody response to dengue virus infection. *Viruses.*, 3, 2374-2395.
- Zuckerman, A. (2012). Flaviviruses. In B.Schoub & M. Venter (Eds.), *Principles and Practice of Clinical Virology* (Sixth Edition ed., pp. 669-698). Oxford. Wiley-Blackwell.

13 ANEXOS

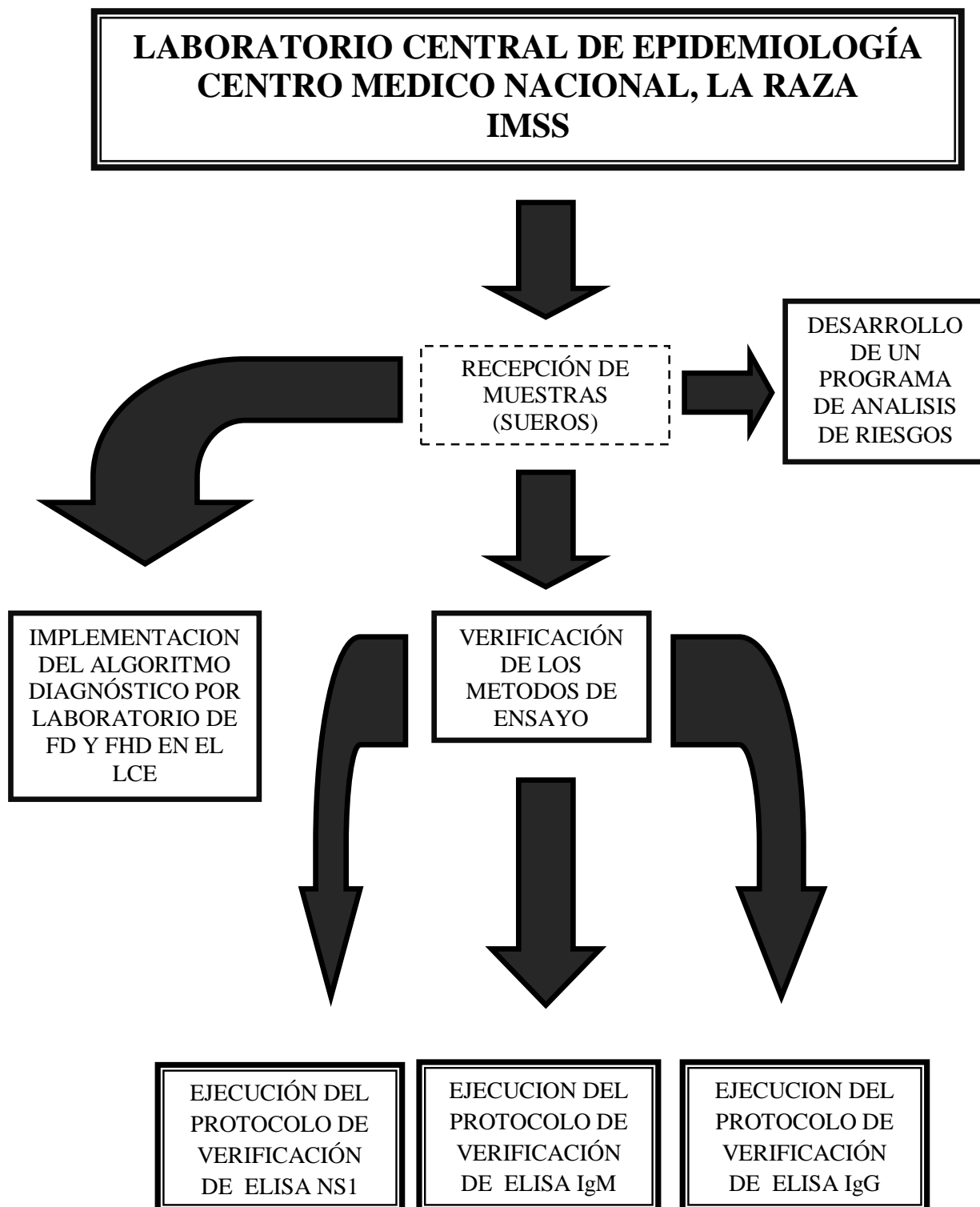
13.1 Diagrama de flujo del algoritmo diagnóstico por laboratorio de FD y FHD.

Diagrama 1. Algoritmo diagnóstico por laboratorio de FD y FHD del SINAVE*



13.2 Estrategia general de trabajo.

Diagrama 2. Estrategia general de trabajo



13.3 Materiales y métodos

13.3.1 Materiales

RECURSOS PARA EJECUTAR LAS VERIFICACIONES DE LOS METODOS DIAGNÓSTICOS DE DENGUE

- Materiales
 - ❖ Guantes Nitrilo (AMBIDER, MEDICAMENTOS INSTITUCIONALES MEXICANOS, N851)
 - ❖ Puntas de micropipeta de 10-100UI (AXIGEN, BIOSELEC, TF 10, TF 200, TF 1000)
 - ❖ Canaletas para reactivos (FALCON, o8100)
 - ❖ Placas de dilución (FALCON, 2500)
 - ❖ DENGUE NS₁. Equipo para el diagnóstico de la proteína viral NS₁ del virus del dengue en sus cuatro serotipos (Panbio).
 - ❖ DENGUE IgM CAPTURE. Equipo para el diagnóstico de anticuerpos IgM contra dengue en sus cuatro serotipos (Panbio).
 - ❖ DENGUE IgG CAPTURE. Equipo para el diagnóstico de anticuerpos IgM contra dengue en sus cuatro serotipos (Panbio).
 - ❖ Bolsa para desecho de puntas (ROCHE, BIODIST, 03 003 198 00).
 - ❖ Botella de desechos líquidos (ROCHE, BIODIST, 03 003 198 00).

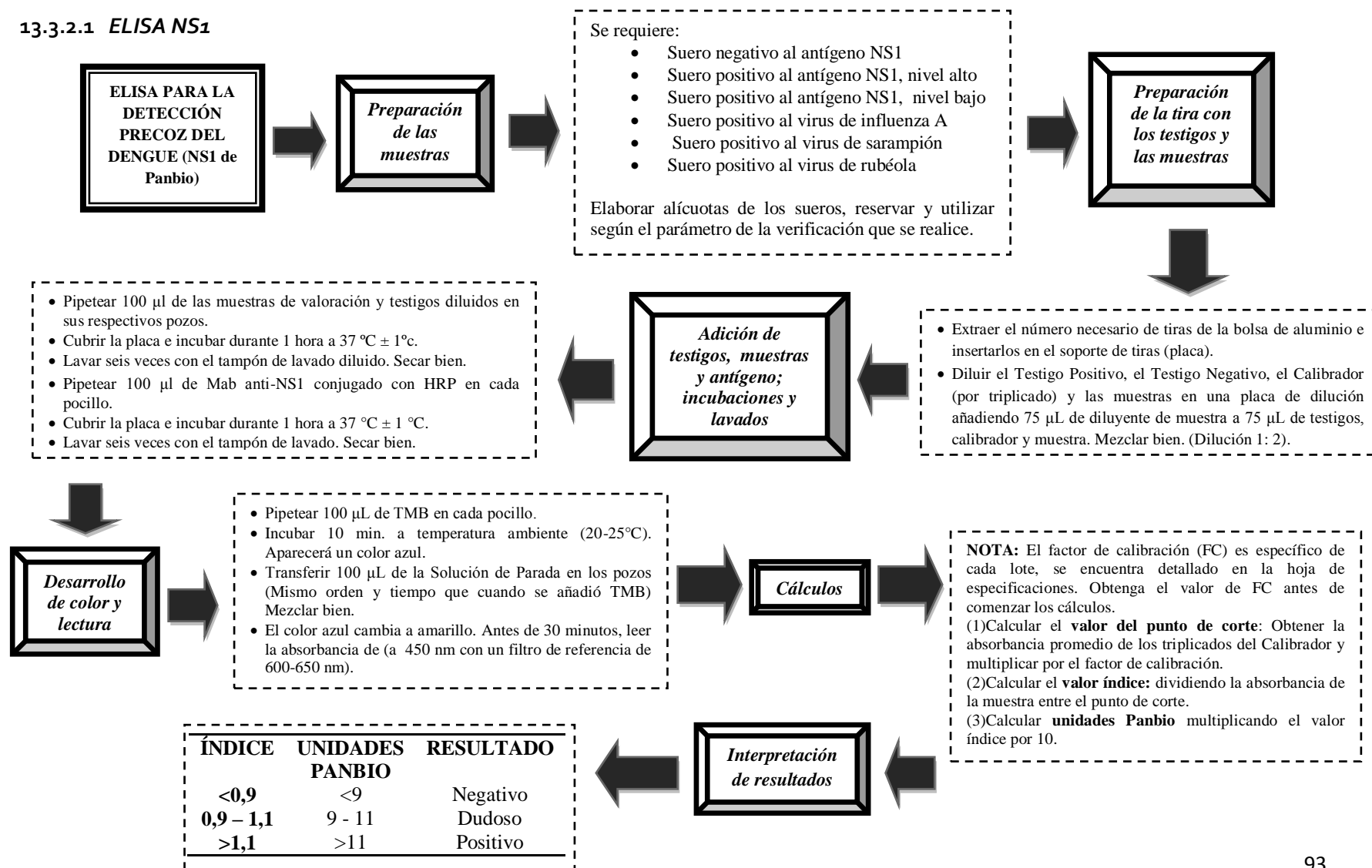
- Material Biológico
 - ❖ Suero negativo
 - ❖ Suero positivo
 - ❖ Suero positivo a virus de Influenza A
 - ❖ Suero positivo a virus de Sarampión (Testigo positivo, equipo para diagnóstico SIEMENS, Enzygnost Anti-Measles).
 - ❖ Suero positivo a virus de Rubéola (Testigo positivo, equipo para diagnóstico SIEMENS, Enzygnost Anti-Rubella).

- Material biológico contenido en el equipo para el diagnóstico de antígeno NS₁ de dengue, anticuerpos IgM contra dengue y anticuerpos IgG de Panbio.
 - ❖ Pozos recubiertos con anti-NS₁
 - ❖ Pozos recubiertos con anti-IgM humana
 - ❖ Pozos recubiertos con anti-IgG humana
 - ❖ Antígenos 1-4 de dengue (Recombinante)
 - ❖ AcMo conjugado con HRP (Trazador)

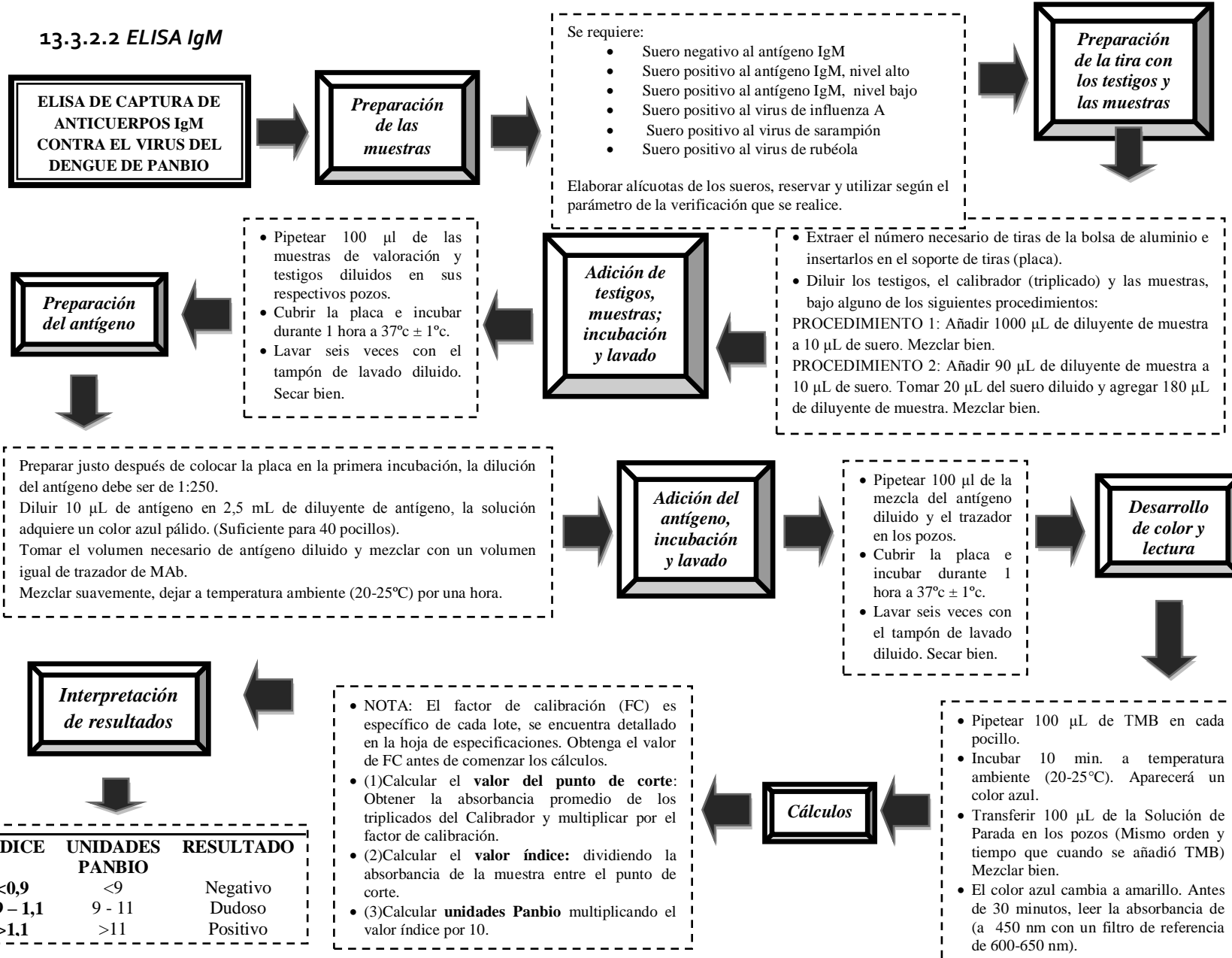
- ❖ Testigos : testigo positivo, testigo negativo y calibrador
- Reactivos y soluciones
 - ❖ Agua desionizada
 - ❖ Etanol al 70% (SIGMA-ADRIK, HYL, E7023)
 - ❖ Hielo
- Reactivos y soluciones contenidos en los equipos de diagnóstico
 - ❖ Solución amortiguadora de lavado (20X)
 - ❖ Diluyente de la muestra
 - ❖ Diluyente del antígeno
 - ❖ Cromógeno TMB
 - ❖ Solución de término
- Equipos e instrumentos
 - ❖ Gabinete de seguridad biológica tipo II (Safegard, 2000).
 - ❖ Micropipetas de volúmenes: 0.5 – 10 μ L, 2-20 μ L, 20-200 μ L y 100-1000 μ L (Eppendorf).
 - ❖ Micropipetas multicanal: 20-300 μ L y 100-1200 μ L (Eppendorf).
 - ❖ Lector de ELISA para placa con filtro de 450 nm y otro de referencia entre 600-650 nm (BIORAD: X-Mark).
 - ❖ Lavador de placas (BIORAD).
 - ❖ Incubadora de placas (BIORAD).
 - ❖ Ultracongelador (RevCo, 7500).

13.3.2 Métodos

13.3.2.1 ELISA NS1



13.3.2.2 ELISA IgM



13.3.2.3 ELISA IgG

ELISA DE CAPTURA DE ANTICUERPOS IgG CONTRA EL VIRUS DEL DENGUE DE PANBIO

Preparación de las muestras

Se requiere:

- Suero negativo al antígeno IgG
- Suero positivo al antígeno IgG, nivel alto
- Suero positivo al antígeno IgG, nivel bajo
- Suero positivo al virus de influenza A
- Suero positivo al virus de sarampión
- Suero positivo al virus de rubéola

Elaborar alícuotas de los sueros, reservar y utilizar según el parámetro de la verificación que se realice.

Preparación de la tira con los testigos y las muestras

Preparación del antígeno

- Pipetear 100 µl de las muestras de valoración y testigos diluidos en sus respectivos pozos.
- Cubrir la placa e incubar durante 1 hora a 37°C ± 1°C.
- Lavar seis veces con el tampón de lavado diluido. Secar bien.

Adición de testigos, muestras; incubación y lavado

- Extraer el número necesario de tiras de la bolsa de aluminio e insertarlos en el soporte de tiras (placa).
- Diluir los testigos, el calibrador (triplicado) y las muestras, bajo alguno de los siguientes procedimientos:
 PROCEDIMIENTO 1: Añadir 1000 µL de diluyente de muestra a 10 µL de suero. Mezclar bien.
 PROCEDIMIENTO 2: Añadir 90 µL de diluyente de muestra a 10 µL de suero. Tomar 20 µL del suero diluido y agregar 180 µL de diluyente de muestra. Mezclar bien.

Preparar justo después de colocar la placa en la primera incubación, la dilución del antígeno debe ser de 1:250.
 Diluir 10 µL de antígeno en 2,5 mL de diluyente de antígeno, la solución adquiere un color rojo pálido. (Suficiente para 40 pocillos).
 Tomar el volumen necesario de antígeno diluido y mezclar con un volumen igual de trazador de MAb.
 Mezclar suavemente, dejar a temperatura ambiente (20-25°C) por una hora.

Adición del antígeno, incubación y lavado

- Pipetear 100 µl de la mezcla del antígeno diluido y el trazador en los pozos.
- Cubrir la placa e incubar durante 1 hora a 37°C ± 1°C.
- Lavar seis veces con el tampón de lavado diluido. Secar bien.

Desarrollo de color y lectura

Interpretación de resultados

- NOTA: El factor de calibración (FC) es específico de cada lote, se encuentra detallado en la hoja de especificaciones. Obtenga el valor de FC antes de comenzar los cálculos.
- (1) Calcular el **valor del punto de corte**: Obtener la absorbancia promedio de los triplicados del Calibrador y multiplicar por el factor de calibración.
- (2) Calcular el **valor índice**: dividiendo la absorbancia de la muestra entre el punto de corte.
- (3) Calcular **unidades Panbio** multiplicando el valor índice por 10.

Cálculos

- Pipetear 100 µL de TMB en cada pocillo.
- Incubar 10 min. a temperatura ambiente (20-25°C). Aparecerá un color azul.
- Transferir 100 µL de la Solución de Parada en los pozos (Mismo orden y tiempo que cuando se añadió TMB) Mezclar bien.
- El color azul cambia a amarillo. Antes de 30 minutos, leer la absorbancia de (a 450 nm con un filtro de referencia de 600-650 nm).

NOTA: Estos son los procedimientos a seguir para el diagnóstico de dengue. Para las verificaciones de los tres métodos, existen variaciones muy puntuales dependiendo de los parámetros a evaluar en cada uno de ellos. VER ANEXO 13.5.

| ÍNDICE | UNIDADES PANBIO | RESULTADO |
|-----------|-----------------|-----------|
| <1,8 | <18 | Negativo |
| 1,8 – 2,2 | 18-22 | Dudoso |
| >2,2 | >22 | Positivo |

13.4 Tablas de resultados

13.4.1 ELISA NS1

Proporcionalidad y precisión del sistema

Tabla 7. Registros de absorbancia de la combinación tira – dilución.

| Dilución 50% | Absorbancia | Dilución 100% | Absorbancia | Dilución 200% | Absorbancia |
|-------------------|--------------|-------------------|--------------|-------------------|--------------|
| CAL1 | 0.629 | CAL1 | 0.873 | CAL1 | 0.917 |
| CAL1 | 0.562 | CAL1 | 0.805 | CAL1 | 0.856 |
| CAL2 | 0.659 | CAL1 | 0.857 | CAL2 | 1.02 |
| CAL2 | 0.626 | CAL2 | 0.982 | CAL2 | 1.058 |
| Media | 0.619 | CAL2 | 0.944 | Media | 0.963 |
| Desviación | 0.041 | CAL2 | 0.918 | Desviación | 0.093 |
| CV | 6.594 | Media | 0.897 | CV | 9.640 |
| | | Desviación | 0.064 | | |
| | | CV | 7.145 | | |

Tabla 8. Tabla de contingencia (orden de concentración de dilución y orden de intensidad de respuesta).

| Orden de concentración de dilución | Orden de intensidad de respuesta |
|------------------------------------|----------------------------------|
| CAL1 50% | 0.629 |
| CAL1 50% | 0.562 |
| CAL2 50% | 0.659 |
| CAL2 50% | 0.626 |
| CAL1 100% | 0.873 |
| CAL1 100% | 0.805 |
| CAL1 100% | 0.857 |
| CAL2 100% | 0.982 |
| CAL2 100% | 0.944 |
| CAL2 100% | 0.918 |
| CAL1 200% | 0.917 |
| CAL1 200% | 0.856 |
| CAL2 200% | 1.020 |
| CAL2 200% | 1.058 |

Sensibilidad y especificidad

Tabla 10. Resultados de absorbancia de la combinación placa – réplica de testigos.

| Placa D1 | | Placa D2 | | Placa D3 | | Placa D4 | | Placa D5 | |
|----------|-------|----------|-------|----------|-------|----------|-------|----------|-------|
| Testigo | Abs. | Testigo | Abs. | Testigo | Abs. | Testigo | Abs. | Testigo | Abs. |
| P1 | 2.768 | P1 | 2.699 | P1 | 2.753 | P1 | 2.833 | P1 | 2.659 |
| N1 | 0.095 | N1 | 0.084 | N1 | 0.083 | N1 | 0.107 | N1 | 0.098 |
| CAL1-1 | 1.115 | CAL1-1 | 1.118 | CAL1-1 | 1.036 | CAL1-1 | 1.209 | CAL1-1 | 1.089 |
| CAL2-1 | 1.047 | CAL2-1 | 1.050 | CAL2-1 | 0.003 | CAL2-1 | 1.167 | CAL2-1 | 1.017 |
| CAL3-1 | 1.047 | CAL3-1 | 1.072 | CAL3-1 | 1.024 | CAL3-1 | 1.2 | CAL3-1 | 1.065 |
| P2 | 2.643 | P2 | 2.659 | P2 | 2.585 | P2 | 2.754 | P2 | 2.643 |
| N2 | 0.082 | N2 | 0.084 | N2 | 0.087 | N2 | 0.106 | N2 | 0.132 |
| CAL1-2 | 0.901 | CAL1-2 | 0.901 | CAL1-2 | 0.905 | CAL1-2 | 1.248 | CAL1-2 | 1.102 |
| CAL2-2 | 1.235 | CAL2-2 | 1.065 | CAL2-2 | 1.018 | CAL2-2 | 1.223 | CAL2-2 | 1.126 |
| CAL3-2 | 1.045 | CAL3-2 | 0.914 | CAL3-2 | 0.882 | CAL3-2 | 1.13 | CAL3-2 | 1.026 |
| P3 | 2.672 | P3 | 2.692 | P3 | 2.669 | P3 | 2.813 | P3 | 2.706 |
| N3 | 0.094 | N3 | 0.117 | N3 | 0.133 | N3 | 0.127 | N3 | 0.137 |
| CAL1-3 | 0.972 | CAL1-3 | 1.054 | CAL1-3 | 0.971 | CAL1-3 | 1.117 | CAL1-3 | 1.104 |
| CAL2-3 | 0.905 | CAL2-3 | 1.040 | CAL2-3 | 0.963 | CAL2-3 | 1.22 | CAL2-3 | 1.014 |
| CAL3-3 | 0.932 | CAL3-3 | 0.940 | CAL3-3 | 0.833 | CAL3-3 | 1.124 | CAL3-3 | 1.059 |

Tabla 11. Unidades PANBIO para cada combinación placas – réplica de testigos.

| Placa D1 | | | Placa D2 | | | Placa D3 | | |
|----------|-----------------|-----------|----------|-----------------|-----------|----------|-----------------|-----------|
| Testigo | Unidades Panbio | Resultado | Testigo | Unidades Panbio | Resultado | Testigo | Unidades Panbio | Resultado |
| P1 | 39.26 | Positivo | P1 | 37.9 | Positivo | P1 | 60.77 | Positivo |
| N1 | 1.34 | Negativo | N1 | 1.179 | Negativo | N1 | 1.83 | Negativo |
| P2 | 37.81 | Positivo | P2 | 42 | Positivo | P2 | 41.89 | Positivo |
| N2 | 1.17 | Negativo | N2 | 1.32 | Negativo | N2 | 1.41 | Negativo |
| P3 | 43 | Positivo | P3 | 40.35 | Positivo | P3 | 43.89 | Positivo |
| N3 | 1.5 | Negativo | N3 | 1.75 | Negativo | N3 | 2.187 | Negativo |
| Placa D4 | | | | | | Placa D5 | | |
| Testigo | Unidades Panbio | Resultado | | | | Testigo | Unidades Panbio | Resultado |
| P1 | 36.043 | Positivo | | | | P1 | 38.04 | Positivo |
| N1 | 1.361 | Negativo | | | | N1 | 1.402 | Negativo |
| P2 | 34.772 | Positivo | | | | P2 | 36.942 | Positivo |
| N2 | 1.338 | Negativo | | | | N2 | 1.846 | Negativo |
| P3 | 37.013 | Positivo | | | | P3 | 38.767 | Positivo |
| N3 | 1.671 | Negativo | | | | N3 | 1.962 | Negativo |

Tabla 12. Tabla de contingencia con dos criterios de clasificación para los testigos.

| Placa | Réplica | Testigos | Clasificación verdadera de la muestra | Clasificación de la muestra por el método analítico |
|----------|-----------|----------|---------------------------------------|---|
| Placa D1 | Réplica 1 | TP | Positivo | Positiva |
| | | TN | Negativo | Negativa |
| | Réplica 2 | TP | Positivo | Positiva |
| | | TN | Negativo | Negativa |
| | Réplica 3 | TP | Positivo | Positiva |
| | | TN | Negativo | Negativa |
| Placa D2 | Réplica 1 | TP | Positivo | Positiva |
| | | TN | Negativo | Negativa |
| | Réplica 2 | TP | Positivo | Positiva |
| | | TN | Negativo | Negativa |
| | Réplica 3 | TP | Positivo | Positiva |
| | | TN | Negativo | Negativa |
| Placa D3 | Réplica 1 | TP | Positivo | Positiva |
| | | TN | Negativo | Negativa |
| | Réplica 2 | TP | Positivo | Positiva |
| | | TN | Negativo | Negativa |
| | Réplica 3 | TP | Positivo | Positiva |
| | | TN | Negativo | Negativa |
| Placa D4 | Réplica 1 | TP | Positivo | Positiva |
| | | TN | Negativo | Negativa |
| | Réplica 2 | TP | Positivo | Positiva |
| | | TN | Negativo | Negativa |
| | Réplica 3 | TP | Positivo | Positiva |
| | | TN | Negativo | Negativa |
| Placa D5 | Réplica 1 | TP | Positivo | Positiva |
| | | TN | Negativo | Negativa |
| | Réplica 2 | TP | Positivo | Positiva |
| | | TN | Negativo | Negativa |
| | Réplica 3 | TP | Positivo | Positiva |
| | | TN | Negativo | Negativa |

Selectividad

Tabla 14. Registro de absorbancia de cada placa.

| <i>Placa D1</i> | | <i>Placa D2</i> | |
|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| <i>Test/Mtas</i> | <i>Absorbancia</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Absorbancia</i> |
| P1 | 2.5330 | P1 | 2.2530 |
| N1 | 0.0600 | N1 | 0.0510 |
| CAL1 | 0.7860 | CAL1 | 0.8200 |
| CAL2 | 0.7710 | CAL2 | 0.8010 |
| CAL3 | 0.7700 | CAL3 | 0.8110 |
| SN1 | 0.0440 | SN1 | 0.0400 |
| SN2 | 0.0430 | SN2 | 0.0430 |
| SN3 | 0.0480 | SN3 | 0.0430 |
| IA1 | 0.0480 | IA1 | 0.0480 |
| IA2 | 0.0430 | IA2 | 0.0420 |
| IA3 | 0.0580 | IA3 | 0.0480 |
| Sa1 | 0.1410 | Sa1 | 0.1030 |
| Sa1 | 0.1450 | Sa1 | 0.1170 |
| Sa1 | 0.1510 | Sa1 | 0.1080 |
| RU1 | 0.0850 | RU1 | 0.0530 |
| RU2 | 0.0890 | RU2 | 0.0710 |
| RU3 | 0.0770 | RU3 | 0.0640 |
| Media | 0.7757 | Media | 0.8107 |
| Desviación | 0.0090 | Desviación | 0.0095 |
| CV | 1.1555 | CV | 1.1724 |
| | | | |
| VC | 0.512 | VC | 0.5350 |

Tablas 15. Cálculo de las unidades Panbio a partir de las absorbancias de cada placa.

| <i>Placa D1</i> | | | <i>Placa D2</i> | | |
|------------------|------------------------|------------------|------------------|------------------------|------------------|
| <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> |
| P1 | 49.478 | Positivo | P1 | 42.109 | Positivo |
| N1 | 1.172 | Negativo | N1 | 0.953 | Negativo |
| SN1 | 0.859 | Negativo | SN1 | 0.748 | Negativo |
| SN2 | 0.840 | Negativo | SN2 | 0.804 | Negativo |
| SN3 | 0.938 | Negativo | SN3 | 0.804 | Negativo |
| IA1 | 0.938 | Negativo | IA1 | 0.897 | Negativo |
| IA2 | 0.840 | Negativo | IA2 | 0.785 | Negativo |
| IA3 | 1.133 | Negativo | IA3 | 0.897 | Negativo |
| Sa1 | 2.754 | Negativo | Sa1 | 1.925 | Negativo |
| Sa1 | 2.832 | Negativo | Sa1 | 2.187 | Negativo |
| Sa1 | 2.950 | Negativo | Sa1 | 2.019 | Negativo |
| RU1 | 1.660 | Negativo | RU1 | 0.991 | Negativo |
| RU2 | 1.738 | Negativo | RU2 | 1.327 | Negativo |
| RU3 | 1.504 | Negativo | RU3 | 1.196 | Negativo |

Precisión intermedia del método

Tabla 16. Registro de absorbancias para las placas de combinación analista-día.

| Placa A1D1 | | Placa A1D2 | | Placa A2D1 | | Placa A2D2 | |
|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| <i>Test/Mtas</i> | <i>Absorbancia</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Absorbancia</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Absorbancia</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Absorbancia</i> |
| P1 | 2.4750 | P1 | 2.5010 | P1 | 2.5010 | P1 | 2.2520 |
| N1 | 0.0970 | N1 | 0.0830 | N1 | 0.0830 | N1 | 0.0650 |
| CAL1 | 0.9370 | CAL1 | 1.0210 | CAL1 | 1.0210 | CAL1 | 0.8300 |
| CAL2 | 0.8160 | CAL2 | 0.9930 | CAL2 | 0.9930 | CAL2 | 0.8530 |
| CAL3 | 0.8230 | CAL3 | 1.0100 | CAL3 | 1.0100 | CAL3 | 0.7460 |
| SPB1 | 2.9240 | SPB1 | 2.7220 | SPB1 | 2.7220 | SPB1 | 2.4330 |
| SPB2 | 2.9320 | SPB2 | 2.6980 | SPB2 | 2.6980 | SPB2 | 2.4380 |
| SPB3 | 2.9330 | SPB3 | 2.7370 | SPB3 | 2.7370 | SPB3 | 2.5020 |
| SPA1 | 2.4260 | SPA1 | 2.9240 | SPA1 | 2.9240 | SPA1 | 2.9200 |
| SPA2 | 2.4040 | SPA2 | 2.9240 | SPA2 | 2.9240 | SPA2 | 2.8940 |
| SPA3 | 1.8810 | SPA3 | 2.9300 | SPA3 | 2.9300 | SPA3 | 2.9010 |
| SN1 | 0.0590 | SN1 | 0.0500 | SN1 | 0.0500 | SN1 | 0.0340 |
| SN2 | 0.0530 | SN2 | 0.0520 | SN2 | 0.0520 | SN2 | 0.0370 |
| SN3 | 0.0560 | SN3 | 0.0710 | SN3 | 0.0710 | SN3 | 0.0410 |
| Media | 0.8587 | Media | 1.0080 | Media | 1.0080 | Media | 0.8097 |
| Desviación | 0.0679 | Desviación | 0.0141 | Desviación | 0.0141 | Desviación | 0.0563 |
| CV | 7.9110 | CV | 1.3995 | CV | 1.3995 | CV | 6.9564 |
| | | | | | | | |
| VC | 0.5667 | VC | 0.6653 | VC | 0.6653 | VC | 0.5344 |

Tabla 17. Unidades Panbio calculadas a partir de los registros de absorbancias.

| Placa A1D1 | | | Placa A1D2 | | |
|-------------------|------------------------|------------------|-------------------|------------------------|------------------|
| <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> |
| P1 | 43.672 | Positivo | P1 | 44.986 | Positivo |
| N1 | 1.712 | Negativo | N1 | 1.360 | Negativo |
| SPB1 | 51.595 | Positivo | SPB1 | 65.802 | Positivo |
| SPB2 | 51.736 | Positivo | SPB2 | 67.045 | Positivo |
| SPB3 | 51.754 | Positivo | SPB3 | 66.224 | Positivo |
| SPA1 | 42.808 | Positivo | SPA1 | 50.495 | Positivo |
| SPA2 | 42.420 | Positivo | SPA2 | 47.846 | Positivo |
| SPA3 | 33.191 | Positivo | SPA3 | 48.479 | Positivo |
| SN1 | 1.041 | Negativo | SN1 | 0.891 | Negativo |
| SN2 | 0.935 | Negativo | SN2 | 0.797 | Negativo |
| SN3 | 0.988 | Negativo | SN3 | 0.938 | Negativo |
| | | | | | |
| Placa A2D1 | | | Placa A2D2 | | |
| <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> |
| P1 | 37.593 | Positivo | P1 | 1.216 | Positivo |
| N1 | 1.248 | Negativo | N1 | 42.142 | Negativo |
| SPB1 | 40.915 | Positivo | SPB1 | 45.529 | Positivo |
| SPB2 | 40.554 | Positivo | SPB2 | 45.623 | Positivo |
| SPB3 | 41.141 | Positivo | SPB3 | 46.821 | Positivo |
| SPA1 | 43.951 | Positivo | SPA1 | 54.643 | Positivo |
| SPA2 | 43.951 | Positivo | SPA2 | 54.156 | Positivo |
| SPA3 | 44.042 | Positivo | SPA3 | 54.287 | Positivo |
| SN1 | 0.752 | Negativo | SN1 | 0.636 | Negativo |
| SN2 | 0.782 | Negativo | SN2 | 0.692 | Negativo |
| SN3 | 1.067 | Negativo | SN3 | 0.767 | Negativo |

Estabilidad analítica de la muestra

Tabla 18. Registro de absorbancias (TBB, TBA, TAB, TAA).

| Placa TBB | | Placa TBA | | Placa TAB | | Placa TAA | |
|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| <i>Test/Mtas</i> | <i>Absorbancia</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Absorbancia</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Absorbancia</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Absorbancia</i> |
| P1 | 1.58 | P1 | 1.094 | P1 | 2.077 | P1 | 2.145 |
| N1 | 0.056 | N1 | 0.038 | N1 | 0.077 | N1 | 0.065 |
| CAL1 | 0.526 | CAL1 | 0.352 | CAL1 | 0.739 | CAL1 | 0.713 |
| CAL2 | 0.547 | CAL2 | 0.354 | CAL2 | 0.714 | CAL2 | 0.704 |
| CAL3 | 0.539 | CAL3 | 0.343 | CAL3 | 0.715 | CAL3 | 0.705 |
| SPB1 | 1.742 | SPB1 | 1.345 | SPB1 | 2.337 | SPB1 | 2.351 |
| SPB2 | 1.8 | SPB2 | 1.24 | SPB2 | 2.182 | SPB2 | 2.291 |
| SPB3 | 1.903 | SPB3 | 1.336 | SPB3 | 2.35 | SPB3 | 2.268 |
| SPA1 | 2.693 | SPA1 | 2.331 | SPA1 | 2.895 | SPA1 | 2.89 |
| SPA2 | 2.721 | SPA2 | 2.302 | SPA2 | 2.889 | SPA2 | 2.947 |
| SPA3 | 2.7 | SPA3 | 2.155 | SPA3 | 2.877 | SPA3 | 2.906 |
| SN1 | 0.043 | SN1 | 0.031 | SN1 | 0.045 | SN1 | 0.042 |
| SN2 | 0.043 | SN2 | 0.032 | SN2 | 0.04 | SN2 | 0.042 |
| SN3 | 0.042 | SN3 | 0.031 | SN3 | 0.048 | SN3 | 0.043 |
| Media | 0.537 | Media | 0.350 | Media | 0.723 | Media | 0.707 |
| Desviación | 0.011 | Desviación | 0.006 | Desviación | 0.014 | Desviación | 0.005 |
| CV | 1.972 | CV | 1.676 | CV | 1.959 | CV | 0.697 |
| VC | 0.355 | VC | 0.231 | VC | 0.477 | VC | 0.467 |

Tabla 19. Unidades Panbio calculadas a partir de los registros de absorbancias.

| Placa TBB | | | Placa TBA | | |
|------------------|------------------------|------------------|------------------|------------------------|------------------|
| <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> |
| P1 | 44.552 | Positivo | P1 | 47.404 | Positivo |
| N1 | 1.579 | Negativo | N1 | 1.647 | Negativo |
| SPB1 | 49.120 | Positivo | SPB1 | 58.281 | Positivo |
| SPB2 | 50.756 | Positivo | SPB2 | 53.731 | Positivo |
| SPB3 | 53.660 | Positivo | SPB3 | 57.891 | Positivo |
| SPA1 | 75.936 | Positivo | SPA1 | 101.005 | Positivo |
| SPA2 | 76.726 | Positivo | SPA2 | 99.749 | Positivo |
| SPA3 | 76.134 | Positivo | SPA3 | 93.379 | Positivo |
| SN1 | 1.212 | Negativo | SN1 | 1.343 | Negativo |
| SN2 | 1.212 | Negativo | SN2 | 1.387 | Negativo |
| SN3 | 1.184 | Negativo | SN3 | 1.343 | Negativo |
| Placa TAB | | | Placa TAA | | |
| <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> |
| P1 | 43.547 | Positivo | P1 | 45.947 | Positivo |
| N1 | 1.614 | Negativo | N1 | 1.392 | Negativo |
| SPB1 | 48.998 | Positivo | SPB1 | 50.360 | Positivo |
| SPB2 | 45.748 | Positivo | SPB2 | 49.075 | Positivo |
| SPB3 | 49.270 | Positivo | SPB3 | 48.582 | Positivo |
| SPA1 | 60.697 | Positivo | SPA1 | 61.906 | Positivo |
| SPA2 | 60.571 | Positivo | SPA2 | 63.127 | Positivo |
| SPA3 | 60.320 | Positivo | SPA3 | 62.248 | Positivo |
| SN1 | 0.943 | Negativo | SN1 | 0.900 | Negativo |
| SN2 | 0.839 | Negativo | SN2 | 0.900 | Negativo |
| SN3 | 1.006 | Negativo | SN3 | 0.921 | Negativo |

Estabilidad de la muestra

Tabla 20. Registro de absorbancias (CE0, CE1, CE2, CE3, CE4).

| Placa CE0 | | Placa CE1 | | Placa CE2 | | Placa CE3 | | Placa CE4 | |
|-------------------|--------------|-------------------|--------------|-------------------|--------------|-------------------|--------------|-------------------|--------------|
| <i>Test/Mtas</i> | <i>Abs.</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Abs</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Abs</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Abs</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Abs</i> |
| P1 | 1.784 | P1 | 2.153 | P1 | 2.173 | P1 | 2.015 | P1 | 2.039 |
| N1 | 0.039 | N1 | 0.043 | N1 | 0.054 | N1 | 0.047 | N1 | 0.044 |
| CAL1 | 0.558 | CAL1 | 0.700 | CAL1 | 0.712 | CAL1 | 0.685 | CAL1 | 0.696 |
| CAL2 | 0.586 | CAL2 | 0.712 | CAL2 | 0.706 | CAL2 | 0.662 | CAL2 | 0.671 |
| CAL3 | 0.637 | CAL3 | 0.707 | CAL3 | 0.733 | CAL3 | 0.607 | CAL3 | 0.679 |
| SPB1 | 2.202 | SPB1 | 2.100 | SPB1 | 2.47 | SPB1 | 2.164 | SPB1 | 2.305 |
| SPB2 | 2.262 | SPB2 | 2.266 | SPB2 | 2.561 | SPB2 | 2.296 | SPB2 | 2.221 |
| SPB3 | 2.309 | SPB3 | 2.23 | SPB3 | 2.302 | SPB3 | 2.346 | SPB3 | 2.192 |
| SPA1 | 2.861 | SPA1 | 2.88 | SPA1 | 2.898 | SPA1 | 2.909 | SPA1 | 2.900 |
| SPA2 | 2.833 | SPA2 | 2.883 | SPA2 | 2.88 | SPA2 | 2.863 | SPA2 | 2.876 |
| SPA3 | 2.879 | SPA3 | 2.863 | SPA3 | 2.885 | SPA3 | 2.894 | SPA3 | 2.867 |
| SN1 | 0.034 | SN1 | 0.029 | SN1 | 0.031 | SN1 | 0.027 | SN1 | 0.03 |
| SN2 | 0.038 | SN2 | 0.028 | SN2 | 0.031 | SN2 | 0.029 | SN2 | 0.033 |
| SN3 | 0.038 | SN3 | 0.031 | SN3 | 0.034 | SN3 | 0.032 | SN3 | 0.032 |
| Media | 0.594 | Media | 0.706 | Media | 0.717 | Media | 0.651 | Media | 0.682 |
| Desviación | 0.040 | Desviación | 0.006 | Desviación | 0.014 | Desviación | 0.040 | Desviación | 0.013 |
| CV | 6.747 | CV | 0.853 | CV | 1.977 | CV | 6.153 | CV | 1.872 |
| | | | | | | | | | |
| VC | 0.392 | VC | 0.466 | VC | 0.473 | VC | 0.430 | VC | 0.450 |

Tabla 21. Unidades Panbio calculadas a partir de los registros de absorbancias.

| Placa CEo | | | Placa CE1 | | | Placa CE2 | | |
|------------------|------------------------|------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------|------------------------|------------------|
| <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> |
| P1 | 45.531 | Positivo | P1 | 46.184 | Positivo | P1 | 45.919 | Positivo |
| N1 | 0.995 | Negativo | N1 | 0.922 | Negativo | N1 | 1.141 | Negativo |
| SPB1 | 56.199 | Positivo | SPB1 | 45.047 | Positivo | SPB1 | 52.196 | Positivo |
| SPB2 | 57.731 | Positivo | SPB2 | 48.608 | Positivo | SPB2 | 54.119 | Positivo |
| SPB3 | 58.930 | Positivo | SPB3 | 47.836 | Positivo | SPB3 | 48.645 | Positivo |
| SPA1 | 73.018 | Positivo | SPA1 | 61.779 | Positivo | SPA1 | 61.240 | Positivo |
| SPA2 | 72.304 | Positivo | SPA2 | 61.843 | Positivo | SPA2 | 60.860 | Positivo |
| SPA3 | 73.478 | Positivo | SPA3 | 61.414 | Positivo | SPA3 | 60.965 | Positivo |
| SN1 | 0.868 | Negativo | SN1 | 0.622 | Negativo | SN1 | 0.655 | Negativo |
| SN2 | 0.970 | Negativo | SN2 | 0.601 | Negativo | SN2 | 0.655 | Negativo |
| SN3 | 0.970 | Negativo | SN3 | 0.665 | Negativo | SN3 | 0.718 | Negativo |
| | | | | | | | | |
| Placa CE3 | | | | | | Placa CE4 | | |
| <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> | | | | <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> |
| P1 | 46.874 | Positivo | | | | P1 | 45.299 | Positivo |
| N1 | 1.093 | Negativo | | | | N1 | 0.978 | Negativo |
| SPB1 | 50.340 | Positivo | | | | SPB1 | 51.209 | Positivo |
| SPB2 | 53.410 | Positivo | | | | SPB2 | 49.342 | Positivo |
| SPB3 | 54.573 | Positivo | | | | SPB3 | 48.698 | Positivo |
| SPA1 | 67.670 | Positivo | | | | SPA1 | 64.427 | Positivo |
| SPA2 | 66.600 | Positivo | | | | SPA2 | 63.894 | Positivo |
| SPA3 | 67.321 | Positivo | | | | SPA3 | 63.694 | Positivo |
| SN1 | 0.628 | Negativo | | | | SN1 | 0.666 | Negativo |
| SN2 | 0.675 | Negativo | | | | SN2 | 0.733 | Negativo |
| SN3 | 0.744 | Negativo | | | | SN3 | 0.711 | Negativo |

Tolerancia

Tabla 23. Registros de absorbancia de cada placa de cada tratamiento.

| Placa T1 | | Placa T2 | | Placa T3 | |
|-------------------|--------------|-------------------|--------------|-------------------|--------------|
| Test/Mtas | Absorbancia | Test/Mtas | Absorbancia | Test/Mtas | Absorbancia |
| P1 | 2.159 | P1 | 1.985 | P1 | 2.071 |
| N1 | 0.042 | N1 | 0.044 | N1 | 0.04 |
| CAL1 | 0.726 | CAL1 | 0.6 | CAL1 | 0.621 |
| CAL2 | 0.661 | CAL2 | 0.563 | CAL2 | 0.589 |
| CAL3 | 0.636 | CAL3 | 0.612 | CAL3 | 0.643 |
| SPB1 | 2.322 | SPB1 | 2.216 | SPB1 | 2.431 |
| SPB2 | 2.123 | SPB2 | 2.108 | SPB2 | 2.347 |
| SPB3 | 2.478 | SPB3 | 2.274 | SPB3 | 2.106 |
| SPA1 | 2.84 | SPA1 | 2.886 | SPA1 | 2.847 |
| SPA2 | 2.868 | SPA2 | 2.801 | SPA2 | 2.932 |
| SPA3 | 2.877 | SPA3 | 2.858 | SPA3 | 2.867 |
| SN1 | 0.03 | SN1 | 0.028 | SN1 | 0.029 |
| SN2 | 0.031 | SN2 | 0.028 | SN2 | 0.033 |
| SN3 | 0.031 | SN3 | 0.029 | SN3 | 0.032 |
| Media | 0.674 | Media | 0.592 | Media | 0.618 |
| Desviación | 0.046 | Desviación | 0.026 | Desviación | 0.027 |
| CV | 6.889 | CV | 4.317 | CV | 4.396 |
| VC | 0.445 | VC | 0.391 | VC | 0.408 |

Tabla 24. Registro de las Unidades Panbio por tratamiento.

| Placa T1 | | | Placa T2 | | | Placa T3 | | |
|-----------|-----------------|-----------|-----------|-----------------|-----------|-----------|-----------------|-----------|
| Test/Mtas | Unidades Panbio | Resultado | Test/Mtas | Unidades Panbio | Resultado | Test/Mtas | Unidades Panbio | Resultado |
| P1 | 48.510 | Positivo | P1 | 50.832 | Positivo | P1 | 50.802 | Positivo |
| N1 | 0.944 | Negativo | N1 | 1.127 | Negativo | N1 | 0.981 | Negativo |
| SPB1 | 52.173 | Positivo | SPB1 | 56.748 | Positivo | SPB1 | 59.633 | Positivo |
| SPB2 | 47.701 | Positivo | SPB2 | 53.982 | Positivo | SPB2 | 57.572 | Positivo |
| SPB3 | 55.678 | Positivo | SPB3 | 58.233 | Positivo | SPB3 | 51.661 | Positivo |
| SPA1 | 63.812 | Positivo | SPA1 | 73.905 | Positivo | SPA1 | 69.838 | Positivo |
| SPA2 | 64.441 | Positivo | SPA2 | 71.729 | Positivo | SPA2 | 71.923 | Positivo |
| SPA3 | 64.643 | Positivo | SPA3 | 73.188 | Positivo | SPA3 | 70.328 | Positivo |
| SN1 | 0.674 | Negativo | SN1 | 0.717 | Negativo | SN1 | 0.711 | Negativo |
| SN2 | 0.697 | Negativo | SN2 | 0.717 | Negativo | SN2 | 0.809 | Negativo |
| SN3 | 0.697 | Negativo | SN3 | 0.743 | Negativo | SN3 | 0.785 | Negativo |

Robustez

Tabla 27. Registro de absorancias.

| Placa 1 | | Placa 2 | | Placa 3 | | Placa 4 | | Placa 5 | | Placa 6 | | Placa 7 | | Placa 8 | |
|------------|--------|------------|-------|------------|--------|------------|-------|------------|-------|------------|-------|------------|-------|------------|-------|
| Test/Mtas | Abs | Test/Mtas | Abs | Test/Mtas | Abs | Test/Mtas | Abs | Test/Mtas | Abs | Test/Mtas | Abs | Test/Mtas | Abs | Test/Mtas | Abs |
| P1 | 1.403 | P1 | 2.402 | P1 | 1.449 | P1 | 2.438 | P1 | 2.498 | P1 | 2.645 | P1 | 2.203 | P1 | 1.723 |
| N1 | 0.080 | N1 | 0.09 | N1 | 0.16 | N1 | 0.112 | N1 | 0.085 | N1 | 0.132 | N1 | 0.058 | N1 | 0.065 |
| CAL1 | 0.282 | CAL1 | 0.901 | CAL1 | 0.587 | CAL1 | 0.810 | CAL1 | 1.154 | CAL1 | 1.146 | CAL1 | 0.861 | CAL1 | 0.563 |
| CAL2 | 0.377 | CAL2 | 0.933 | CAL2 | 0.494 | CAL2 | 0.785 | CAL2 | 1.112 | CAL2 | 1.123 | CAL2 | 0.864 | CAL2 | 0.534 |
| CAL3 | 0.373 | CAL3 | 0.970 | CAL3 | 0.491 | CAL3 | 0.737 | CAL3 | 1.123 | CAL3 | 1.100 | CAL3 | 0.888 | CAL3 | 0.544 |
| SPB1 | 1.748 | SPB1 | 2.637 | SPB1 | 1.833 | SPB1 | 2.745 | SPB1 | 2.769 | SPB1 | 2.778 | SPB1 | 2.596 | SPB1 | 2.133 |
| SPB2 | 2.523 | SPB2 | 2.57 | SPB2 | 2.036 | SPB2 | 2.709 | SPB2 | 2.734 | SPB2 | 2.775 | SPB2 | 2.718 | SPB2 | 2.107 |
| SPB3 | 1.463 | SPB3 | 2.643 | SPB3 | 2.192 | SPB3 | 2.66 | SPB3 | 2.818 | SPB3 | 2.814 | SPB3 | 2.675 | SPB3 | 2.216 |
| SPA1 | 2.840 | SPA1 | 2.901 | SPA1 | 2.88 | SPA1 | 2.922 | SPA1 | 2.921 | SPA1 | 2.926 | SPA1 | 2.9 | SPA1 | 2.827 |
| SPA2 | 2.867 | SPA2 | 2.898 | SPA2 | 2.846 | SPA2 | 2.923 | SPA2 | 2.914 | SPA2 | 2.922 | SPA2 | 2.905 | SPA2 | 2.833 |
| SPA3 | 2.819 | SPA3 | 2.896 | SPA3 | 2.806 | SPA3 | 2.909 | SPA3 | 2.909 | SPA3 | 2.946 | SPA3 | 2.912 | SPA3 | 2.868 |
| SN1 | 0.048 | SN1 | 0.048 | SN1 | 0.071 | SN1 | 0.088 | SN1 | 0.044 | SN1 | 0.081 | SN1 | 0.039 | SN1 | 0.034 |
| SN2 | 0.054 | SN2 | 0.05 | SN2 | 0.04 | SN2 | 0.086 | SN2 | 0.048 | SN2 | 0.085 | SN2 | 0.046 | SN2 | 0.035 |
| SN3 | 0.060 | SN3 | 0.053 | SN3 | 0.037 | SN3 | 0.126 | SN3 | 0.055 | SN3 | 0.105 | SN3 | 0.059 | SN3 | 0.041 |
| Media | 0.344 | Media | 0.935 | Media | 0.524 | Media | 0.777 | Media | 1.130 | Media | 1.123 | Media | 0.871 | Media | 0.547 |
| Desviación | 0.054 | Desviación | 0.035 | Desviación | 0.055 | Desviación | 0.037 | Desviación | 0.022 | Desviación | 0.023 | Desviación | 0.015 | Desviación | 0.015 |
| CV | 15.619 | CV | 3.694 | CV | 10.416 | CV | 4.773 | CV | 1.928 | CV | 2.048 | CV | 1.699 | CV | 2.693 |
| VC | 0.227 | VC | 0.617 | VC | 0.346 | VC | 0.513 | VC | 0.746 | VC | 0.741 | VC | 0.575 | VC | 0.361 |

Tabla 28. Registro de unidades Panbio de las absorbancias obtenidas.

| Placa 1 | | | Placa 2 | | | Placa 3 | | | Placa 4 | | |
|------------------|------------------------|------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------|------------------------|------------------|
| <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> |
| P1 | 61.795 | Positivo | P1 | 38.938 | Positivo | P1 | 41.898 | Positivo | P1 | 47.521 | Positivo |
| N1 | 3.524 | Negativo | N1 | 1.459 | Negativo | N1 | 4.626 | Negativo | N1 | 2.183 | Negativo |
| SPB1 | 76.991 | Positivo | SPB1 | 42.747 | Positivo | SPB1 | 53.001 | Positivo | SPB1 | 53.505 | Positivo |
| SPB2 | 111.126 | Positivo | SPB2 | 41.661 | Positivo | SPB2 | 58.871 | Positivo | SPB2 | 52.803 | Positivo |
| SPB3 | 64.438 | Positivo | SPB3 | 42.845 | Positivo | SPB3 | 63.382 | Positivo | SPB3 | 51.848 | Positivo |
| SPA1 | 125.088 | Positivo | SPA1 | 47.027 | Positivo | SPA1 | 83.276 | Positivo | SPA1 | 56.955 | Positivo |
| SPA2 | 126.277 | Positivo | SPA2 | 46.978 | Positivo | SPA2 | 82.292 | Positivo | SPA2 | 56.974 | Positivo |
| SPA3 | 124.163 | Positivo | SPA3 | 46.946 | Positivo | SPA3 | 81.136 | Positivo | SPA3 | 56.701 | Positivo |
| SN1 | 2.114 | Negativo | SN1 | 0.778 | Negativo | SN1 | 2.053 | Negativo | SN1 | 1.715 | Negativo |
| SN2 | 2.378 | Negativo | SN2 | 0.811 | Negativo | SN2 | 1.157 | Negativo | SN2 | 1.676 | Negativo |
| SN3 | 2.643 | Negativo | SN3 | 0.859 | Negativo | SN3 | 1.070 | Negativo | SN3 | 2.456 | Negativo |
| Placa 5 | | | Placa 6 | | | Placa 7 | | | Placa 8 | | |
| <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> |
| P1 | 33.504 | Positivo | P1 | 35.686 | Positivo | P1 | 38.322 | Positivo | P1 | 47.726 | Positivo |
| N1 | 1.140 | Negativo | N1 | 1.781 | Negativo | N1 | 1.009 | Negativo | N1 | 1.800 | Negativo |
| SPB1 | 37.139 | Positivo | SPB1 | 37.481 | Positivo | SPB1 | 45.159 | Positivo | SPB1 | 59.083 | Positivo |
| SPB2 | 36.669 | Positivo | SPB2 | 37.440 | Positivo | SPB2 | 47.281 | Positivo | SPB2 | 58.362 | Positivo |
| SPB3 | 37.796 | Positivo | SPB3 | 37.966 | Positivo | SPB3 | 46.533 | Positivo | SPB3 | 61.382 | Positivo |
| SPA1 | 39.178 | Positivo | SPA1 | 39.478 | Positivo | SPA1 | 50.447 | Positivo | SPA1 | 78.306 | Positivo |
| SPA2 | 39.084 | Positivo | SPA2 | 39.424 | Positivo | SPA2 | 50.534 | Positivo | SPA2 | 78.472 | Positivo |
| SPA3 | 39.017 | Positivo | SPA3 | 39.747 | Positivo | SPA3 | 50.656 | Positivo | SPA3 | 79.442 | Positivo |
| SN1 | 0.590 | Negativo | SN1 | 1.093 | Negativo | SN1 | 0.678 | Negativo | SN1 | 0.942 | Negativo |
| SN2 | 0.644 | Negativo | SN2 | 1.147 | Negativo | SN2 | 0.800 | Negativo | SN2 | 0.969 | Negativo |
| SN3 | 0.738 | Negativo | SN3 | 1.417 | Negativo | SN3 | 1.026 | Negativo | SN3 | 1.136 | Negativo |

13.4.2 ELISA IgM

Proporcionalidad y precisión del sistema

Tabla 29. Registros de absorbancia de la combinación tira – dilución.

| Dilución 50% | Absorbancia | Dilución 100% | Absorbancia | Dilución 200% | Absorbancia |
|-------------------|---------------|-------------------|--------------|-------------------|--------------|
| CAL1 | 0.541 | CAL1 | 0.643 | CAL1 | 0.941 |
| CAL1 | 0.392 | CAL1 | 0.586 | CAL1 | 0.979 |
| CAL2 | 0.516 | CAL1 | 0.647 | CAL2 | 1.013 |
| CAL2 | 0.412 | CAL2 | 0.708 | CAL2 | 1.016 |
| Media | 0.465 | CAL2 | 0.666 | Media | 0.987 |
| Desviación | 0.074 | CAL2 | 0.687 | Desviación | 0.035 |
| CV | 15.947 | Media | 0.656 | CV | 3.556 |
| | | Desviación | 0.042 | | |
| | | CV | 6.435 | | |

Tabla 30. Contingencia (orden de concentración de dilución y orden de intensidad de respuesta).

| Orden de concentración de dilución | Orden de intensidad de respuesta |
|------------------------------------|----------------------------------|
| CAL1 50% | 0.541 |
| CAL1 50% | 0.392 |
| CAL2 50% | 0.516 |
| CAL2 50% | 0.412 |
| CAL1 100% | 0.643 |
| CAL1 100% | 0.586 |
| CAL1 100% | 0.647 |
| CAL2 100% | 0.708 |
| CAL2 100% | 0.666 |
| CAL2 100% | 0.687 |
| CAL1 200% | 0.941 |
| CAL1 200% | 0.979 |
| CAL2 200% | 1.013 |
| CAL2 200% | 1.016 |

Sensibilidad y especificidad

Tabla 32. Resultados de absorbancia de la combinación placa – réplica de testigos.

| Placa D1 | | Placa D2 | | Placa D3 | | Placa D4 | | Placa D5 | |
|----------|-------|----------|-------|----------|-------|----------|-------|----------|-------|
| Testigos | Abs | Testigos | Abs | Testigos | Abs | Testigos | Abs | Testigos | Abs |
| P1 | 0.925 | P1 | 1.712 | P1 | 1.407 | P1 | 1.277 | P1 | 1.223 |
| N1 | 0.051 | N1 | 0.114 | N1 | 0.109 | N1 | 0.073 | N1 | 0.060 |
| CAL1-1 | 0.447 | CAL1-1 | 0.711 | CAL1-1 | 0.573 | CAL1-1 | 0.579 | CAL1-1 | 0.567 |
| CAL2-1 | 0.424 | CAL2-1 | 0.735 | CAL2-1 | 0.523 | CAL2-1 | 0.557 | CAL2-1 | 0.564 |
| CAL3-1 | 0.448 | CAL3-1 | 0.701 | CAL3-1 | 0.603 | CAL3-1 | 0.576 | CAL3-1 | 0.584 |
| P2 | 1.896 | P2 | 1.393 | P2 | 1.124 | P2 | 1.128 | P2 | 1.224 |
| N2 | 0.055 | N2 | 0.084 | N2 | 0.079 | N2 | 0.084 | N2 | 0.067 |
| CAL1-2 | 0.472 | CAL1-2 | 0.778 | CAL1-2 | 0.622 | CAL1-2 | 0.632 | CAL1-2 | 0.617 |
| CAL2-2 | 0.534 | CAL2-2 | 0.876 | CAL2-2 | 0.649 | CAL2-2 | 0.702 | CAL2-2 | 0.644 |
| CAL3-2 | 0.464 | CAL3-2 | 0.830 | CAL3-2 | 0.612 | CAL3-2 | 0.623 | CAL3-2 | 0.578 |
| P3 | 0.766 | P3 | 1.531 | P3 | 1.077 | P3 | 1.041 | P3 | 1.202 |
| N3 | 0.073 | N3 | 0.163 | N3 | 0.120 | N3 | 0.103 | N3 | 0.095 |
| CAL1-3 | 0.486 | CAL1-3 | 0.778 | CAL1-3 | 0.583 | CAL1-3 | 0.630 | CAL1-3 | 0.591 |
| CAL2-3 | 0.419 | CAL2-3 | 0.754 | CAL2-3 | 0.644 | CAL2-3 | 0.638 | CAL2-3 | 0.603 |
| CAL3-3 | 0.485 | CAL3-3 | 0.787 | CAL3-3 | 0.689 | CAL3-3 | 0.637 | CAL3-3 | 0.666 |

Tabla 33. Cálculo de las unidades PANBIO de los testigos para cada placa.

| Placa D1 | | | Placa D2 | | | Placa D3 | | |
|----------|-----------------|-----------|----------|-----------------|-----------|----------|-----------------|-----------|
| Testigo | Unidades Panbio | Resultado | Testigo | Unidades Panbio | Resultado | Testigo | Unidades Panbio | Resultado |
| P1 | 24.278 | Positivo | P1 | 27.524 | Positivo | P1 | 28.597 | Positivo |
| N1 | 1.338 | Negativo | N1 | 1.832 | Negativo | N1 | 2.215 | Negativo |
| P2 | 21.032 | Positivo | P2 | 19.347 | Positivo | P2 | 19.761 | Positivo |
| N2 | 1.291 | Negativo | N2 | 1.166 | Negativo | N2 | 1.449 | Negativo |
| P3 | 19.054 | Positivo | P3 | 22.782 | Positivo | P3 | 19.405 | Positivo |
| N3 | 1.815 | Negativo | N3 | 2.425 | Negativo | N3 | 2.162 | Negativo |

| Placa D4 | | | Placa D5 | | |
|----------|-----------------|-----------|----------|-----------------|-----------|
| Testigo | Unidades Panbio | Resultado | Testigo | Unidades Panbio | Resultado |
| P1 | 25.797 | Positivo | P1 | 24.657 | Positivo |
| N1 | 1.474 | Negativo | N1 | 1.209 | Negativo |
| P2 | 22.574 | Positivo | P2 | 22.964 | Positivo |
| N2 | 1.481 | Negativo | N2 | 1.257 | Negativo |
| P3 | 18.85 | Positivo | P3 | 22.3 | Positivo |
| N3 | 1.865 | Negativo | N3 | 1.762 | Negativo |

Tabla 34. Tabla de contingencia con dos criterios de clasificación.

| Placa | Réplica | Testigos | Clasificación verdadera de la muestra | Clasificación de la muestra por el método analítico |
|----------|-----------|----------|---------------------------------------|---|
| Placa D1 | Réplica 1 | TP | Positivo | Positiva |
| | | TN | Negativo | Negativa |
| | Réplica 2 | TP | Positivo | Positiva |
| | | TN | Negativo | Negativa |
| | Réplica 3 | TP | Positivo | Positiva |
| | | TN | Negativo | Negativa |
| Placa D2 | Réplica 1 | TP | Positivo | Positiva |
| | | TN | Negativo | Negativa |
| | Réplica 2 | TP | Positivo | Positiva |
| | | TN | Negativo | Negativa |
| | Réplica 3 | TP | Positivo | Positiva |
| | | TN | Negativo | Negativa |
| Placa D3 | Réplica 1 | TP | Positivo | Positiva |
| | | TN | Negativo | Negativa |
| | Réplica 2 | TP | Positivo | Positiva |
| | | TN | Negativo | Negativa |
| | Réplica 3 | TP | Positivo | Positiva |
| | | TN | Negativo | Negativa |
| Placa D4 | Réplica 1 | TP | Positivo | Positiva |
| | | TN | Negativo | Negativa |
| | Réplica 2 | TP | Positivo | Positiva |
| | | TN | Negativo | Negativa |
| | Réplica 3 | TP | Positivo | Positiva |
| | | TN | Negativo | Negativa |
| Placa D5 | Réplica 1 | TP | Positivo | Positiva |
| | | TN | Negativo | Negativa |
| | Réplica 2 | TP | Positivo | Positiva |
| | | TN | Negativo | Negativa |
| | Réplica 3 | TP | Positivo | Positiva |
| | | TN | Negativo | Negativa |

Selectividad

Tabla 36. Registro de absorbancia de cada placa.

| Placa D1 | | Placa D2 | |
|------------|-------------|------------|-------------|
| Test/Mtas | Absorbancia | Test/Mtas | Absorbancia |
| P1 | 1.316 | P1 | 1.578 |
| N1 | 0.138 | N1 | 0.12 |
| CAL1 | 0.32 | CAL1 | 0.329 |
| CAL2 | 0.28 | CAL2 | 0.326 |
| CAL3 | 0.307 | CAL3 | 0.351 |
| SN1 | 0.173 | SN1 | 0.177 |
| SN2 | 0.17 | SN2 | 0.197 |
| SN3 | 0.217 | SN3 | 0.203 |
| IA1 | 0.185 | IA1 | 0.14 |
| IA2 | 0.167 | IA2 | 0.141 |
| IA3 | 0.166 | IA3 | 0.146 |
| Sa1 | 0.26 | Sa1 | 0.19 |
| Sa1 | 0.256 | Sa1 | 0.198 |
| Sa1 | 0.285 | Sa1 | 0.199 |
| Ru1 | 0.157 | Ru1 | 0.16 |
| Ru2 | 0.187 | Ru2 | 0.157 |
| Ru3 | 0.186 | Ru3 | 0.147 |
| Media | 0.302 | Media | 0.335 |
| Desviación | 0.020 | Desviación | 0.014 |
| CV | 6.749 | CV | 4.071 |
| VC | 0.345 | VC | 0.382 |

Tabla 37. Unidades Panbio de cada muestra.

| Placa D1 | | | Placa D2 | | |
|-----------|-----------------|-----------|-----------|-----------------|-----------|
| Test/Mtas | Unidades Panbio | Resultado | Test/Mtas | Unidades Panbio | Resultado |
| P1 | 38.183 | Positivo | P1 | 45.784 | Positivo |
| N1 | 4.004 | Negativo | N1 | 3.482 | Negativo |
| SN1 | 5.019 | Negativo | SN1 | 5.135 | Negativo |
| SN2 | 4.932 | Negativo | SN2 | 5.716 | Negativo |
| SN3 | 6.296 | Negativo | SN3 | 5.890 | Negativo |
| IA1 | 5.368 | Negativo | IA1 | 4.062 | Negativo |
| IA2 | 4.845 | Negativo | IA2 | 4.091 | Negativo |
| IA3 | 4.816 | Negativo | IA3 | 4.236 | Negativo |
| Sa1 | 7.544 | Negativo | Sa1 | 5.513 | Negativo |
| Sa1 | 7.428 | Negativo | Sa1 | 5.745 | Negativo |
| Sa1 | 8.269 | Negativo | Sa1 | 5.774 | Negativo |
| Ru1 | 4.555 | Negativo | Ru1 | 4.642 | Negativo |
| Ru2 | 5.426 | Negativo | Ru2 | 4.555 | Negativo |
| Ru3 | 5.397 | Negativo | Ru3 | 4.265 | Negativo |

Precisión intermedia del método

Tabla 38. Registro de absorbancias (A1D1, A1D2, A2D1 o A2D2).

| Placa A1D1 | | Placa A1D2 | | Placa A2D1 | | Placa A2D2 | |
|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| <i>Test/Mtas</i> | <i>Absorbancia</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Absorbancia</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Absorbancia</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Absorbancia</i> |
| P1 | 1.391 | P1 | 1.124 | P1 | 1.172 | P1 | 1.098 |
| N1 | 0.094 | N1 | 0.067 | N1 | 0.075 | N1 | 0.059 |
| CAL1 | 0.7 | CAL1 | 0.561 | CAL1 | 0.633 | CAL1 | 0.575 |
| CAL2 | 0.602 | CAL2 | 0.569 | CAL2 | 0.601 | CAL2 | 0.578 |
| CAL3 | 0.607 | CAL3 | 0.592 | CAL3 | 0.575 | CAL3 | 0.609 |
| SPB1 | 2.585 | SPB1 | 2.377 | SPB1 | 2.532 | SPB1 | 2.432 |
| SPB2 | 2.433 | SPB2 | 2.452 | SPB2 | 2.527 | SPB2 | 2.422 |
| SPB3 | 2.536 | SPB3 | 2.475 | SPB3 | 2.475 | SPB3 | 2.474 |
| SPA1 | 2.839 | SPA1 | 2.791 | SPA1 | 2.771 | SPA1 | 2.848 |
| SPA2 | 2.843 | SPA2 | 2.761 | SPA2 | 2.767 | SPA2 | 2.791 |
| SPA3 | 2.822 | SPA3 | 2.778 | SPA3 | 2.815 | SPA3 | 2.823 |
| SN1 | 0.189 | SN1 | 0.117 | SN1 | 0.117 | SN1 | 0.101 |
| SN2 | 0.212 | SN2 | 0.114 | SN2 | 0.118 | SN2 | 0.104 |
| SN3 | 0.339 | SN3 | 0.115 | SN3 | 0.133 | SN3 | 0.118 |
| Media | 0.636 | Media | 0.574 | Media | 0.603 | Media | 0.587 |
| Desviación | 0.055 | Desviación | 0.016 | Desviación | 0.029 | Desviación | 0.019 |
| CV | 8.674 | CV | 2.804 | CV | 4.818 | CV | 3.205 |
| VC | 0.554 | VC | 0.499 | VC | 0.525 | VC | 0.675 |

Tabla 39. Unidades PANBIO calculadas a partir de las absorbancias (A1D1, A1D2, A2D1 o A2D2).

| Placa A1D1 | | | Placa A1D2 | | |
|-------------------|------------------------|------------------|-------------------|------------------------|------------------|
| <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> |
| P1 | 25.126 | Positivo | P1 | 22.508 | Positivo |
| N1 | 1.698 | Negativo | N1 | 1.342 | Negativo |
| SPB1 | 46.694 | Positivo | SPB1 | 47.599 | Positivo |
| SPB2 | 43.948 | Positivo | SPB2 | 49.101 | Positivo |
| SPB3 | 45.808 | Positivo | SPB3 | 49.561 | Positivo |
| SPA1 | 51.282 | Positivo | SPA1 | 55.889 | Positivo |
| SPA2 | 51.354 | Positivo | SPA2 | 55.289 | Positivo |
| SPA3 | 50.975 | Positivo | SPA3 | 55.629 | Positivo |
| SN1 | 3.414 | Negativo | SN1 | 2.343 | Negativo |
| SN2 | 3.829 | Negativo | SN2 | 2.283 | Negativo |
| SN3 | 6.123 | Negativo | SN3 | 2.303 | Negativo |
| Placa A2D1 | | | Placa A2D2 | | |
| <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> |
| P1 | 22.340 | Positivo | P1 | 16.264 | Positivo |
| N1 | 1.430 | Negativo | N1 | 0.874 | Negativo |
| SPB1 | 48.264 | Positivo | SPB1 | 36.025 | Positivo |
| SPB2 | 48.169 | Positivo | SPB2 | 35.876 | Positivo |
| SPB3 | 47.178 | Positivo | SPB3 | 36.647 | Positivo |
| SPA1 | 52.820 | Positivo | SPA1 | 42.187 | Positivo |
| SPA2 | 52.744 | Positivo | SPA2 | 41.342 | Positivo |
| SPA3 | 53.659 | Positivo | SPA3 | 41.816 | Positivo |
| SN1 | 2.230 | Negativo | SN1 | 1.496 | Negativo |
| SN2 | 2.249 | Negativo | SN2 | 1.541 | Negativo |
| SN3 | 2.535 | Negativo | SN3 | 1.748 | Negativo |

Estabilidad analítica de la muestra

Tabla 40. Registro de absorbancias (TBB, TBA, TAB, TAA).

| Placa TBB | | Placa TBA | | Placa TAB | | Placa TAA | |
|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| <i>Test/Mtas</i> | <i>Absorbancia</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Absorbancia</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Absorbancia</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Absorbancia</i> |
| P1 | 1.196 | P1 | 0.89 | P1 | 1.217 | P1 | 0.989 |
| N1 | 0.138 | N1 | 0.108 | N1 | 0.144 | N1 | 0.163 |
| CAL1 | 0.509 | CAL1 | 0.632 | CAL1 | 0.611 | CAL1 | 0.581 |
| CAL2 | 0.482 | CAL2 | 0.456 | CAL2 | 0.567 | CAL2 | 0.564 |
| CAL3 | 0.474 | CAL3 | 0.467 | CAL3 | 0.618 | CAL3 | 0.604 |
| SPB1 | 2.069 | SPB1 | 1.794 | SPB1 | 2.291 | SPB1 | 2.007 |
| SPB2 | 2.053 | SPB2 | 1.973 | SPB2 | 2.348 | SPB2 | 1.59 |
| SPB3 | 2.088 | SPB3 | 1.919 | SPB3 | 2.376 | SPB3 | 1.74 |
| SPA1 | 2.56 | SPA1 | 2.406 | SPA1 | 2.734 | SPA1 | 2.399 |
| SPA2 | 2.515 | SPA2 | 2.411 | SPA2 | 2.765 | SPA2 | 2.625 |
| SPA3 | 2.57 | SPA3 | 2.424 | SPA3 | 2.759 | SPA3 | 2.692 |
| SN1 | 0.162 | SN1 | 0.13 | SN1 | 0.167 | SN1 | 0.151 |
| SN2 | 0.147 | SN2 | 0.133 | SN2 | 0.173 | SN2 | 0.163 |
| SN3 | 0.182 | SN3 | 0.153 | SN3 | 0.186 | SN3 | 0.181 |
| Media | 0.488 | Media | 0.518 | Media | 0.599 | Media | 0.583 |
| Desviación | 0.018 | Desviación | 0.099 | Desviación | 0.028 | Desviación | 0.020 |
| CV | 3.756 | CV | 19.021 | CV | 4.618 | CV | 3.443 |
| VC | 0.425 | VC | 0.451 | VC | 0.521 | VC | 0.507 |

Tabla 41. Unidades PANBIO de TBB, TBA, TAB, TAA.

| Placa TBB | | | Placa TBA | | |
|------------------|------------------------|------------------|------------------|------------------------|------------------|
| <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> |
| P1 | 28.151 | Positivo | P1 | 19.736 | Positivo |
| N1 | 3.248 | Negativo | N1 | 2.395 | Negativo |
| SPB1 | 48.700 | Positivo | SPB1 | 39.783 | Positivo |
| SPB2 | 48.323 | Positivo | SPB2 | 43.752 | Positivo |
| SPB3 | 49.147 | Positivo | SPB3 | 42.555 | Positivo |
| SPA1 | 60.257 | Positivo | SPA1 | 53.354 | Positivo |
| SPA2 | 59.197 | Positivo | SPA2 | 53.465 | Positivo |
| SPA3 | 60.492 | Positivo | SPA3 | 53.753 | Positivo |
| SN1 | 3.813 | Negativo | SN1 | 2.883 | Negativo |
| SN2 | 3.460 | Negativo | SN2 | 2.949 | Negativo |
| SN3 | 4.284 | Negativo | SN3 | 3.393 | Negativo |
| | | | | | |
| Placa TAB | | | Placa TAA | | |
| <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> |
| P1 | 23.366 | Positivo | P1 | 18.989 | Positivo |
| N1 | 2.765 | Negativo | N1 | 3.130 | Negativo |
| SPB1 | 43.987 | Positivo | SPB1 | 38.534 | Positivo |
| SPB2 | 45.081 | Positivo | SPB2 | 30.528 | Positivo |
| SPB3 | 45.619 | Positivo | SPB3 | 33.408 | Positivo |
| SPA1 | 52.492 | Positivo | SPA1 | 46.060 | Positivo |
| SPA2 | 53.087 | Positivo | SPA2 | 50.399 | Positivo |
| SPA3 | 52.972 | Positivo | SPA3 | 51.686 | Positivo |
| SN1 | 3.206 | Negativo | SN1 | 2.899 | Negativo |
| SN2 | 3.322 | Negativo | SN2 | 3.130 | Negativo |
| SN3 | 3.571 | Negativo | SN3 | 3.475 | Negativo |

Estabilidad de la muestra

Tabla 42. Registro de absorbancias (CE0, CE1, CE2, CE3, CE4).

| Placa CE0 | | Placa CE1 | | Placa CE2 | | Placa CE3 | | Placa CE4 | |
|-------------------|--------------|-------------------|--------------|-------------------|--------------|-------------------|--------------|-------------------|--------------|
| <i>Test/Mtas</i> | <i>Abs</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Abs</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Abs</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Abs</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Abs</i> |
| P1 | 0.925 | P1 | 1.273 | P1 | 1.37 | P1 | 1.441 | P1 | 1.315 |
| N1 | 0.056 | N1 | 0.074 | N1 | 0.074 | N1 | 0.107 | N1 | 0.112 |
| CAL1 | 0.427 | CAL1 | 0.61 | CAL1 | 0.63 | CAL1 | 0.673 | CAL1 | 0.676 |
| CAL2 | 0.426 | CAL2 | 0.607 | CAL2 | 0.639 | CAL2 | 0.64 | CAL2 | 0.694 |
| CAL3 | 0.475 | CAL3 | 0.602 | CAL3 | 0.632 | CAL3 | 0.716 | CAL3 | 0.733 |
| SPB1 | 2.237 | SPB1 | 2.39 | SPB1 | 2.572 | SPB1 | 2.596 | SPB1 | 2.62 |
| SPB2 | 1.385 | SPB2 | 2.474 | SPB2 | 2.68 | SPB2 | 2.553 | SPB2 | 2.601 |
| SPB3 | 2.326 | SPB3 | 2.426 | SPB3 | 2.712 | SPB3 | 2.631 | SPB3 | 2.525 |
| SPA1 | 2.715 | SPA1 | 2.768 | SPA1 | 2.867 | SPA1 | 2.831 | SPA1 | 2.856 |
| SPA2 | 2.784 | SPA2 | 2.795 | SPA2 | 2.866 | SPA2 | 2.854 | SPA2 | 2.839 |
| SPA3 | 2.725 | SPA3 | 2.728 | SPA3 | 2.851 | SPA3 | 2.853 | SPA3 | 2.833 |
| SN1 | 0.176 | SN1 | 0.16 | SN1 | 0.17 | SN1 | 0.218 | SN1 | 0.211 |
| SN2 | 0.152 | SN2 | 0.161 | SN2 | 0.187 | SN2 | 0.225 | SN2 | 0.223 |
| SN3 | 0.142 | SN3 | 0.281 | SN3 | 0.221 | SN3 | 0.255 | SN3 | 0.251 |
| Media | 0.443 | Media | 0.606 | Media | 0.634 | Media | 0.676 | Media | 0.701 |
| Desviación | 0.028 | Desviación | 0.004 | Desviación | 0.005 | Desviación | 0.038 | Desviación | 0.029 |
| CV | 0.063 | CV | 0.007 | CV | 0.007 | CV | 0.056 | CV | 0.042 |
| VC | 0.385 | VC | 0.528 | VC | 0.551 | VC | 0.588 | VC | 0.610 |

Tabla 43 Unidades Panbio de (CE0, CE1, CE2, CE3, CE4).

| Placa CE0 | | | Placa CE1 | | | Placa CE2 | | |
|------------------|------------------------|------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------|------------------------|------------------|
| <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> |
| P1 | 24.018 | Positivo | P1 | 24.132 | Positivo | P1 | 25.971 | Positivo |
| N1 | 1.454 | Negativo | N1 | 1.403 | Negativo | N1 | 1.403 | Negativo |
| SPB1 | 58.086 | Positivo | SPB1 | 45.307 | Positivo | SPB1 | 48.757 | Positivo |
| SPB2 | 35.963 | Positivo | SPB2 | 46.900 | Positivo | SPB2 | 50.805 | Positivo |
| SPB3 | 60.397 | Positivo | SPB3 | 45.990 | Positivo | SPB3 | 51.411 | Positivo |
| SPA1 | 70.498 | Positivo | SPA1 | 52.473 | Positivo | SPA1 | 54.350 | Positivo |
| SPA2 | 72.289 | Positivo | SPA2 | 52.985 | Positivo | SPA2 | 54.331 | Positivo |
| SPA3 | 70.757 | Positivo | SPA3 | 51.715 | Positivo | SPA3 | 54.046 | Positivo |
| SN1 | 4.570 | Negativo | SN1 | 3.033 | Negativo | SN1 | 3.223 | Negativo |
| SN2 | 3.947 | Negativo | SN2 | 3.052 | Negativo | SN2 | 3.545 | Negativo |
| SN3 | 3.687 | Negativo | SN3 | 5.327 | Negativo | SN3 | 4.189 | Negativo |

| Placa CE3 | | | Placa CE4 | | |
|------------------|------------------------|------------------|------------------|------------------------|------------------|
| <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> |
| P1 | 27.317 | Positivo | P1 | 24.928 | Positivo |
| N1 | 2.028 | Negativo | N1 | 2.123 | Negativo |
| SPB1 | 49.212 | Positivo | SPB1 | 49.667 | Positivo |
| SPB2 | 48.397 | Positivo | SPB2 | 49.307 | Positivo |
| SPB3 | 49.876 | Positivo | SPB3 | 47.866 | Positivo |
| SPA1 | 53.667 | Positivo | SPA1 | 54.141 | Positivo |
| SPA2 | 54.103 | Positivo | SPA2 | 53.819 | Positivo |
| SPA3 | 54.084 | Positivo | SPA3 | 53.705 | Positivo |
| SN1 | 4.133 | Negativo | SN1 | 4.000 | Negativo |
| SN2 | 4.265 | Negativo | SN2 | 4.227 | Negativo |
| SN3 | 4.834 | Negativo | SN3 | 4.758 | Negativo |

Tolerancia

Tabla 45. Absorbancias de cada tratamiento.

| Placa T₁ | | Placa T₂ | | Placa T₃ | | Placa T₄ | |
|----------------------------|--------------------|----------------------------|--------------------|----------------------------|--------------------|----------------------------|--------------------|
| <i>Test/Mtas</i> | <i>Absorbancia</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Absorbancia</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Absorbancia</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Absorbancia</i> |
| P1 | 1.017 | P1 | 0.911 | P1 | 0.829 | P1 | 0.883 |
| N1 | 0.074 | N1 | 0.054 | N1 | 0.05 | N1 | 0.045 |
| CAL1 | 0.462 | CAL1 | 0.423 | CAL1 | 0.426 | CAL1 | 0.427 |
| CAL2 | 0.452 | CAL2 | 0.449 | CAL2 | 0.437 | CAL2 | 0.435 |
| CAL3 | 0.478 | CAL3 | 0.521 | CAL3 | 0.435 | CAL3 | 0.436 |
| SPB1 | 2.422 | SPB1 | 2.163 | SPB1 | 2.103 | SPB1 | 2.411 |
| SPB2 | 2.491 | SPB2 | 2.064 | SPB2 | 2.065 | SPB2 | 2.451 |
| SPB3 | 2.466 | SPB3 | 2.132 | SPB3 | 1.975 | SPB3 | 2.446 |
| SPA1 | 2.758 | SPA1 | 2.577 | SPA1 | 2.593 | SPA1 | 2.725 |
| SPA2 | 2.717 | SPA2 | 2.583 | SPA2 | 2.527 | SPA2 | 2.773 |
| SPA3 | 2.697 | SPA3 | 2.636 | SPA3 | 2.546 | SPA3 | 2.745 |
| SN1 | 0.127 | SN1 | 0.098 | SN1 | 0.103 | SN1 | 0.088 |
| SN2 | 0.124 | SN2 | 0.106 | SN2 | 0.107 | SN2 | 0.092 |
| SN3 | 0.148 | SN3 | 0.107 | SN3 | 0.113 | SN3 | 0.094 |
| Media | 0.464 | Media | 0.464 | Media | 0.433 | Media | 0.433 |
| Desviación | 0.013 | Desviación | 0.051 | Desviación | 0.006 | Desviación | 0.005 |
| CV | 2.826 | CV | 10.933 | CV | 1.354 | CV | 1.140 |
| VC | 0.404 | VC | 0.404 | VC | 0.376 | VC | 0.376 |

Tabla 46. Registro de las unidades Panbio por tratamiento.

| Placa T1 | | | Placa T2 | | |
|------------------|------------------------|------------------|------------------|------------------------|------------------|
| <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> |
| P1 | 25.193 | Positivo | P1 | 22.551 | Positivo |
| N1 | 1.833 | Negativo | N1 | 1.337 | Negativo |
| SPB1 | 59.998 | Positivo | SPB1 | 53.544 | Negativo |
| SPB2 | 61.707 | Positivo | SPB2 | 51.093 | Negativo |
| SPB3 | 61.088 | Positivo | SPB3 | 52.776 | Negativo |
| SPA1 | 68.321 | Positivo | SPA1 | 63.792 | Negativo |
| SPA2 | 67.306 | Positivo | SPA2 | 63.940 | Negativo |
| SPA3 | 66.810 | Positivo | SPA3 | 65.252 | Negativo |
| SN1 | 3.146 | Negativo | SN1 | 2.426 | Negativo |
| SN2 | 3.072 | Negativo | SN2 | 2.624 | Negativo |
| SN3 | 3.666 | Negativo | SN3 | 2.649 | Negativo |
| | | | | | |
| Placa T3 | | | Placa T4 | | |
| <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> |
| P1 | 22.023 | Positivo | P1 | 23.458 | Positivo |
| N1 | 1.328 | Negativo | N1 | 1.195 | Negativo |
| SPB1 | 55.868 | Positivo | SPB1 | 64.051 | Positivo |
| SPB2 | 54.859 | Positivo | SPB2 | 65.113 | Positivo |
| SPB3 | 52.468 | Positivo | SPB3 | 64.981 | Positivo |
| SPA1 | 68.886 | Positivo | SPA1 | 72.393 | Positivo |
| SPA2 | 67.132 | Positivo | SPA2 | 73.668 | Positivo |
| SPA3 | 67.637 | Positivo | SPA3 | 72.924 | Positivo |
| SN1 | 2.736 | Negativo | SN1 | 2.338 | Negativo |
| SN2 | 2.843 | Negativo | SN2 | 2.444 | Negativo |
| SN3 | 3.002 | Negativo | SN3 | 2.497 | Negativo |

Robustez

Tabla 49. Registro de absorbancias para las ocho placas.

| Placa 1 | | Placa 2 | | Placa 3 | | Placa 4 | | Placa 5 | | Placa 6 | | Placa 7 | | Placa 8 | |
|-------------------|--------------|-------------------|--------------|-------------------|--------------|-------------------|--------------|-------------------|--------------|-------------------|--------------|-------------------|--------------|-------------------|--------------|
| <i>Test/Mtas</i> | <i>Abs</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Abs</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Abs</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Abs</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Abs</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Abs</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Abs</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Abs</i> |
| P1 | 1.324 | P1 | 0.926 | P1 | 0.931 | P1 | 1.369 | P1 | 0.892 | P1 | 1.031 | P1 | 1.960 | P1 | 1.039 |
| N1 | 0.069 | N1 | 0.103 | N1 | 0.047 | N1 | 0.060 | N1 | 0.050 | N1 | 0.056 | N1 | 0.169 | N1 | 0.080 |
| CAL1 | 0.595 | CAL1 | 0.225 | CAL1 | 0.381 | CAL1 | 0.581 | CAL1 | 0.395 | CAL1 | 0.396 | CAL1 | 0.957 | CAL1 | 0.465 |
| CAL2 | 0.605 | CAL2 | 0.216 | CAL2 | 0.393 | CAL2 | 0.564 | CAL2 | 0.370 | CAL2 | 0.386 | CAL2 | 0.973 | CAL2 | 0.435 |
| CAL3 | 0.610 | CAL3 | 0.214 | CAL3 | 0.408 | CAL3 | 0.546 | CAL3 | 0.383 | CAL3 | 0.344 | CAL3 | 0.904 | CAL3 | 0.436 |
| SPB1 | 2.341 | SPB1 | 2.459 | SPB1 | 1.987 | SPB1 | 2.270 | SPB1 | 1.724 | SPB1 | 1.757 | SPB1 | 2.788 | SPB1 | 1.914 |
| SPB2 | 2.464 | SPB2 | 2.486 | SPB2 | 2.084 | SPB2 | 2.434 | SPB2 | 1.791 | SPB2 | 1.849 | SPB2 | 2.826 | SPB2 | 2.117 |
| SPB3 | 2.44 | SPB3 | 2.415 | SPB3 | 2.065 | SPB3 | 2.323 | SPB3 | 2.016 | SPB3 | 1.975 | SPB3 | 2.829 | SPB3 | 2.068 |
| SPA1 | 2.805 | SPA1 | 2.758 | SPA1 | 2.542 | SPA1 | 2.716 | SPA1 | 2.453 | SPA1 | 2.495 | SPA1 | 2.890 | SPA1 | 2.540 |
| SPA2 | 2.79 | SPA2 | 2.749 | SPA2 | 2.435 | SPA2 | 2.682 | SPA2 | 2.402 | SPA2 | 2.565 | SPA2 | 2.860 | SPA2 | 2.603 |
| SPA3 | 2.768 | SPA3 | 2.75 | SPA3 | 2.554 | SPA3 | 2.669 | SPA3 | 2.409 | SPA3 | 2.518 | SPA3 | 2.887 | SPA3 | 2.606 |
| SN1 | 0.173 | SN1 | 0.133 | SN1 | 0.125 | SN1 | 0.101 | SN1 | 0.106 | SN1 | 0.135 | SN1 | 0.28 | SN1 | 0.14 |
| SN2 | 0.176 | SN2 | 0.137 | SN2 | 0.128 | SN2 | 0.128 | SN2 | 0.108 | SN2 | 0.148 | SN2 | 0.381 | SN2 | 0.14 |
| SN3 | 0.238 | SN3 | 0.154 | SN3 | 0.151 | SN3 | 0.151 | SN3 | 0.093 | SN3 | 0.136 | SN3 | 0.307 | SN3 | 0.238 |
| Media | 0.564 | Media | 0.218 | Media | 0.394 | Media | 0.564 | Media | 0.383 | Media | 0.375 | Media | 0.945 | Media | 0.445 |
| Desviación | 0.018 | Desviación | 0.006 | Desviación | 0.014 | Desviación | 0.018 | Desviación | 0.013 | Desviación | 0.028 | Desviación | 0.036 | Desviación | 0.017 |
| CV | 3.105 | CV | 2.684 | CV | 3.433 | CV | 3.105 | CV | 3.267 | CV | 7.351 | CV | 3.823 | CV | 3.826 |
| VC | 0.490 | VC | 0.190 | VC | 0.343 | VC | 0.490 | VC | 0.333 | VC | 0.327 | VC | 0.822 | VC | 0.387 |

Tabla 50. Registro de unidades Panbio de las absorbancias obtenidas.

| Placa 1 | | | Placa 2 | | | Placa 3 | | | Placa 4 | | |
|------------------|------------------------|------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------|------------------------|------------------|
| <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> |
| P1 | 27.917 | Positivo | P1 | 48.750 | Positivo | P1 | 27.160 | Positivo | P1 | 27.917 | Positivo |
| N1 | 1.224 | Negativo | N1 | 5.422 | Negativo | N1 | 1.371 | Negativo | N1 | 1.224 | Negativo |
| SPB1 | 46.290 | Positivo | SPB1 | 129.455 | Positivo | SPB1 | 57.967 | Positivo | SPB1 | 46.290 | Positivo |
| SPB2 | 49.634 | Positivo | SPB2 | 130.877 | Positivo | SPB2 | 60.797 | Positivo | SPB2 | 49.634 | Positivo |
| SPB3 | 47.370 | Positivo | SPB3 | 127.139 | Positivo | SPB3 | 60.243 | Positivo | SPB3 | 47.370 | Positivo |
| SPA1 | 57.199 | Positivo | SPA1 | 145.196 | Positivo | SPA1 | 74.158 | Positivo | SPA1 | 55.384 | Positivo |
| SPA2 | 56.893 | Positivo | SPA2 | 144.722 | Positivo | SPA2 | 71.037 | Positivo | SPA2 | 54.691 | Positivo |
| SPA3 | 56.445 | Positivo | SPA3 | 144.775 | Positivo | SPA3 | 74.508 | Positivo | SPA3 | 54.426 | Positivo |
| SN1 | 3.528 | Negativo | SN1 | 7.002 | Negativo | SN1 | 3.647 | Negativo | SN1 | 2.060 | Negativo |
| SN2 | 3.589 | Negativo | SN2 | 7.212 | Negativo | SN2 | 3.734 | Negativo | SN2 | 2.610 | Negativo |
| SN3 | 4.853 | Negativo | SN3 | 8.107 | Negativo | SN3 | 4.405 | Negativo | SN3 | 3.079 | Negativo |
| Placa 5 | | | Placa 6 | | | Placa 7 | | | Placa 8 | | |
| <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> |
| P1 | 26.793 | Positivo | P1 | 31.573 | Positivo | P1 | 23.848 | Positivo | P1 | 26.817 | Positivo |
| N1 | 1.502 | Negativo | N1 | 1.715 | Negativo | N1 | 2.056 | Negativo | N1 | 2.065 | Negativo |
| SPB1 | 51.784 | Positivo | SPB1 | 53.807 | Positivo | SPB1 | 33.923 | Positivo | SPB1 | 49.401 | Positivo |
| SPB2 | 53.797 | Positivo | SPB2 | 56.624 | Positivo | SPB2 | 34.385 | Positivo | SPB2 | 54.641 | Positivo |
| SPB3 | 60.555 | Positivo | SPB3 | 60.483 | Positivo | SPB3 | 34.422 | Positivo | SPB3 | 53.376 | Positivo |
| SPA1 | 73.681 | Positivo | SPA1 | 76.407 | Positivo | SPA1 | 35.164 | Positivo | SPA1 | 65.559 | Positivo |
| SPA2 | 72.149 | Positivo | SPA2 | 78.551 | Positivo | SPA2 | 34.799 | Positivo | SPA2 | 67.185 | Positivo |
| SPA3 | 72.360 | Positivo | SPA3 | 77.112 | Positivo | SPA3 | 35.128 | Positivo | SPA3 | 67.262 | Positivo |
| SN1 | 3.184 | Negativo | SN1 | 4.134 | Negativo | SN1 | 3.407 | Negativo | SN1 | 3.613 | Negativo |
| SN2 | 3.244 | Negativo | SN2 | 4.532 | Negativo | SN2 | 4.636 | Negativo | SN2 | 3.613 | Negativo |
| SN3 | SN3 | 4.165 | SN3 | 2.793 | Negativo | SN3 | 3.735 | Negativo | SN3 | 6.143 | Negativo |

13.4.3 ELISA IgG

Proporcionalidad y precisión del sistema

Tabla 51. Registros de absorbancia de la combinación tira – dilución.

| Dilución 1:20 | Absorbancia | Dilución 1:100 | Absorbancia | Dilución 1:500 | Absorbancia |
|-------------------|--------------|-------------------|--------------|-------------------|--------------|
| CAL1 | 0.361 | CAL1 | 0.338 | CAL1 | 0.301 |
| CAL1 | 0.355 | CAL1 | 0.318 | CAL1 | 0.338 |
| CAL2 | 0.348 | CAL1 | 0.308 | CAL2 | 0.325 |
| CAL2 | 0.374 | CAL2 | 0.344 | CAL2 | 0.308 |
| Media | 0.360 | CAL2 | 0.343 | Media | 0.318 |
| Desviación | 0.011 | CAL2 | 0.332 | Desviación | 0.017 |
| CV | 3.07 | Media | 0.331 | CV | 5.26 |
| | | Desviación | 0.015 | | |
| | | CV | 4.40 | | |

Tabla 52. Contingencia (orden de concentración de dilución y orden de intensidad de respuesta).

| Orden de concentración de dilución | Orden de intensidad de respuesta |
|------------------------------------|----------------------------------|
| CAL1 Dilución 1:20 | 0.361 |
| CAL1 Dilución 1:20 | 0.355 |
| CAL2 Dilución 1:20 | 0.348 |
| CAL2 Dilución 1:20 | 0.374 |
| CAL1 Dilución 1:100 | 0.338 |
| CAL1 Dilución 1:100 | 0.318 |
| CAL1 Dilución 1:100 | 0.308 |
| CAL2 Dilución 1:100 | 0.344 |
| CAL2 Dilución 1:100 | 0.343 |
| CAL2 Dilución 1:100 | 0.332 |
| CAL1 Dilución 1:500 | 0.301 |
| CAL1 Dilución 1:500 | 0.338 |
| CAL2 Dilución 1:500 | 0.325 |
| CAL2 Dilución 1:500 | 0.308 |

Sensibilidad y especificidad

Tabla 54. Resultados de absorbancia de la combinación placa – réplica de testigos.

| Placa D1 | | Placa D2 | | Placa D3 | | Placa D4 | | Placa D5 | |
|----------|-------|----------|-------|----------|-------|----------|-------|----------|-------|
| Testigos | Abs | Testigos | Abs | Testigos | Abs | Testigos | Abs | Testigos | Abs |
| P1 | 1.246 | P1 | 1.104 | P1 | 0.976 | P1 | 0.976 | P1 | 1.137 |
| N1 | 0.025 | N1 | 0.021 | N1 | 0.014 | N1 | 0.014 | N1 | 0.016 |
| CAL1-1 | 0.394 | CAL1-1 | 0.347 | CAL1-1 | 0.333 | CAL1-1 | 0.333 | CAL1-1 | 0.357 |
| CAL2-1 | 0.364 | CAL2-1 | 0.338 | CAL2-1 | 0.296 | CAL2-1 | 0.296 | CAL2-1 | 0.346 |
| CAL3-1 | 0.404 | CAL3-1 | 0.342 | CAL3-1 | 0.342 | CAL3-1 | 0.342 | CAL3-1 | 0.353 |
| P2 | 1.192 | P2 | 0.944 | P2 | 0.904 | P2 | 0.904 | P2 | 1.017 |
| N2 | 0.032 | N2 | 0.020 | N2 | 0.016 | N2 | 0.016 | N2 | 0.015 |
| CAL1-2 | 0.400 | CAL1-2 | 0.325 | CAL1-2 | 0.305 | CAL1-2 | 0.305 | CAL1-2 | 0.34 |
| CAL2-2 | 0.42 | CAL2-2 | 0.336 | CAL2-2 | 0.308 | CAL2-2 | 0.308 | CAL2-2 | 0.363 |
| CAL3-2 | 0.397 | CAL3-2 | 0.325 | CAL3-2 | 0.315 | CAL3-2 | 0.315 | CAL3-2 | 0.338 |
| P3 | 1.221 | P3 | 1.002 | P3 | 0.905 | P3 | 0.905 | P3 | 1.057 |
| N3 | 0.029 | N3 | 0.021 | N3 | 0.016 | N3 | 0.016 | N3 | 0.016 |
| CAL1-3 | 0.391 | CAL1-3 | 0.350 | CAL1-3 | 0.298 | CAL1-3 | 0.298 | CAL1-3 | 0.345 |
| CAL2-3 | 0.39 | CAL2-3 | 0.334 | CAL2-3 | 0.302 | CAL2-3 | 0.302 | CAL2-3 | 0.349 |
| CAL3-3 | 0.369 | CAL3-3 | 0.320 | CAL3-3 | 0.285 | CAL3-3 | 0.285 | CAL3-3 | 0.338 |

Tabla 55. Cálculo de las unidades PANBIO de los testigos.

| Placa D1 | | | Placa D2 | | | Placa D3 | | |
|----------|-----------------|-----------|----------|-----------------|-----------|----------|-----------------|-----------|
| Testigo | Unidades Panbio | Resultado | Testigo | Unidades Panbio | Resultado | Testigo | Unidades Panbio | Resultado |
| P1 | 32.196 | Positivo | P1 | 32.280 | Positivo | P1 | 30.216 | Positivo |
| N1 | 0.645 | Negativo | N1 | 0.614 | Negativo | N1 | 0.433 | Negativo |
| P2 | 29.432 | Positivo | P2 | 28.780 | Positivo | P2 | 29.255 | Positivo |
| N2 | 0.790 | Negativo | N2 | 0.609 | Negativo | N2 | 0.517 | Negativo |
| P3 | 31.879 | Positivo | P3 | 30.000 | Positivo | P3 | 30.677 | Positivo |
| N3 | 0.757 | Negativo | N3 | 0.628 | Negativo | N3 | 0.542 | Negativo |

| Placa D4 | | | Placa D5 | | |
|----------|-----------------|-----------|----------|-----------------|-----------|
| Testigo | Unidades Panbio | Resultado | Testigo | Unidades Panbio | Resultado |
| P1 | Positivo | Positivo | P1 | Positivo | Positivo |
| N1 | Negativo | Negativo | N1 | Negativo | Negativo |
| P2 | Positivo | Positivo | P2 | Positivo | Positivo |
| N2 | Negativo | Negativo | N2 | Negativo | Negativo |
| P3 | Positivo | Positivo | P3 | Positivo | Positivo |
| N3 | Negativo | Negativo | N3 | Negativo | Negativo |

Tabla 56. Tabla de contingencia con dos criterios de clasificación.

| Placa | Réplica | Testigos | Clasificación verdadera | Clasificación por el método analítico |
|----------|-----------|----------|-------------------------|---------------------------------------|
| Placa D1 | Réplica 1 | TP | Positivo | Positiva |
| | | TN | Negativo | Negativa |
| | Réplica 2 | TP | Positivo | Positiva |
| | | TN | Negativo | Negativa |
| | Réplica 3 | TP | Positivo | Positiva |
| | | TN | Negativo | Negativa |
| Placa D2 | Réplica 1 | TP | Positivo | Positiva |
| | | TN | Negativo | Negativa |
| | Réplica 2 | TP | Positivo | Positiva |
| | | TN | Negativo | Negativa |
| | Réplica 3 | TP | Positivo | Positiva |
| | | TN | Negativo | Negativa |
| Placa D3 | Réplica 1 | TP | Positivo | Positiva |
| | | TN | Negativo | Negativa |
| | Réplica 2 | TP | Positivo | Positiva |
| | | TN | Negativo | Negativa |
| | Réplica 3 | TP | Positivo | Positiva |
| | | TN | Negativo | Negativa |

Selectividad

Tabla 58. Registros de absorbancia de cada placa.

| Placa D1 | | Placa D2 | |
|------------|-------------|------------|-------------|
| Test/Mtas | Absorbancia | Test/Mtas | Absorbancia |
| P1 | 1.730 | P1 | 1.740 |
| N1 | 0.087 | N1 | 0.033 |
| CAL1 | 0.512 | CAL1 | 0.502 |
| CAL2 | 0.489 | CAL2 | 0.533 |
| CAL3 | 0.548 | CAL3 | 0.58 |
| SN1 | 0.408 | SN1 | 0.413 |
| SN2 | 0.437 | SN2 | 0.442 |
| SN3 | 0.447 | SN3 | 0.453 |
| IA1 | 0.096 | IA1 | 0.130 |
| IA2 | 0.102 | IA2 | 0.119 |
| IA3 | 0.102 | IA3 | 0.124 |
| Sa1 | 0.052 | Sa1 | 0.076 |
| Sa1 | 0.054 | Sa1 | 0.067 |
| Sa1 | 0.066 | Sa1 | 0.067 |
| Ru1 | 0.044 | Ru1 | 0.075 |
| Ru2 | 0.044 | Ru2 | 0.087 |
| Ru3 | 0.051 | Ru3 | 0.047 |
| | | | |
| Media | 0.5163 | Media | 0.5383 |
| Desviación | 0.0297 | Desviación | 0.0393 |
| CV | 5.7594 | CV | 7.2952 |
| | | | |
| VC | 0.4234 | VC | 0.4414 |

Tabla 59. Unidades Panbio de la absorbancia de cada placa, testigo (P, N) y las muestras.

| Placa D1 | | | Placa D2 | | |
|-----------|-----------------|-----------|-----------|-----------------|-----------|
| Test/Mtas | Unidades Panbio | Resultado | Test/Mtas | Unidades Panbio | Resultado |
| P1 | 40.8604 | Positivo | P1 | 39.4171 | Positivo |
| N1 | 2.0548 | Negativo | N1 | 0.7476 | Negativo |
| SN1 | 12.0928 | Negativo | SN1 | 11.3720 | Negativo |
| SN2 | 11.5495 | Negativo | SN2 | 12.0743 | Negativo |
| SN3 | 12.9430 | Negativo | SN3 | 13.1390 | Negativo |
| IA1 | 9.6364 | Negativo | IA1 | 9.3559 | Negativo |
| IA2 | 10.3214 | Negativo | IA2 | 10.0128 | Negativo |
| IA3 | 10.5576 | Negativo | IA3 | 10.2620 | Negativo |
| Sa1 | 2.2674 | Negativo | Sa1 | 2.9450 | Negativo |
| Sa1 | 2.4091 | Negativo | Sa1 | 2.6958 | Negativo |
| Sa1 | 2.4091 | Negativo | Sa1 | 2.8090 | Negativo |
| Ru1 | 1.2282 | Negativo | Ru1 | 1.7217 | Negativo |
| Ru2 | 1.2754 | Negativo | Ru2 | 1.5178 | Negativo |
| Ru3 | 1.5588 | Negativo | Ru3 | 1.5178 | Negativo |

Precisión intermedia del método

Tabla 6o. Registro de absorbancias (A1D1, A1D2, A2D1 o A2D2).

| Placa A1D1 | | Placa A1D2 | | Placa A2D1 | | Placa A2D2 | |
|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| <i>Testigos</i> | <i>Absorbancia</i> | <i>Testigos</i> | <i>Absorbancia</i> | <i>Testigos</i> | <i>Absorbancia</i> | <i>Testigos</i> | <i>Absorbancia</i> |
| P1 | 0.989 | P1 | 0.959 | P1 | 0.023 | P1 | 0.023 |
| N1 | 0.015 | N1 | 0.013 | N1 | 1.149 | N1 | 1.292 |
| C1 | 0.313 | C1 | 0.317 | C1 | 0.386 | C1 | 0.403 |
| C2 | 0.303 | C2 | 0.310 | C2 | 0.389 | C2 | 0.41 |
| C3 | 0.300 | C3 | 0.325 | C3 | 0.390 | C3 | 0.387 |
| SPB1 | 2.405 | SPB1 | 2.524 | SPB1 | 2.618 | SPB1 | 2.856 |
| SPB2 | 2.493 | SPB2 | 2.582 | SPB2 | 2.692 | SPB2 | 2.804 |
| SPB3 | 2.407 | SPB3 | 2.612 | SPB3 | 2.755 | SPB3 | 2.821 |
| SPA1 | 2.798 | SPA1 | 2.81 | SPA1 | 2.900 | SPA1 | 2.922 |
| SPA2 | 2.807 | SPA2 | 2.835 | SPA2 | 2.898 | SPA2 | 2.894 |
| SPA3 | 2.801 | SPA3 | 2.778 | SPA3 | 2.888 | SPA3 | 2.908 |
| SN1 | 0.25 | SN1 | 0.24 | SN1 | 0.312 | SN1 | 0.309 |
| SN2 | 0.239 | SN2 | 0.234 | SN2 | 0.316 | SN2 | 0.312 |
| SN3 | 0.232 | SN3 | 0.242 | SN3 | 0.332 | SN3 | 0.337 |
| Media | | | | | | | |
| Media | 0.305 | Media | 0.317 | Media | 0.388 | Media | 0.400 |
| Desviación | | | | | | | |
| Desviación | 0.007 | Desviación | 0.008 | Desviación | 0.002 | Desviación | 0.012 |
| CV | | | | | | | |
| CV | 2.229 | CV | 2.365 | CV | 0.536 | CV | 2.947 |
| VC | | | | | | | |
| VC | 0.305 | VC | 0.317 | VC | 0.388 | VC | 0.400 |

Tabla 61. Unidades PANBIO calculadas a partir de los registros de absorbancias.

| <i>Placa A1D1</i> | | | <i>Placa A1D2</i> | | | <i>Placa A2D1</i> | | | <i>Placa A2D2</i> | | |
|-------------------|------------------------|------------------|-------------------|------------------------|------------------|-------------------|------------------------|------------------|-------------------|------------------------|------------------|
| <i>Testigo</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> | <i>Testigo</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> | <i>Testigo</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> | <i>Testigo</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> |
| P1 | 32.391 | Positivo | P1 | 30.221 | Positivo | P1 | 0.592 | Positivo | P1 | 0.575 | Positivo |
| N1 | 0.491 | Negativo | N1 | 0.410 | Negativo | N1 | 29.588 | Negativo | N1 | 32.300 | Negativo |
| SPB1 | 78.766 | Positivo | SPB1 | 79.538 | Positivo | SPB1 | 67.416 | Positivo | SPB1 | 71.400 | Positivo |
| SPB2 | 81.648 | Positivo | SPB2 | 81.366 | Positivo | SPB2 | 69.322 | Positivo | SPB2 | 70.100 | Positivo |
| SPB3 | 78.832 | Positivo | SPB3 | 82.311 | Positivo | SPB3 | 70.944 | Positivo | SPB3 | 70.525 | Positivo |
| SPA1 | 91.638 | Positivo | SPA1 | 88.550 | Positivo | SPA1 | 74.678 | Positivo | SPA1 | 73.050 | Positivo |
| SPA2 | 91.932 | Positivo | SPA2 | 89.338 | Positivo | SPA2 | 74.627 | Positivo | SPA2 | 72.350 | Positivo |
| SPA3 | 91.736 | Positivo | SPA3 | 87.542 | Positivo | SPA3 | 74.369 | Positivo | SPA3 | 72.700 | Positivo |
| SN1 | 8.188 | Negativo | SN1 | 7.563 | Negativo | SN1 | 8.034 | Negativo | SN1 | 7.725 | Negativo |
| SN2 | 7.828 | Negativo | SN2 | 7.374 | Negativo | SN2 | 8.137 | Negativo | SN2 | 7.800 | Negativo |
| SN3 | 7.598 | Negativo | SN3 | 7.626 | Negativo | SN3 | 8.549 | Negativo | SN3 | 8.425 | Negativo |

Estabilidad analítica de la muestra

Tabla 62. Registro de absorbancias (TBB, TBA, TAB, TAA).

| Placa TBB | | Placa TBA | | Placa TAB | | Placa TAA | |
|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| <i>Testigos</i> | <i>Absorbancia</i> | <i>Testigos</i> | <i>Absorbancia</i> | <i>Testigos</i> | <i>Absorbancia</i> | <i>Testigos</i> | <i>Absorbancia</i> |
| P1 | 0.762 | P1 | 0.668 | P1 | 1.029 | P1 | 0.982 |
| N1 | 0.017 | N1 | 0.015 | N1 | 0.016 | N1 | 0.017 |
| C1 | 0.246 | C1 | 0.233 | C1 | 0.346 | C1 | 0.337 |
| C2 | 0.242 | C2 | 0.236 | C2 | 0.339 | C2 | 0.325 |
| C3 | 0.249 | C3 | 0.24 | C3 | 0.348 | C3 | 0.337 |
| SPB1 | 2.209 | SPB1 | 2.115 | SPB1 | 2.633 | SPB1 | 2.566 |
| SPB2 | 2.307 | SPB2 | 2.163 | SPB2 | 2.716 | SPB2 | 2.623 |
| SPB3 | 2.159 | SPB3 | 2.073 | SPB3 | 2.627 | SPB3 | 2.512 |
| SPA1 | 2.605 | SPA1 | 2.55 | SPA1 | 2.857 | SPA1 | 2.845 |
| SPA2 | 2.547 | SPA2 | 2.453 | SPA2 | 2.864 | SPA2 | 2.834 |
| SPA3 | 2.594 | SPA3 | 2.523 | SPA3 | 2.859 | SPA3 | 2.848 |
| SN1 | 0.192 | SN1 | 0.209 | SN1 | 0.299 | SN1 | 0.281 |
| SN2 | 0.182 | SN2 | 0.19 | SN2 | 0.299 | SN2 | 0.279 |
| SN3 | 0.186 | SN3 | 0.195 | SN3 | 0.299 | SN3 | 0.257 |
| Media | 0.246 | Media | 0.236 | Media | 0.344 | Media | 0.333 |
| Desviación | 0.004 | Desviación | 0.004 | Desviación | 0.005 | Desviación | 0.007 |
| CV | 1.430 | CV | 1.486 | CV | 1.372 | CV | 2.081 |

Tabla 63. Registro del valor de corte (V_c), del triplicado del calibrador.

| Valor de Corte | |
|----------------|-------|
| Placa | V_c |
| TBB | 0.246 |
| TBA | 0.236 |
| TAB | 0.344 |
| TAA | 0.333 |

Tabla 64. Unidades PANBIO calculadas a partir de los registros de absorbancias de (TBB, TBA, TAB, TAA).

| Placa TBB | | | Placa TBA | | |
|-----------|-----------------|-----------|-----------|-----------------|-----------|
| Testigo | Unidades Panbio | Resultado | Testigo | Unidades Panbio | Resultado |
| P1 | 31.018 | Positivo | P1 | 28.265 | Positivo |
| N1 | 0.692 | Negativo | N1 | 0.635 | Negativo |
| SPB1 | 89.919 | Positivo | SPB1 | 89.492 | Positivo |
| SPB2 | 93.908 | Positivo | SPB2 | 91.523 | Positivo |
| SPB3 | 87.883 | Positivo | SPB3 | 87.715 | Positivo |
| SPA1 | 106.038 | Positivo | SPA1 | 107.898 | Positivo |
| SPA2 | 103.677 | Positivo | SPA2 | 103.794 | Positivo |
| SPA3 | 105.590 | Positivo | SPA3 | 106.756 | Positivo |
| SN1 | 7.815 | Negativo | SN1 | 8.843 | Negativo |
| SN2 | 7.408 | Negativo | SN2 | 8.039 | Negativo |
| SN3 | 7.571 | Negativo | SN3 | 8.251 | Negativo |
| Placa TAB | | | Placa TAA | | |
| Testigo | Unidades Panbio | Resultado | Testigo | Unidades Panbio | Resultado |
| P1 | 29.884 | Positivo | P1 | 29.489 | Positivo |
| N1 | 0.465 | Negativo | N1 | 0.511 | Negativo |
| SPB1 | 76.467 | Positivo | SPB1 | 77.057 | Positivo |
| SPB2 | 78.877 | Positivo | SPB2 | 78.769 | Positivo |
| SPB3 | 76.292 | Positivo | SPB3 | 75.435 | Positivo |
| SPA1 | 82.972 | Positivo | SPA1 | 85.435 | Positivo |
| SPA2 | 83.175 | Positivo | SPA2 | 85.105 | Positivo |
| SPA3 | 83.030 | Positivo | SPA3 | 85.526 | Positivo |
| SN1 | 8.683 | Negativo | SN1 | 8.438 | Negativo |
| SN2 | 8.683 | Negativo | SN2 | 8.378 | Negativo |
| SN3 | 8.683 | Negativo | SN3 | 7.718 | Negativo |

Estabilidad de la muestra

Tabla 65. Registro de absorancias (CEo, CE1, CE2, CE3, CE4).

| Placa CEo | | Placa CE1 | | Placa CE2 | | Placa CE3 | | Placa CE4 | |
|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| <i>Test/Mtas</i> | <i>Absorbancia</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Absorbancia</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Absorbancia</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Absorbancia</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Absorbancia</i> |
| P1 | 1.015 | P1 | 0.714 | P1 | 0.72 | P1 | 0.961 | P1 | 0.903 |
| N1 | 0.016 | N1 | 0.016 | N1 | 0.016 | N1 | 0.014 | N1 | 0.016 |
| CAL1 | 0.319 | CAL1 | 0.223 | CAL1 | 0.216 | CAL1 | 0.305 | CAL1 | 0.285 |
| CAL2 | 0.3 | CAL2 | 0.221 | CAL2 | 0.212 | CAL2 | 0.299 | CAL2 | 0.285 |
| CAL3 | 0.324 | CAL3 | 0.227 | CAL3 | 0.216 | CAL3 | 0.29 | CAL3 | 0.298 |
| SNBCEo-1 | 2.654 | SNBCE1-1 | 2.18 | SNBCE2-1 | 2.225 | SNBCE3-1 | 2.63 | SNBCE4-1 | 2.576 |
| SNBCEo-2 | 2.737 | SNBCE1-2 | 2.296 | SNBCE2-2 | 2.357 | SNBCE3-2 | 2.704 | SNBCE4-2 | 2.655 |
| SNBCEo-3 | 2.66 | SNBCE1-3 | 2.275 | SNBCE2-3 | 2.331 | SNBCE3-3 | 2.654 | SNBCE4-3 | 2.629 |
| SNACEo-1 | 2.819 | SNACE1-1 | 2.521 | SNACE2-1 | 2.547 | SNACE3-1 | 2.763 | SNACE4-1 | 2.76 |
| SNACEo-2 | 2.816 | SNACE1-2 | 2.451 | SNACE2-2 | 2.472 | SNACE3-2 | 2.826 | SNACE4-2 | 2.812 |
| SNACEo-3 | 2.824 | SNACE1-3 | 2.489 | SNACE2-3 | 2.526 | SNACE3-3 | 2.762 | SNACE4-3 | 2.763 |
| SNCEo-1 | 0.274 | SNCE1-1 | 0.164 | SNCE2-1 | 0.172 | SNCE3-1 | 0.25 | SNCE4-1 | 0.229 |
| SNCEo-2 | 0.275 | SNCE1-2 | 0.16 | SNCE2-2 | 0.163 | SNCE3-2 | 0.223 | SNCE4-2 | 0.228 |
| SNCEo-3 | 0.321 | SNCE1-3 | 0.165 | SNCE2-3 | 0.177 | SNCE3-3 | 0.255 | SNCE4-3 | 0.231 |
| Media | 0.314 | Media | 0.224 | Media | 0.215 | Media | 0.298 | Media | 0.289 |
| Desviación | 0.013 | Desviación | 0.003 | Desviación | 0.002 | Desviación | 0.008 | Desviación | 0.008 |
| CV | 4.028 | CV | 1.366 | CV | 1.076 | CV | 2.534 | CV | 2.594 |
| VC | 0.314 | VC | 0.224 | VC | 0.215 | VC | 0.298 | VC | 0.289 |

Tabla 66. Unidades Panbio de (CEo, CE1, CE2, CE3, CE4).

| Placa CEo | | | Placa CE1 | | | Placa CE2 | | |
|------------------|------------------------|------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------|------------------------|------------------|
| <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> |
| P1 | 32.291 | Positivo | P1 | 31.923 | Positivo | P1 | 33.540 | Positivo |
| N1 | 0.509 | Negativo | N1 | 0.715 | Negativo | N1 | 0.745 | Negativo |
| SNBCEo-1 | 84.433 | Positivo | SNBCE1-1 | 97.466 | Positivo | SNBCE2-1 | 103.649 | Positivo |
| SNBCEo-2 | 87.073 | Positivo | SNBCE1-2 | 102.653 | Positivo | SNBCE2-2 | 109.798 | Positivo |
| SNBCEo-3 | 84.624 | Positivo | SNBCE1-3 | 101.714 | Positivo | SNBCE2-3 | 108.587 | Positivo |
| SNACEo-1 | 89.682 | Positivo | SNACE1-1 | 112.712 | Positivo | SNACE2-1 | 118.649 | Positivo |
| SNACEo-2 | 89.586 | Positivo | SNACE1-2 | 109.583 | Positivo | SNACE2-2 | 115.155 | Positivo |
| SNACEo-3 | 89.841 | Positivo | SNACE1-3 | 111.282 | Positivo | SNACE2-3 | 117.671 | Positivo |
| SNCEo-1 | 8.717 | Negativo | SNCE1-1 | 7.332 | Negativo | SNCE2-1 | 8.012 | Negativo |
| SNCEo-2 | 8.749 | Negativo | SNCE1-2 | 7.154 | Negativo | SNCE2-2 | 7.593 | Negativo |
| SNCEo-3 | 10.212 | Negativo | SNCE1-3 | 7.377 | Negativo | SNCE2-3 | 8.245 | Negativo |
| Placa CE3 | | | | | | Placa CE4 | | |
| <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> | | | | <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> |
| P1 | 32.248 | Positivo | | | | P1 | 31.210 | Positivo |
| N1 | 0.470 | Negativo | | | | N1 | 0.553 | Negativo |
| SNBCE3-1 | 88.255 | Positivo | | | | SNBCE4-1 | 89.032 | Positivo |
| SNBCE3-2 | 90.738 | Positivo | | | | SNBCE4-2 | 91.763 | Positivo |
| SNBCE3-3 | 89.060 | Positivo | | | | SNBCE4-3 | 90.864 | Positivo |
| SNACE3-1 | 92.718 | Positivo | | | | SNACE4-1 | 95.392 | Positivo |
| SNACE3-2 | 94.832 | Positivo | | | | SNACE4-2 | 97.189 | Positivo |
| SNACE3-3 | 92.685 | Positivo | | | | SNACE4-3 | 95.495 | Positivo |
| SNCE3-1 | 8.389 | Negativo | | | | SNCE4-1 | 7.915 | Negativo |
| SNCE3-2 | 7.483 | Negativo | | | | SNCE4-2 | 7.880 | Negativo |
| SNCE3-3 | 8.557 | Negativo | | | | SNCE4-3 | 7.984 | Negativo |

Tolerancia

Tabla 68. Registros de absorbancia de cada placa de cada tratamiento.

| Placa T₁ | | Placa T₂ | | Placa T₃ | | Placa T₄ | |
|----------------------------|--------------|----------------------------|--------------|----------------------------|--------------|----------------------------|--------------|
| <i>Test/Mtas</i> | <i>Abs</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Abs</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Abs</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Abs</i> |
| P1 | 0.81 | P1 | 0.779 | P1 | 0.95 | P1 | 1.125 |
| N1 | 0.018 | N1 | 0.021 | N1 | 0.019 | N1 | 0.046 |
| CAL1 | 0.261 | CAL1 | 0.283 | CAL1 | 0.289 | CAL1 | 0.385 |
| CAL2 | 0.274 | CAL2 | 0.283 | CAL2 | 0.265 | CAL2 | 0.38 |
| CAL3 | 0.28 | CAL3 | 0.278 | CAL3 | 0.303 | CAL3 | 0.384 |
| SPB1 | 2.435 | SPB1 | 2.421 | SPB1 | 2.615 | SPB1 | 2.715 |
| SPB2 | 2.52 | SPB2 | 2.448 | SPB2 | 2.522 | SPB2 | 2.759 |
| SPB3 | 2.544 | SPB3 | 2.463 | SPB3 | 2.66 | SPB3 | 2.741 |
| SPA1 | 2.774 | SPA1 | 2.701 | SPA1 | 2.814 | SPA1 | 2.87 |
| SPA2 | 2.763 | SPA2 | 2.742 | SPA2 | 2.773 | SPA2 | 2.863 |
| SPA3 | 2.792 | SPA3 | 2.795 | SPA3 | 2.757 | SPA3 | 2.874 |
| SN1 | 0.211 | SN1 | 0.212 | SN1 | 0.23 | SN1 | 0.309 |
| SN2 | 0.208 | SN2 | 0.206 | SN2 | 0.211 | SN2 | 0.301 |
| SN3 | 0.208 | SN3 | 0.213 | SN3 | 0.227 | SN3 | 0.292 |
| | | | | | | | |
| Media | 0.272 | Media | 0.281 | Media | 0.286 | Media | 0.383 |
| Desviación | 0.010 | Desviación | 0.003 | Desviación | 0.019 | Desviación | 0.003 |
| CV | 3.575 | CV | 1.026 | CV | 6.727 | CV | 0.691 |
| | | | | | | | |
| VC | 0.272 | VC | 0.281 | VC | 0.286 | VC | 0.383 |

Tabla 69. Registro de unidades Panbio para cada uno de los tratamientos.

| Placa T1 | | | Placa T2 | | |
|------------------|------------------------|------------------|------------------|------------------------|------------------|
| <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> |
| P1 | 29.816 | Positivo | P1 | 27.690 | Positivo |
| N1 | 0.663 | Negativo | N1 | 0.746 | Negativo |
| SPB1 | 89.632 | Positivo | SPB1 | 86.055 | Positivo |
| SPB2 | 92.761 | Positivo | SPB2 | 87.014 | Positivo |
| SPB3 | 93.644 | Positivo | SPB3 | 87.547 | Positivo |
| SPA1 | 102.110 | Positivo | SPA1 | 96.007 | Positivo |
| SPA2 | 101.706 | Positivo | SPA2 | 97.464 | Positivo |
| SPA3 | 102.773 | Positivo | SPA3 | 99.348 | Positivo |
| SN1 | 7.767 | Negativo | SN1 | 7.536 | Negativo |
| SN2 | 7.656 | Negativo | SN2 | 7.322 | Negativo |
| SN3 | 7.656 | Negativo | SN3 | 7.571 | Negativo |
| Placa T3 | | | Placa T4 | | |
| <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> |
| P1 | 33.256 | Positivo | P1 | 29.373 | Positivo |
| N1 | 0.665 | Negativo | N1 | 1.201 | Negativo |
| SPB1 | 91.540 | Positivo | SPB1 | 70.888 | Positivo |
| SPB2 | 88.285 | Positivo | SPB2 | 72.037 | Positivo |
| SPB3 | 93.116 | Positivo | SPB3 | 71.567 | Positivo |
| SPA1 | 98.506 | Positivo | SPA1 | 74.935 | Positivo |
| SPA2 | 97.071 | Positivo | SPA2 | 74.752 | Positivo |
| SPA3 | 96.511 | Positivo | SPA3 | 75.039 | Positivo |
| SN1 | 8.051 | Negativo | SN1 | 8.068 | Negativo |
| SN2 | 7.386 | Negativo | SN2 | 7.859 | Negativo |
| SN3 | 7.946 | Negativo | SN3 | 7.624 | Negativo |

Robustez

Tabla 72. Registros de absorbancia de cada tratamiento.

| Placa 1 | | Placa 2 | | Placa 3 | | Placa 4 | | Placa 5 | | Placa 6 | | Placa 7 | | Placa 8 | |
|-------------------|--------------|-------------------|--------------|-------------------|--------------|-------------------|--------------|-------------------|--------------|-------------------|--------------|-------------------|--------------|-------------------|--------------|
| <i>Test/Mtas</i> | <i>Abs</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Abs</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Abs</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Abs</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Abs</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Abs</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Abs</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Abs</i> |
| P1 | 0.77 | P1 | 0.927 | P1 | 0.766 | P1 | 0.692 | P1 | 0.9 | P1 | 1.212 | P1 | 1.056 | P1 | 0.733 |
| N1 | 0.016 | N1 | 0.023 | N1 | 0.014 | N1 | 0.015 | N1 | 0.015 | N1 | 0.02 | N1 | 0.015 | N1 | 0.035 |
| CAL1 | 0.212 | CAL1 | 0.271 | CAL1 | 0.265 | CAL1 | 0.206 | CAL1 | 0.29 | CAL1 | 0.38 | CAL1 | 0.358 | CAL1 | 0.26 |
| CAL2 | 0.216 | CAL2 | 0.263 | CAL2 | 0.26 | CAL2 | 0.201 | CAL2 | 0.291 | CAL2 | 0.366 | CAL2 | 0.354 | CAL2 | 0.26 |
| CAL3 | 0.23 | CAL3 | 0.267 | CAL3 | 0.251 | CAL3 | 0.213 | CAL3 | 0.282 | CAL3 | 0.362 | CAL3 | 0.361 | CAL3 | 0.253 |
| SPB1 | 2.285 | SPB1 | 2.519 | SPB1 | 1.972 | SPB1 | 2.03 | SPB1 | 2.738 | SPB1 | 2.772 | SPB1 | 2.752 | SPB1 | 2.542 |
| SPB2 | 2.406 | SPB2 | 2.56 | SPB2 | 2.633 | SPB2 | 2.221 | SPB2 | 2.586 | SPB2 | 2.825 | SPB2 | 2.782 | SPB2 | 2.4 |
| SPB3 | 2.368 | SPB3 | 2.599 | SPB3 | 2.615 | SPB3 | 2.15 | SPB3 | 2.64 | SPB3 | 2.687 | SPB3 | 2.732 | SPB3 | 2.513 |
| SPA1 | 2.619 | SPA1 | 2.798 | SPA1 | 2.861 | SPA1 | 2.391 | SPA1 | 2.826 | SPA1 | 2.88 | SPA1 | 2.872 | SPA1 | 2.773 |
| SPA2 | 2.541 | SPA2 | 2.797 | SPA2 | 2.817 | SPA2 | 2.434 | SPA2 | 2.784 | SPA2 | 2.87 | SPA2 | 2.876 | SPA2 | 2.755 |
| SPA3 | 2.65 | SPA3 | 2.775 | SPA3 | 2.831 | SPA3 | 2.346 | SPA3 | 2.826 | SPA3 | 2.862 | SPA3 | 2.891 | SPA3 | 2.755 |
| SN1 | 0.201 | SN1 | 0.003 | SN1 | 0.201 | SN1 | 0.196 | SN1 | 0.208 | SN1 | 0.309 | SN1 | 0.258 | SN1 | 0.212 |
| SN2 | 0.178 | SN2 | 0.216 | SN2 | 0.191 | SN2 | 0.241 | SN2 | 0.222 | SN2 | 0.313 | SN2 | 0.246 | SN2 | 0.192 |
| SN3 | 0.185 | SN3 | 0.236 | SN3 | 0.217 | SN3 | 0.218 | SN3 | 0.216 | SN3 | 0.317 | SN3 | 0.261 | SN3 | 0.179 |
| Media | 0.219 | Media | 0.267 | Media | 0.259 | Media | 0.207 | Media | 0.288 | Media | 0.369 | Media | 0.358 | Media | 0.258 |
| Desviación | 0.009 | Desviación | 0.004 | Desviación | 0.007 | Desviación | 0.006 | Desviación | 0.005 | Desviación | 0.009 | Desviación | 0.004 | Desviación | 0.004 |
| CV | 4.309 | CV | 1.498 | CV | 2.743 | CV | 2.917 | CV | 1.715 | CV | 2.559 | CV | 0.982 | CV | 1.568 |
| VC | 0.219 | VC | 0.267 | VC | 0.259 | VC | 0.207 | VC | 0.288 | VC | 0.369 | VC | 0.358 | VC | 0.258 |

Tabla 73. Unidades Panbio para cada placa de tratamiento.

| Placa 1 | | | Placa 2 | | | Placa 3 | | | Placa 4 | | |
|------------------|------------------------|------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------|------------------------|------------------|
| <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> |
| P1 | 35.106 | Positivo | P1 | 34.719 | Positivo | P1 | 29.613 | Positivo | P1 | 33.484 | Positivo |
| N1 | 0.729 | Negativo | N1 | 0.861 | Negativo | N1 | 0.541 | Negativo | N1 | 0.726 | Negativo |
| SPB1 | 104.179 | Positivo | SPB1 | 94.345 | Positivo | SPB1 | 76.237 | Positivo | SPB1 | 98.226 | Positivo |
| SPB2 | 109.696 | Positivo | SPB2 | 95.880 | Positivo | SPB2 | 101.791 | Positivo | SPB2 | 107.468 | Positivo |
| SPB3 | 107.964 | Positivo | SPB3 | 97.341 | Positivo | SPB3 | 101.095 | Positivo | SPB3 | 104.032 | Positivo |
| SPA1 | 119.407 | Positivo | SPA1 | 104.794 | Positivo | SPA1 | 110.606 | Positivo | SPA1 | 115.694 | Positivo |
| SPA2 | 115.851 | Positivo | SPA2 | 104.757 | Positivo | SPA2 | 108.905 | Positivo | SPA2 | 117.774 | Positivo |
| SPA3 | 120.821 | Positivo | SPA3 | 103.933 | Positivo | SPA3 | 109.446 | Positivo | SPA3 | 113.516 | Positivo |
| SN1 | 9.164 | Negativo | SN1 | 0.112 | Negativo | SN1 | 7.771 | Negativo | SN1 | 9.484 | Negativo |
| SN2 | 8.116 | Negativo | SN2 | 8.090 | Negativo | SN2 | 7.384 | Negativo | SN2 | 11.661 | Negativo |
| SN3 | 8.435 | Negativo | SN3 | 8.839 | Negativo | SN3 | 8.389 | Negativo | SN3 | 10.548 | Negativo |
| Placa 5 | | | Placa 6 | | | Placa 7 | | | Placa 8 | | |
| <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> | <i>Test/Mtas</i> | <i>Unidades Panbio</i> | <i>Resultado</i> |
| P1 | 31.286 | Positivo | P1 | 32.816 | Positivo | P1 | 29.525 | Positivo | P1 | 28.448 | Positivo |
| N1 | 0.521 | Negativo | N1 | 0.542 | Negativo | N1 | 0.419 | Negativo | N1 | 1.358 | Negativo |
| SPB1 | 95.180 | Positivo | SPB1 | 75.054 | Positivo | SPB1 | 76.943 | Positivo | SPB1 | 98.655 | Positivo |
| SPB2 | 89.896 | Positivo | SPB2 | 76.489 | Positivo | SPB2 | 77.782 | Positivo | SPB2 | 93.144 | Positivo |
| SPB3 | 91.773 | Positivo | SPB3 | 72.753 | Positivo | SPB3 | 76.384 | Positivo | SPB3 | 97.529 | Positivo |
| SPA1 | 98.239 | Positivo | SPA1 | 77.978 | Positivo | SPA1 | 80.298 | Positivo | SPA1 | 107.620 | Positivo |
| SPA2 | 96.779 | Positivo | SPA2 | 77.708 | Positivo | SPA2 | 80.410 | Positivo | SPA2 | 106.921 | Positivo |
| SPA3 | 98.239 | Positivo | SPA3 | 77.491 | Positivo | SPA3 | 80.829 | Positivo | SPA3 | 106.921 | Positivo |
| SN1 | 7.231 | Negativo | SN1 | 8.366 | Negativo | SN1 | 7.213 | Negativo | SN1 | 8.228 | Negativo |
| SN2 | 7.717 | Negativo | SN2 | 8.475 | Negativo | SN2 | 6.878 | Negativo | SN2 | 7.451 | Negativo |
| SN3 | 7.509 | Negativo | SN3 | 8.583 | Negativo | SN3 | 7.297 | Negativo | SN3 | 6.947 | Negativo |

13.5 Protocolos (hojas frontales)

13.5.1 ELISA NS1



2710-22-48

PROTOCOLO PARA LA EVALUACIÓN Y COMPROBACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETECCIÓN DEL ANTÍGENO NS1 DEL VIRUS DEL DENGUE EN SUERO HUMANO POR EL MÉTODO INMUNOENZIMÁTICO (PANBIO)

Autorización



Dra. Clara Esperanza Santacruz Tinoco
Jefe de Área del Laboratorio Central de Epidemiología
División de Laboratorios de Vigilancia e Investigación Epidemiológica
Coordinación de Vigilancia Epidemiológica



| LCE | | |
|--|--|--------------------|
| <p>PROTOKOLO PARA LA EVALUACIÓN Y COMPROBACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETECCIÓN DEL ANTÍGENO NS1 DEL VIRUS DEL DENGUE EN SUERO HUMANO POR EL MÉTODO INMUNOENZIMÁTICO (PANBIO)</p> | | |
| <p>CLAVE: 2710-22-48</p> | <p>Fecha de emisión: 07 de Marzo de 2013</p> | |
| | <p>Autoridad emisora: QFB Bernardo Martínez Miguel Coordinador del Área de Enfermedades Trasmisibles del LCE</p> | |
| | <table border="1"> <tr> <td>No. Páginas: 61</td> <td>Versión No. 00</td> </tr> </table> | No. Páginas: 61 |
| No. Páginas: 61 | Versión No. 00 | |
| <p>Elaboró:  M. en C. Andrés Sánchez Orozco Responsable del Diagnóstico</p> | | |
| <p>Revisó:  M. en C. Yu-Mei Anguiano Hernández Coordinador del Área de Sistemas de Gestión del LCE</p> | | |
| <p>Aprobó:  Dra. Clara Esperanza Santacruz Tinoco Jefe de Área del Laboratorio Central de Epidemiología</p> | | |
| <p>Fecha: 05 de Marzo de 2013</p> | <p>Fecha: 05 de Marzo de 2013</p> | |

13.5.2 ELISA IgM



2710-22-50

**PROTOCOLO PARA LA EVALUACIÓN Y COMPROBACIÓN DEL MÉTODO
ANALÍTICO PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IgM CONTRA EL
VIRUS DEL DENGUE POR ELISA DE CAPTURA (PANBIO)**

Autorización

Dra. Clara Esperanza Santacruz Tinoco
Jefe de Área del Laboratorio Central de Epidemiología
División de Laboratorios de Vigilancia e Investigación Epidemiológica
Coordinación de Vigilancia Epidemiológica



| | |
|---|---|
| LCE | |
| PROTOCOLO PARA LA EVALUACIÓN Y COMPROBACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IgM CONTRA EL VIRUS DEL DENGUE POR ELISA DE CAPTURA (PANBIO) | |
| Clave 2710-22-50 | Fecha de emisión: 07 de Marzo de 2013 |
| | Autoridad emisora: QFB Bernardo Martínez Miguel Coordinador del Área de Enfermedades Transmisibles del LCE |
| | No. Páginas: 68 |
| | Versión No. 00 |
| Elaboró:  M. en C. Andrés Sánchez Orozco Responsable del Diagnóstico | |
| Revisó:  M. en C. Yu-Mei Anguiano Hernández Coordinador del Área de Sistemas de Gestión del LCE | Aprobó:  Dra. Clara Esperanza Santacruz Tinoco Jefe de Área del Laboratorio Central de Epidemiología |
| Fecha: 05 de Marzo de 2013 | Fecha: 05 de Marzo de 2013 |

13.5.3 ELISA IgG



2710-22-51

PROTOCOLO PARA LA EVALUACIÓN Y COMPROBACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IgG CONTRA EL VIRUS DEL DENGUE POR ELISA DE CAPTURA (PANBIO)

Autorización

Dra. Clara Esperanza Santacruz Tinoco
Jefe de Área del Laboratorio Central de Epidemiología
División de Laboratorios de Vigilancia e Investigación Epidemiológica
Coordinación de Vigilancia Epidemiológica



| LCE | |
|---|--|
| PROTOCOLO PARA LA EVALUACIÓN Y COMPROBACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IgG CONTRA EL VIRUS DEL DENGUE POR ELISA DE CAPTURA (PANBIO) | |
| CLAVE: 2710-22-51 | Fecha de emisión: 07 de Marzo de 2013 |
| | Autoridad emisora: QFB Bernardo Martínez Miguel Coordinador del Área de Enfermedades Transmisibles del LCE |
| | No. Páginas: 70 Versión No. 00 |
| Elaboró: M. en C. Andrés Sánchez Orozco Responsable del Diagnóstico | |
| Revisó: M. en C. Yu-Mei Anguiano Hernández Coordinador del Área de Sistemas de Gestión del LCE | Aprobó: Dra. Clara Esperanza Santacruz Tinoco Jefe de Área del Laboratorio Central de Epidemiología |
| Fecha: 05 de Marzo de 2013 | Fecha: 05 de Marzo de 2013 |