



---

---

**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



**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 NS<sub>1</sub>, 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 NS<sub>1</sub>, 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

<b>1</b>	<b>ACRONIMOS.....</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>INTRODUCCION.....</b>	<b>8</b>
<b>3</b>	<b>ANTECEDENTES.....</b>	<b>12</b>
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>
<b>4</b>	<b>JUSTIFICACION.....</b>	<b>43</b>
<b>5</b>	<b>HIPOTESIS.....</b>	<b>44</b>
<b>6</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>44</b>
6.1	OBJETIVO GENERAL .....	44
6.2	OBJETIVOS PARTICULARES.....	44
<b>7</b>	<b>ESTRATEGIA GENERAL DE TRABAJO.....</b>	<b>45</b>
<b>8</b>	<b>MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>46</b>
<b>9</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
9.1	ELISA NS <sub>1</sub> .....	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
<b>10</b>	<b>DISCUSION</b> .....	<b>80</b>
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
<b>11</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>85</b>
<b>12</b>	<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>86</b>
<b>13</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>89</b>
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 <sub>1</sub>	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  $\geq 8$  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 (NS<sub>1</sub>, 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 NS<sub>1</sub> 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).

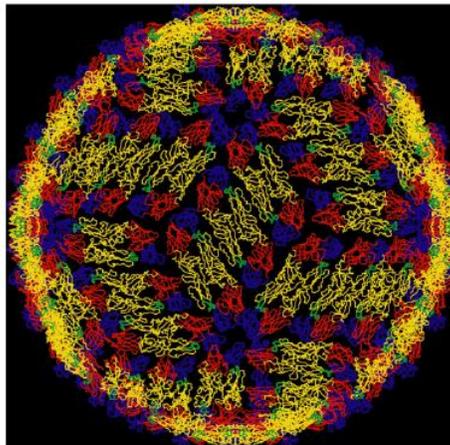
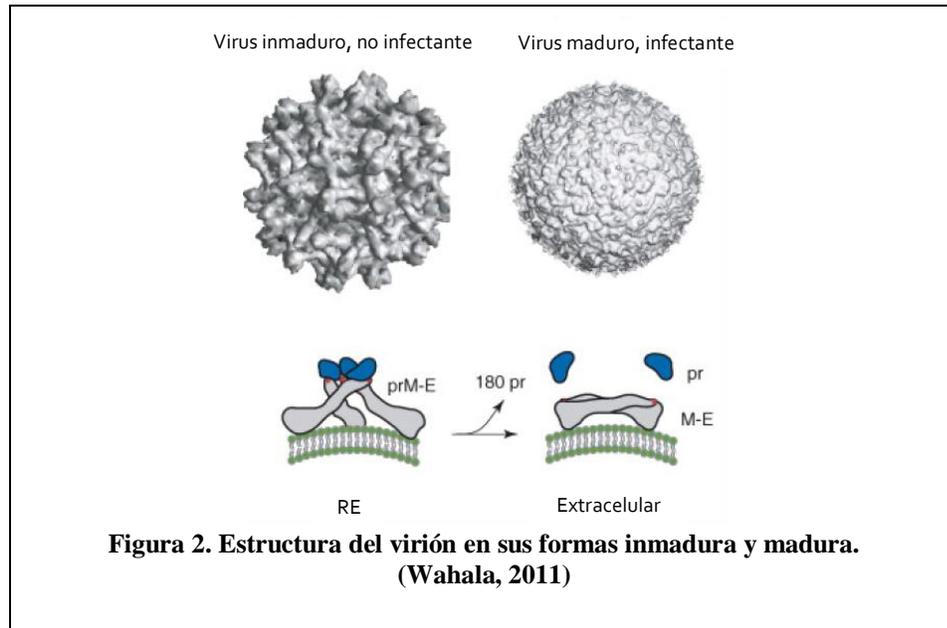


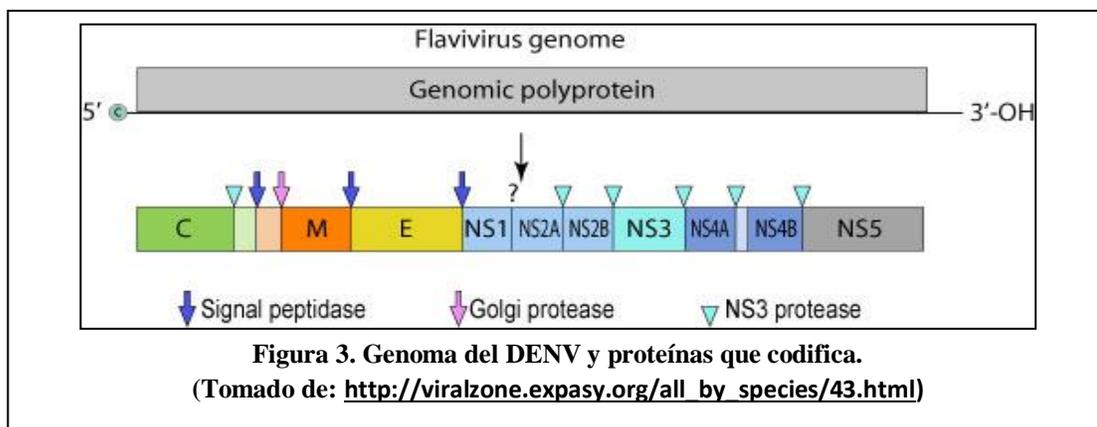
Figura 1. Estructura del virión del DENV.

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.

- NS<sub>2</sub>A: 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.
- NS<sub>2</sub>B: es un cofactor requerido para la actividad proteolítica de la proteasa de la proteína NS<sub>3</sub>. Es igualmente del tipo hidrofóbico y de tamaño pequeño. Tiene un dominio central hidrofílico unido por segmentos hidrofóbicos (Beasley & Barret, 2008).
- NS<sub>3</sub>: 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 NS<sub>2</sub>B 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.
- NS<sub>4</sub>A: es también una proteína pequeña e hidrofóbica. Se le ha hallado asociada a las proteínas NS<sub>3</sub>/NS<sub>5</sub> y al RNA viral en su forma replicativa de doble cadena, influyendo significativamente en la replicación del RNA viral, anclando el complejo de replicación.
- NS<sub>4</sub>B: ha sido identificada en asociación con membranas citoplasmáticas e involucrada con la replicación viral. Funciona como un antagonista del interferón.
- NS<sub>5</sub>: 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 NS<sub>2</sub>A, NS<sub>2</sub>B Y NS<sub>4</sub>A, 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.**

<b>Indicador</b>	<b>2011</b>	<b>2012</b>
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.**

<b>Entidad</b>	<b>2011</b>		<b>Entidad</b>	<b>2012</b>	
	<b>Casos confirmados</b>	<b>Porcentaje</b>		<b>Casos confirmados</b>	<b>Porcentaje</b>
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.**

<b>2011</b>				<b>2012</b>			
<b>FD</b>		<b>FHD</b>		<b>FD</b>		<b>FHD</b>	
<b>Entidad</b>	<b>Número de casos</b>						
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>						
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 mL<sup>3</sup> 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 mL<sup>3</sup>

**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 NS<sub>1</sub>, para FHD se seleccionará el 100% de las muestras positivas a NS<sub>1</sub>, 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 NS<sub>1</sub>), que les serán solicitadas dos semanas después a la recepción de la base nominal. (InDRE, 2008)

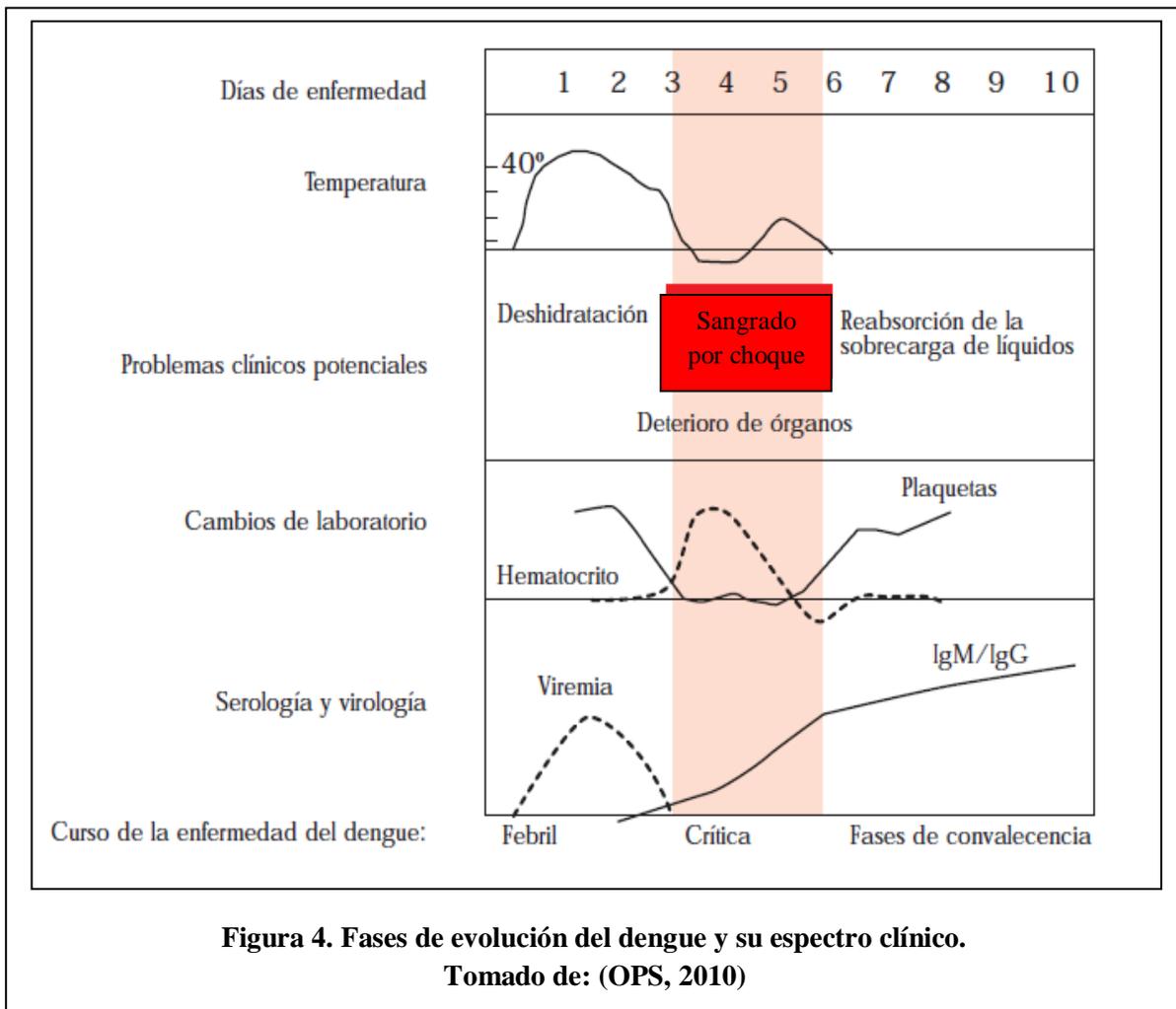
## 3.5 Características clínicas de la enfermedad

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**

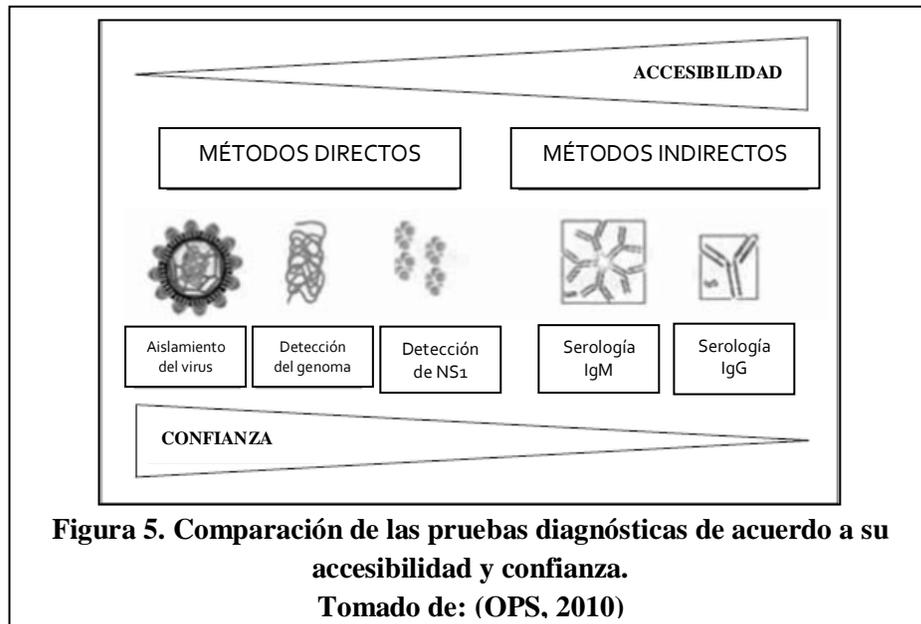
Poder realizar un diagnóstico oportuno y eficaz del dengue es de suma importancia para la atención clínica, pues implica la detección temprana de casos graves, la confirmación de casos y el diagnóstico diferencial con otros padecimientos infecciosos, actividades de vigilancia y control de brotes.

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 NS<sub>1</sub>, reside en que se buscaban técnicas diferentes a la búsqueda de anticuerpos en la fase aguda de la enfermedad. La glicoproteína NS<sub>1</sub> 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 NS<sub>1</sub> 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 NS<sub>1</sub>, 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 NS<sub>1</sub>, 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 NS<sub>1</sub> 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 NS<sub>1</sub>, 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 NS<sub>1</sub> se conformó de la selección de 355 muestras positivas a NS<sub>1</sub> 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 NS<sub>1</sub>, 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 (H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>), 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 NS<sub>1</sub>, 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 NS<sub>1</sub> (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 NS<sub>1</sub>

El protocolo de ELISA NS<sub>1</sub> 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 NS<sub>1</sub> 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 NS<sub>1</sub>). 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			
	$\chi^2$	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

### 9.1.2 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	<b>15</b>
Negativo	0	15	<b>15</b>
Total	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>

<b>Sensibilidad</b>	<b>S=1</b>
<b>Especificidad</b>	<b>E=1</b>

### 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 NS<sub>1</sub> 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:

- ❖ CE<sub>0</sub>: determinación al momento de obtener la muestra.
- ❖ CE<sub>1</sub>: muestras almacenadas por 24 horas de 2 a 8 °C.
- ❖ CE<sub>2</sub>: muestras almacenadas por 48 horas en congelación (-20 °C o menos).
- ❖ CE<sub>3</sub>: muestras almacenadas en hielo por 60 minutos.
- ❖ CE<sub>4</sub>: 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 CE<sub>0</sub> y CE<sub>1</sub>.
  - ❖  $UP_{SPB} > 11$  en las en las placas CE<sub>0</sub> y CE<sub>1</sub>.
  - ❖  $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 11$  en las placas CE<sub>0</sub> y CE<sub>1</sub>.
- Estabilidad de la muestra almacenada por 48 horas en congelación (-20 °C o menos).
  - ❖  $UP_{SN} < 9$  en las placas CE<sub>0</sub> y CE<sub>2</sub>.
  - ❖  $UP_{SPB} > 11$  en las en las placas CE<sub>0</sub> y CE<sub>2</sub>.
  - ❖  $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 11$  en las placas CE<sub>0</sub> y CE<sub>2</sub>.
- Estabilidad de la muestra almacenada en hielo por 60 minutos.

- ❖  $UP_{SN} < 9$  en las placas CEo y CE<sub>3</sub>.
  - ❖  $UP_{SPB} > 11$  en las en las placas CEo y CE<sub>3</sub>.
  - ❖  $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 11$  en las placas CEo y CE<sub>3</sub>.
- Estabilidad de la muestra almacenada a la condición de mesa de laboratorio por 60 minutos.
    - ❖  $UP_{SN} < 9$  en las placas CEo y CE<sub>4</sub>.
    - ❖  $UP_{SPB} > 11$  en las en las placas CEo y CE<sub>4</sub>.
    - ❖  $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 11$  en las placas CEo y CE<sub>4</sub>.

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 NS<sub>1</sub> 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 NS<sub>1</sub> 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 NS<sub>1</sub> MAb conjugado con HRP del propio equipo para el diagnóstico (T<sub>1</sub>).
- Lote del cromógeno TMB de otro equipo de diagnóstico y lote del anticuerpo monoclonal Anti NS<sub>1</sub> MAb conjugado con HRP del propio equipo diagnóstico (T<sub>2</sub>).
- Lote del cromógeno TMB del propio equipo diagnóstico y del anticuerpo monoclonal Anti NS<sub>1</sub> MAb conjugado con HRP de otro equipo de diagnóstico (T<sub>3</sub>).

**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 T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub>.
  - ❖  $UP_{SPB} > 11$  para los tratamientos T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub>.
  - ❖  $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 11$  para los tratamientos T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub>.
  
- Tolerancia para el lote del Anticuerpo monoclonal Anti NS<sub>1</sub> MAb conjugado con HRP.
  - ❖  $UP_{SN} < 9$  para los tratamientos T<sub>1</sub> y T<sub>3</sub>.
  - ❖  $UP_{SPB} > 11$  para los tratamientos T<sub>1</sub> y T<sub>3</sub>.
  - ❖  $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 11$  para los tratamientos T<sub>1</sub> y T<sub>3</sub>.

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-NS<sub>1</sub> 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-NS<sub>1</sub> 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			
	$\chi^2$	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

### 9.2.2 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 especificidad 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 (T<sub>1</sub>).
- Lote del cromógeno TMB de otro equipo diagnóstico y del antígeno y AcMo (trazador) del propio equipo (T<sub>2</sub>).
- Lote del cromógeno TMB del propio equipo diagnóstico, del antígeno de otro equipo para el diagnóstico y del AcMo (trazador) del propio equipo (T<sub>3</sub>).
- Lote del cromógeno TMB del propio equipo diagnóstico, y del antígeno y del AcMo de otro equipo diagnóstico (T<sub>4</sub>).

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 T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub>.
  - ❖  $UP_{SNB} > 11$  para los tratamientos T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub>.
  - ❖  $UP_{SNA} > UP_{SNB} > 11$  para los tratamientos T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub>.
- Tolerancia para el lote de antígeno.
  - ❖  $UP_{SN} < 9$  para los tratamientos T<sub>1</sub> y T<sub>3</sub>.
  - ❖  $UP_{SNB} > 11$  para los tratamientos T<sub>1</sub> y T<sub>3</sub>.
  - ❖  $UP_{SNA} > UP_{SNB} > 11$  para los tratamientos T<sub>1</sub> y T<sub>3</sub>.
- Tolerancia para el lote del AcMo (trazador).
  - ❖  $UP_{SN} < 9$  para los tratamientos T<sub>1</sub> y T<sub>4</sub>.
  - ❖  $UP_{SNB} > 11$  para los tratamientos T<sub>1</sub> y T<sub>4</sub>.
  - ❖  $UP_{SNA} > UP_{SNB} > 11$  para los tratamientos T<sub>1</sub> y T<sub>4</sub>.

**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  $\chi^2$  de independencia de Pearson y medida de asociación de Spearman ( $r^2$ )

Prueba de independencia entre orden de concentración y orden de respuesta			
	$\chi^2$	$Pr\chi^2$	$r^2$
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

<b>Sensibilidad</b>	$S = a / (a+c)$	<b>S=1</b>
<b>Especificidad</b>	$E = d / (b+d)$	<b>E=1</b>

### 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.
  - ❖ CE<sub>0</sub>: determinación al momento de obtener la muestra.
  - ❖ CE<sub>1</sub>: muestras almacenadas por 24 horas de 2 a 8 °C.
  - ❖ CE<sub>2</sub>: muestras almacenadas por 48 horas en congelación (-20 °C o menos).
  - ❖ CE<sub>3</sub>: muestras almacenadas en hielo por 60 minutos.
  - ❖ CE<sub>4</sub>: 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 CE<sub>0</sub> y CE<sub>1</sub>.
  - ❖  $UP_{SPB} > 22$  en las en las placas CE<sub>0</sub> y CE<sub>1</sub>.
  - ❖  $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 22$  en las placas CE<sub>0</sub> y CE<sub>1</sub>.
- Estabilidad de la muestra almacenada por 48 horas en congelación (-20 °C o menos).
  - ❖  $UP_{SN} < 18$  en las placas CE<sub>0</sub> y CE<sub>2</sub>.
  - ❖  $UP_{SPB} > 22$  en las en las placas CE<sub>0</sub> y CE<sub>2</sub>.
  - ❖  $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 22$  en las placas CE<sub>0</sub> y CE<sub>2</sub>.
- Estabilidad de la muestra almacenada en hielo por 60 minutos.
  - ❖  $UP_{SN} < 18$  en las placas CE<sub>0</sub> y CE<sub>3</sub>.
  - ❖  $UP_{SPB} > 22$  en las en las placas CE<sub>0</sub> y CE<sub>3</sub>.
  - ❖  $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 22$  en las placas CE<sub>0</sub> y CE<sub>3</sub>.
- Estabilidad de la muestra almacenada a la condición de mesa de laboratorio por 60 minutos.
  - ❖  $UP_{SN} < 18$  en las placas CE<sub>0</sub> y CE<sub>4</sub>.
  - ❖  $UP_{SPB} > 22$  en las en las placas CE<sub>0</sub> y CE<sub>4</sub>.
  - ❖  $UP_{SPA} > UP_{SPB} > 22$  en las placas CE<sub>0</sub> y CE<sub>4</sub>.

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 (T<sub>1</sub>).
- Lote del cromógeno TMB de otro equipo y del antígeno y AcMo (trazador) del propio equipo diagnóstico (T<sub>2</sub>).
- Lote del cromógeno TMB del propio equipo diagnóstico, del antígeno de otro equipo y del AcMo (trazador) del propio equipo para diagnóstico (T<sub>3</sub>).
- Lote del cromógeno TMB del propio equipo, del antígeno y del AcMo de otro equipo (T<sub>4</sub>).

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 T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub>.
  - ❖  $UP_{SNB} > 22$  para los tratamientos T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub>.
  - ❖  $UP_{SNA} > UP_{SNB} > 22$  para los tratamientos T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub>.
  
- Tolerancia para el lote de antígeno.
  - ❖  $UP_{SN} < 18$  para los tratamientos T<sub>1</sub> y T<sub>3</sub>.
  - ❖  $UP_{SNB} > 22$  para los tratamientos T<sub>1</sub> y T<sub>3</sub>.
  - ❖  $UP_{SNA} > UP_{SNB} > 22$  para los tratamientos T<sub>1</sub> y T<sub>3</sub>.
  
- Tolerancia para el lote del AcMo (trazador).
  - ❖  $UP_{SN} < 18$  para los tratamientos T<sub>1</sub> y T<sub>4</sub>.
  - ❖  $UP_{SNB} > 22$  para los tratamientos T<sub>1</sub> y T<sub>4</sub>.
  - ❖  $UP_{SNA} > UP_{SNB} > 22$  para los tratamientos T<sub>1</sub> y T<sub>4</sub>.

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  $\chi^2$  de independencia de Pearson, entre los criterios de clasificación ( $\chi^2$ , Pr  $\chi^2$ ) para cada tira, fue de 0.0073 cada una; para ambas tiras la prueba  $\chi^2$  de independencia de Pearson, entre los criterios de clasificación ( $\chi^2$ , Pr  $\chi^2$ ) 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 NS<sub>1</sub>, 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 NS<sub>1</sub>, 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 NS<sub>1</sub>, 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 NS<sub>1</sub>, ELISA IgM y ELISA IgG), se demuestra que los métodos de ensayo para identificar al antígeno viral NS<sub>1</sub> 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.

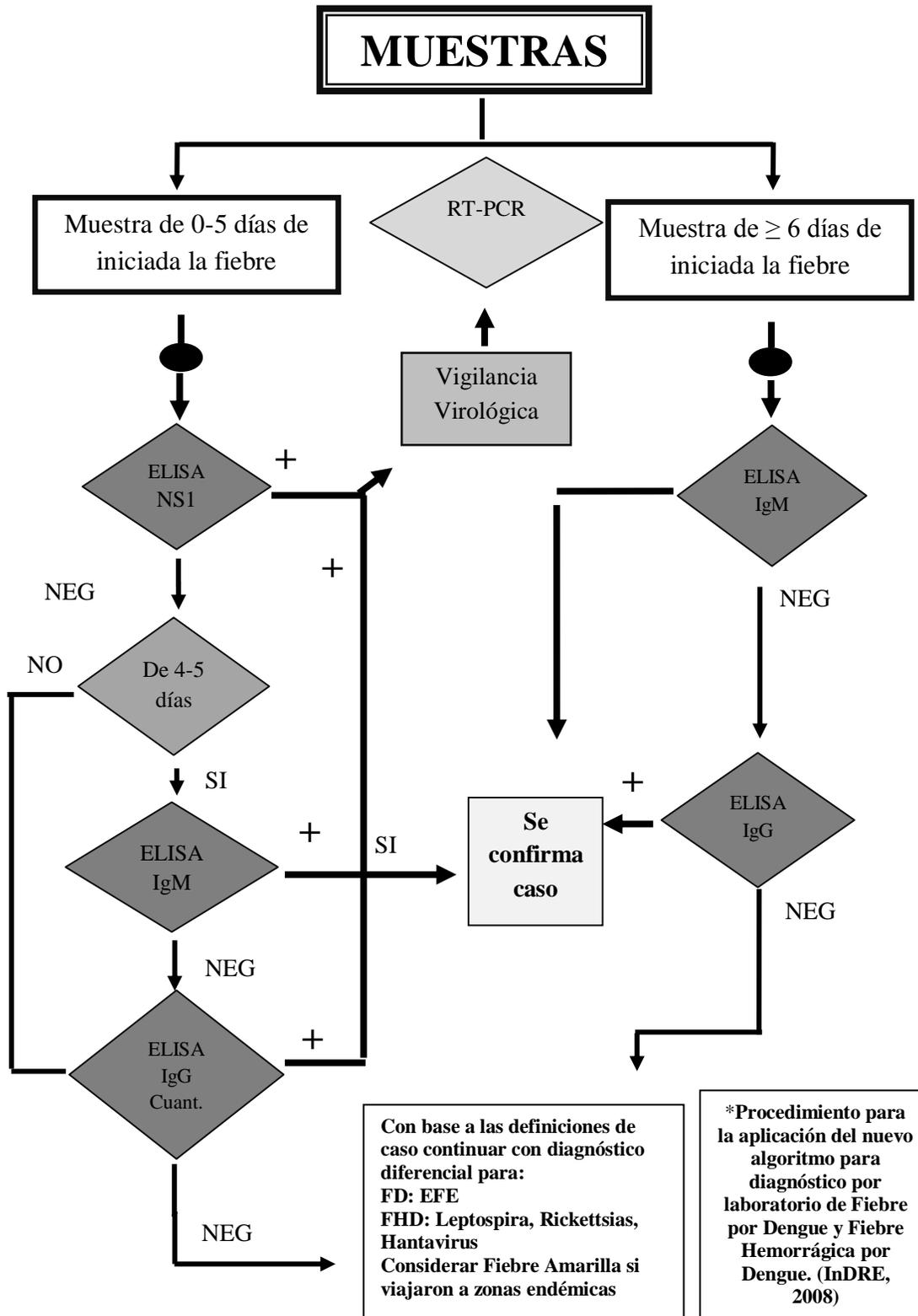
OPS & OMS (2010). Dengue. Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control. La Paz. OPS/OMS.

- 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

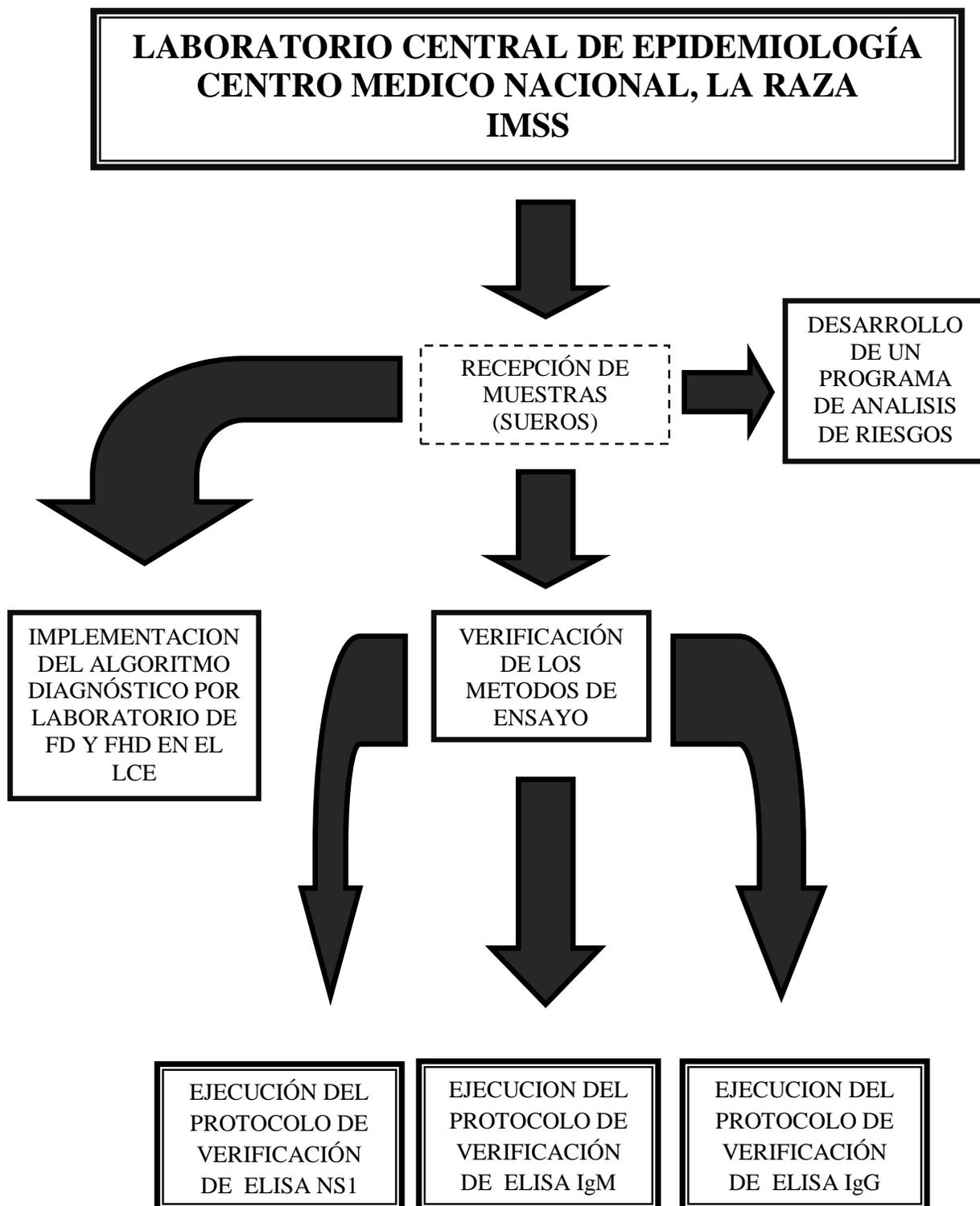
13.1 Diagrama de flujo del algoritmo diagnóstico por laboratorio de FD y FHD.

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

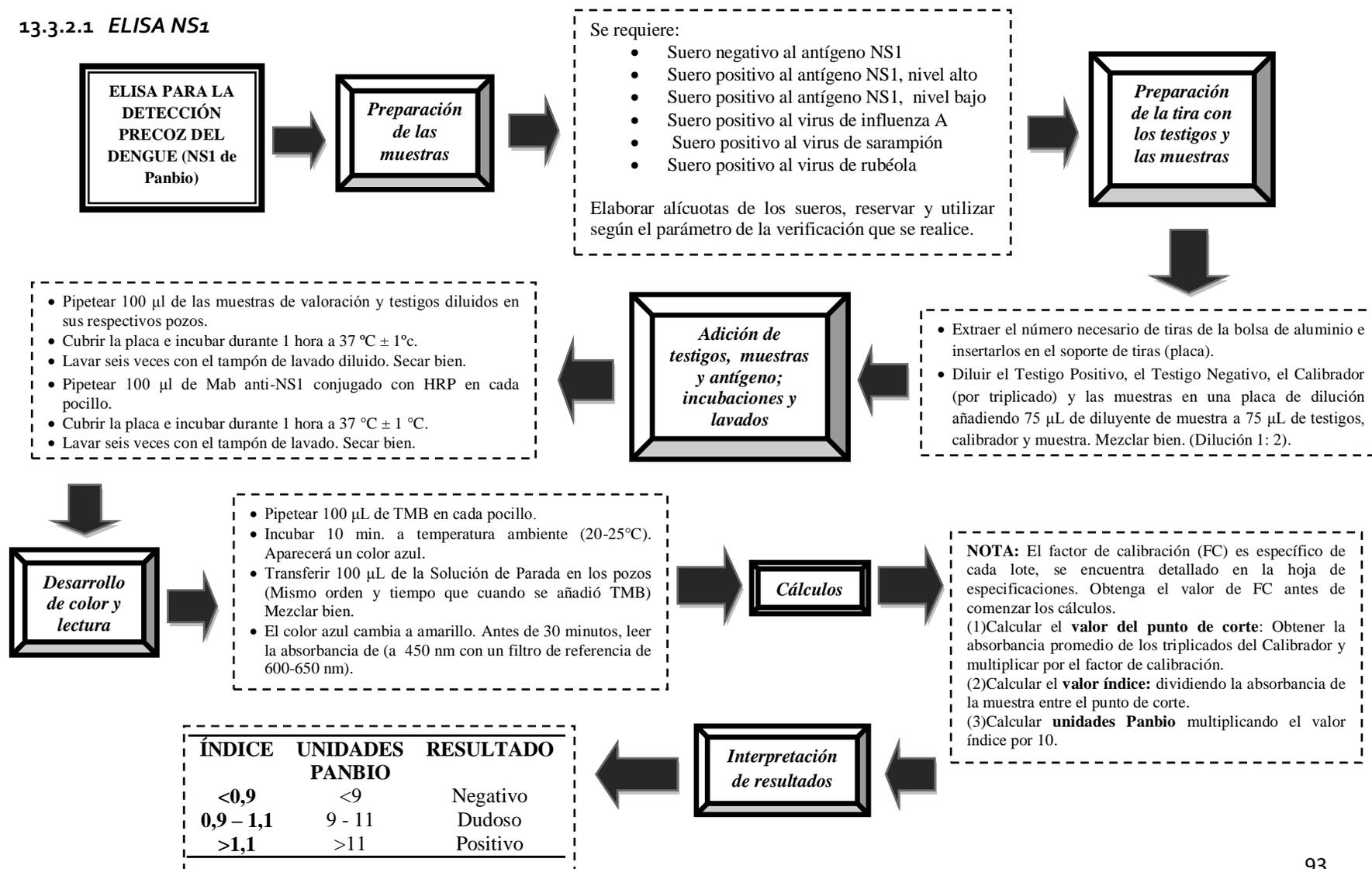
#### RECURSOS PARA EJECUTAR LAS VERIFICACIONES DE LOS METODOS DIAGNÓSTICOS DE DENGUE

- 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 NS<sub>1</sub>. Equipo para el diagnóstico de la proteína viral NS<sub>1</sub> 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 NS<sub>1</sub> de dengue, anticuerpos IgM contra dengue y anticuerpos IgG de Panbio.
  - ❖ Pozos recubiertos con anti-NS<sub>1</sub>
  - ❖ Pozos recubiertos con anti-IgM humana
  - ❖ Pozos recubiertos con anti-IgG humana
  - ❖ Antígenos 1-4 de dengue (Recombinante)
  - ❖ AcMo conjugado con HRP (Trazador)

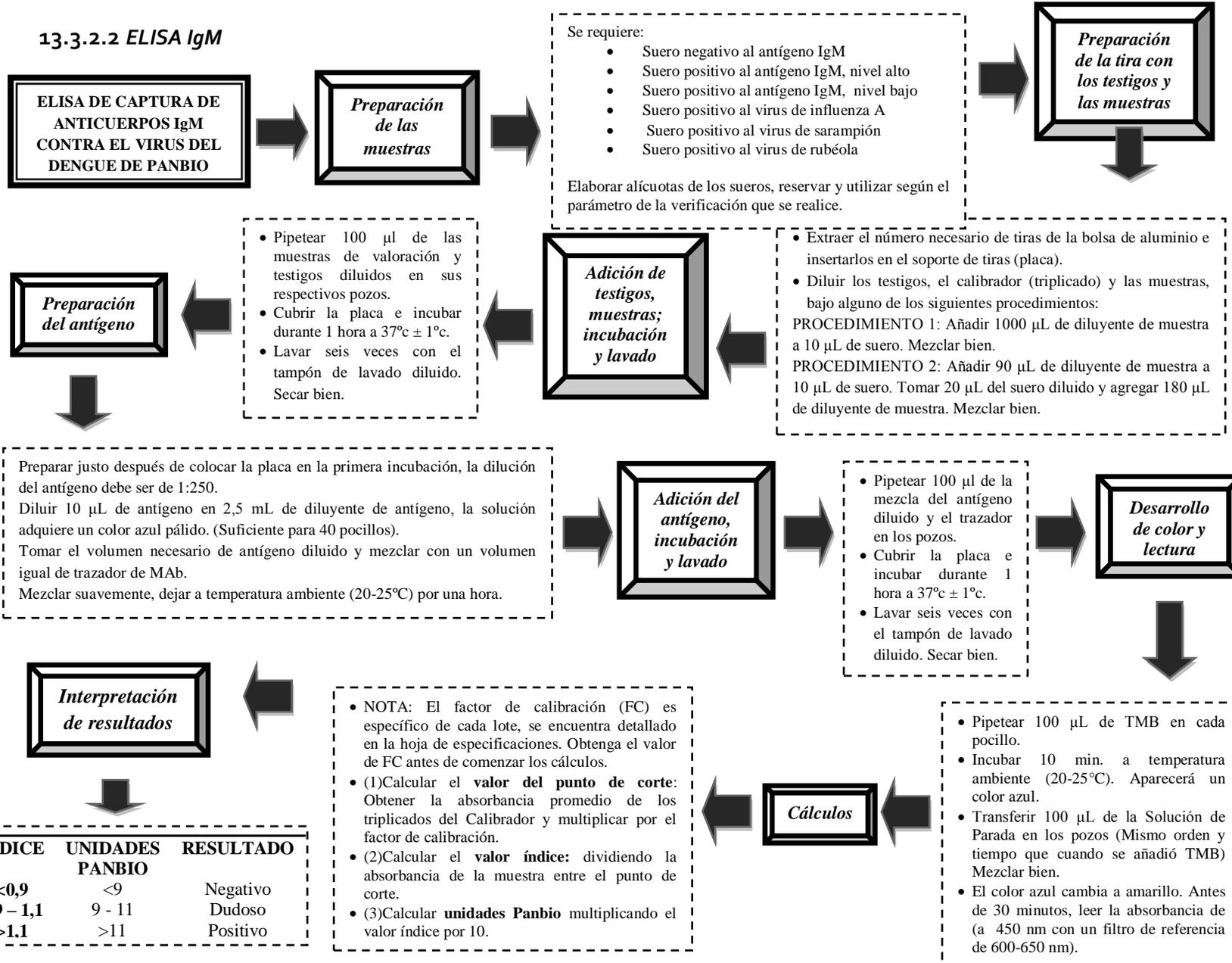
- ❖ Testigos : testigo positivo, testigo negativo y calibrador
- Reactivos y soluciones
  - ❖ Agua desionizada
  - ❖ Etanol al 70% (SIGMA-ADRIK, HYL, E7023)
  - ❖ Hielo
- Reactivos y soluciones contenidos en los equipos de diagnóstico
  - ❖ Solución amortiguadora de lavado (20X)
  - ❖ Diluyente de la 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  $\mu$ L, 2-20  $\mu$ L, 20-200  $\mu$ L y 100-1000  $\mu$ L (Eppendorf).
  - ❖ Micropipetas multicanal: 20-300  $\mu$ L y 100-1200  $\mu$ 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
<b>Media</b>	<b>0.619</b>	CAL2	0.944	<b>Media</b>	<b>0.963</b>
<b>Desviación</b>	<b>0.041</b>	CAL2	0.918	<b>Desviación</b>	<b>0.093</b>
<b>CV</b>	<b>6.594</b>	<b>Media</b>	<b>0.897</b>	<b>CV</b>	<b>9.640</b>
		<b>Desviación</b>	<b>0.064</b>		
		<b>CV</b>	<b>7.145</b>		

**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.								
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 D <sub>1</sub>	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 D <sub>2</sub>	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 D <sub>3</sub>	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 D <sub>4</sub>	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 D <sub>5</sub>	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
<b>Media</b>	<b>0.7757</b>	<b>Media</b>	<b>0.8107</b>
<b>Desviación</b>	<b>0.0090</b>	<b>Desviación</b>	<b>0.0095</b>
<b>CV</b>	<b>1.1555</b>	<b>CV</b>	<b>1.1724</b>
<b>VC</b>	<b>0.512</b>	<b>VC</b>	<b>0.5350</b>

**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.

<b>Placa A1D1</b>		<b>Placa A1D2</b>		<b>Placa A2D1</b>		<b>Placa A2D2</b>	
<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.

<b>Placa A1D1</b>			<b>Placa A1D2</b>		
<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
<b>Placa A2D1</b>			<b>Placa A2D2</b>		
<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).

<b>Placa TBB</b>		<b>Placa TBA</b>		<b>Placa TAB</b>		<b>Placa TAA</b>	
<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
<b>Media</b>	<b>0.537</b>	<b>Media</b>	<b>0.350</b>	<b>Media</b>	<b>0.723</b>	<b>Media</b>	<b>0.707</b>
<b>Desviación</b>	<b>0.011</b>	<b>Desviación</b>	<b>0.006</b>	<b>Desviación</b>	<b>0.014</b>	<b>Desviación</b>	<b>0.005</b>
<b>CV</b>	<b>1.972</b>	<b>CV</b>	<b>1.676</b>	<b>CV</b>	<b>1.959</b>	<b>CV</b>	<b>0.697</b>
<b>VC</b>	<b>0.355</b>	<b>VC</b>	<b>0.231</b>	<b>VC</b>	<b>0.477</b>	<b>VC</b>	<b>0.467</b>

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

<b>Placa TBB</b>			<b>Placa TBA</b>		
<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
<b>Placa TAB</b>			<b>Placa TAA</b>		
<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).

<b>Placa CE0</b>		<b>Placa CE1</b>		<b>Placa CE2</b>		<b>Placa CE3</b>		<b>Placa CE4</b>	
<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
<b>Media</b>	<b>0.594</b>	<b>Media</b>	<b>0.706</b>	<b>Media</b>	<b>0.717</b>	<b>Media</b>	<b>0.651</b>	<b>Media</b>	<b>0.682</b>
<b>Desviación</b>	<b>0.040</b>	<b>Desviación</b>	<b>0.006</b>	<b>Desviación</b>	<b>0.014</b>	<b>Desviación</b>	<b>0.040</b>	<b>Desviación</b>	<b>0.013</b>
<b>CV</b>	<b>6.747</b>	<b>CV</b>	<b>0.853</b>	<b>CV</b>	<b>1.977</b>	<b>CV</b>	<b>6.153</b>	<b>CV</b>	<b>1.872</b>
<b>VC</b>	<b>0.392</b>	<b>VC</b>	<b>0.466</b>	<b>VC</b>	<b>0.473</b>	<b>VC</b>	<b>0.430</b>	<b>VC</b>	<b>0.450</b>

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

<b>Placa CEo</b>			<b>Placa CE1</b>			<b>Placa CE2</b>		
<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
<b>Placa CE3</b>						<b>Placa CE4</b>		
<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
<b>Media</b>	<b>0.674</b>	<b>Media</b>	<b>0.592</b>	<b>Media</b>	<b>0.618</b>
<b>Desviación</b>	<b>0.046</b>	<b>Desviación</b>	<b>0.026</b>	<b>Desviación</b>	<b>0.027</b>
<b>CV</b>	<b>6.889</b>	<b>CV</b>	<b>4.317</b>	<b>CV</b>	<b>4.396</b>
<b>VC</b>	<b>0.445</b>	<b>VC</b>	<b>0.391</b>	<b>VC</b>	<b>0.408</b>

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 absorbancias.

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.

<b>Placa 1</b>			<b>Placa 2</b>			<b>Placa 3</b>			<b>Placa 4</b>		
<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
<b>Placa 5</b>			<b>Placa 6</b>			<b>Placa 7</b>			<b>Placa 8</b>		
<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
<b>Media</b>	<b>0.465</b>	CAL2	0.666	<b>Media</b>	<b>0.987</b>
<b>Desviación</b>	<b>0.074</b>	CAL2	0.687	<b>Desviación</b>	<b>0.035</b>
<b>CV</b>	<b>15.947</b>	<b>Media</b>	<b>0.656</b>	<b>CV</b>	<b>3.556</b>
		<b>Desviación</b>	<b>0.042</b>		
		<b>CV</b>	<b>6.435</b>		

**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.

<b>Placa D1</b>		<b>Placa D2</b>		<b>Placa D3</b>		<b>Placa D4</b>		<b>Placa D5</b>	
<i>Testigos</i>	<i>Abs</i>								
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.

<b>Placa D1</b>			<b>Placa D2</b>			<b>Placa D3</b>		
<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	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

<b>Placa D4</b>			<b>Placa D5</b>		
<i>Testigo</i>	<i>Unidades Panbio</i>	<i>Resultado</i>	<i>Testigo</i>	<i>Unidades Panbio</i>	<i>Resultado</i>
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).

<b>Placa A1D1</b>		<b>Placa A1D2</b>		<b>Placa A2D1</b>		<b>Placa A2D2</b>	
<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
<b>Media</b>	<b>0.636</b>	<b>Media</b>	<b>0.574</b>	<b>Media</b>	<b>0.603</b>	<b>Media</b>	<b>0.587</b>
<b>Desviación</b>	<b>0.055</b>	<b>Desviación</b>	<b>0.016</b>	<b>Desviación</b>	<b>0.029</b>	<b>Desviación</b>	<b>0.019</b>
<b>CV</b>	<b>8.674</b>	<b>CV</b>	<b>2.804</b>	<b>CV</b>	<b>4.818</b>	<b>CV</b>	<b>3.205</b>
<b>VC</b>	<b>0.554</b>	<b>VC</b>	<b>0.499</b>	<b>VC</b>	<b>0.525</b>	<b>VC</b>	<b>0.675</b>

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

<b>Placa A1D1</b>			<b>Placa A1D2</b>		
<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
<b>Placa A2D1</b>			<b>Placa A2D2</b>		
<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).

<b>Placa TBB</b>		<b>Placa TBA</b>		<b>Placa TAB</b>		<b>Placa TAA</b>	
<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
<b>Media</b>	<b>0.488</b>	<b>Media</b>	<b>0.518</b>	<b>Media</b>	<b>0.599</b>	<b>Media</b>	<b>0.583</b>
<b>Desviación</b>	<b>0.018</b>	<b>Desviación</b>	<b>0.099</b>	<b>Desviación</b>	<b>0.028</b>	<b>Desviación</b>	<b>0.020</b>
<b>CV</b>	<b>3.756</b>	<b>CV</b>	<b>19.021</b>	<b>CV</b>	<b>4.618</b>	<b>CV</b>	<b>3.443</b>
<b>VC</b>	<b>0.425</b>	<b>VC</b>	<b>0.451</b>	<b>VC</b>	<b>0.521</b>	<b>VC</b>	<b>0.507</b>

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

<b>Placa TBB</b>			<b>Placa TBA</b>		
<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
<b>Placa TAB</b>			<b>Placa TAA</b>		
<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).

<b>Placa CE0</b>		<b>Placa CE1</b>		<b>Placa CE2</b>		<b>Placa CE3</b>		<b>Placa CE4</b>	
<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
<b>Media</b>	<b>0.443</b>	<b>Media</b>	<b>0.606</b>	<b>Media</b>	<b>0.634</b>	<b>Media</b>	<b>0.676</b>	<b>Media</b>	<b>0.701</b>
<b>Desviación</b>	<b>0.028</b>	<b>Desviación</b>	<b>0.004</b>	<b>Desviación</b>	<b>0.005</b>	<b>Desviación</b>	<b>0.038</b>	<b>Desviación</b>	<b>0.029</b>
<b>CV</b>	<b>0.063</b>	<b>CV</b>	<b>0.007</b>	<b>CV</b>	<b>0.007</b>	<b>CV</b>	<b>0.056</b>	<b>CV</b>	<b>0.042</b>
<b>VC</b>	<b>0.385</b>	<b>VC</b>	<b>0.528</b>	<b>VC</b>	<b>0.551</b>	<b>VC</b>	<b>0.588</b>	<b>VC</b>	<b>0.610</b>

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

<b>Placa CE0</b>			<b>Placa CE1</b>			<b>Placa CE2</b>		
<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

<b>Placa CE3</b>			<b>Placa CE4</b>		
<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.

<b>Placa T<sub>1</sub></b>		<b>Placa T<sub>2</sub></b>		<b>Placa T<sub>3</sub></b>		<b>Placa T<sub>4</sub></b>	
<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
<b>Media</b>	<b>0.464</b>	<b>Media</b>	<b>0.464</b>	<b>Media</b>	<b>0.433</b>	<b>Media</b>	<b>0.433</b>
<b>Desviación</b>	<b>0.013</b>	<b>Desviación</b>	<b>0.051</b>	<b>Desviación</b>	<b>0.006</b>	<b>Desviación</b>	<b>0.005</b>
<b>CV</b>	<b>2.826</b>	<b>CV</b>	<b>10.933</b>	<b>CV</b>	<b>1.354</b>	<b>CV</b>	<b>1.140</b>
<b>VC</b>	<b>0.404</b>	<b>VC</b>	<b>0.404</b>	<b>VC</b>	<b>0.376</b>	<b>VC</b>	<b>0.376</b>

**Tabla 46.** Registro de las unidades Panbio por tratamiento.

<b>Placa T1</b>			<b>Placa T2</b>		
<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
<b>Placa T3</b>			<b>Placa T4</b>		
<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.

<b>Placa 1</b>		<b>Placa 2</b>		<b>Placa 3</b>		<b>Placa 4</b>		<b>Placa 5</b>		<b>Placa 6</b>		<b>Placa 7</b>		<b>Placa 8</b>	
<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
<b>Media</b>	<b>0.564</b>	<b>Media</b>	<b>0.218</b>	<b>Media</b>	<b>0.394</b>	<b>Media</b>	<b>0.564</b>	<b>Media</b>	<b>0.383</b>	<b>Media</b>	<b>0.375</b>	<b>Media</b>	<b>0.945</b>	<b>Media</b>	<b>0.445</b>
<b>Desviación</b>	<b>0.018</b>	<b>Desviación</b>	<b>0.006</b>	<b>Desviación</b>	<b>0.014</b>	<b>Desviación</b>	<b>0.018</b>	<b>Desviación</b>	<b>0.013</b>	<b>Desviación</b>	<b>0.028</b>	<b>Desviación</b>	<b>0.036</b>	<b>Desviación</b>	<b>0.017</b>
<b>CV</b>	<b>3.105</b>	<b>CV</b>	<b>2.684</b>	<b>CV</b>	<b>3.433</b>	<b>CV</b>	<b>3.105</b>	<b>CV</b>	<b>3.267</b>	<b>CV</b>	<b>7.351</b>	<b>CV</b>	<b>3.823</b>	<b>CV</b>	<b>3.826</b>
<b>VC</b>	<b>0.490</b>	<b>VC</b>	<b>0.190</b>	<b>VC</b>	<b>0.343</b>	<b>VC</b>	<b>0.490</b>	<b>VC</b>	<b>0.333</b>	<b>VC</b>	<b>0.327</b>	<b>VC</b>	<b>0.822</b>	<b>VC</b>	<b>0.387</b>

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

<b>Placa 1</b>			<b>Placa 2</b>			<b>Placa 3</b>			<b>Placa 4</b>		
<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
<b>Placa 5</b>			<b>Placa 6</b>			<b>Placa 7</b>			<b>Placa 8</b>		
<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
<b>Media</b>	<b>0.360</b>	CAL2	0.343	<b>Media</b>	<b>0.318</b>
<b>Desviación</b>	<b>0.011</b>	CAL2	0.332	<b>Desviación</b>	<b>0.017</b>
<b>CV</b>	<b>3.07</b>	<b>Media</b>	<b>0.331</b>	<b>CV</b>	<b>5.26</b>
		<b>Desviación</b>	<b>0.015</b>		
		<b>CV</b>	<b>4.40</b>		

**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								
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).

<b>Placa A1D1</b>		<b>Placa A1D2</b>		<b>Placa A2D1</b>		<b>Placa A2D2</b>	
<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
<b>Media</b>							
<b>Media</b>	<b>0.305</b>	<b>Media</b>	<b>0.317</b>	<b>Media</b>	<b>0.388</b>	<b>Media</b>	<b>0.400</b>
<b>Desviación</b>							
<b>Desviación</b>	<b>0.007</b>	<b>Desviación</b>	<b>0.008</b>	<b>Desviación</b>	<b>0.002</b>	<b>Desviación</b>	<b>0.012</b>
<b>CV</b>							
<b>CV</b>	<b>2.229</b>	<b>CV</b>	<b>2.365</b>	<b>CV</b>	<b>0.536</b>	<b>CV</b>	<b>2.947</b>
<b>VC</b>							
<b>VC</b>	<b>0.305</b>	<b>VC</b>	<b>0.317</b>	<b>VC</b>	<b>0.388</b>	<b>VC</b>	<b>0.400</b>

**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>									
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).

<b>Placa TBB</b>		<b>Placa TBA</b>		<b>Placa TAB</b>		<b>Placa TAA</b>	
<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
<b>Media</b>	<b>0.246</b>	<b>Media</b>	<b>0.236</b>	<b>Media</b>	<b>0.344</b>	<b>Media</b>	<b>0.333</b>
<b>Desviación</b>	<b>0.004</b>	<b>Desviación</b>	<b>0.004</b>	<b>Desviación</b>	<b>0.005</b>	<b>Desviación</b>	<b>0.007</b>
<b>CV</b>	<b>1.430</b>	<b>CV</b>	<b>1.486</b>	<b>CV</b>	<b>1.372</b>	<b>CV</b>	<b>2.081</b>

**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).

<b>Placa CEo</b>		<b>Placa CE1</b>		<b>Placa CE2</b>		<b>Placa CE3</b>		<b>Placa CE4</b>	
<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
<b>Media</b>	<b>0.314</b>	<b>Media</b>	<b>0.224</b>	<b>Media</b>	<b>0.215</b>	<b>Media</b>	<b>0.298</b>	<b>Media</b>	<b>0.289</b>
<b>Desviación</b>	<b>0.013</b>	<b>Desviación</b>	<b>0.003</b>	<b>Desviación</b>	<b>0.002</b>	<b>Desviación</b>	<b>0.008</b>	<b>Desviación</b>	<b>0.008</b>
<b>CV</b>	<b>4.028</b>	<b>CV</b>	<b>1.366</b>	<b>CV</b>	<b>1.076</b>	<b>CV</b>	<b>2.534</b>	<b>CV</b>	<b>2.594</b>
<b>VC</b>	<b>0.314</b>	<b>VC</b>	<b>0.224</b>	<b>VC</b>	<b>0.215</b>	<b>VC</b>	<b>0.298</b>	<b>VC</b>	<b>0.289</b>

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

<b>Placa CEo</b>			<b>Placa CE1</b>			<b>Placa CE2</b>		
<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
<b>Placa CE3</b>						<b>Placa CE4</b>		
<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.

<i>Placa T<sub>1</sub></i>		<i>Placa T<sub>2</sub></i>		<i>Placa T<sub>3</sub></i>		<i>Placa T<sub>4</sub></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	0.81	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
<b>Media</b>	<b>0.272</b>	<b>Media</b>	<b>0.281</b>	<b>Media</b>	<b>0.286</b>	<b>Media</b>	<b>0.383</b>
<b>Desviación</b>	<b>0.010</b>	<b>Desviación</b>	<b>0.003</b>	<b>Desviación</b>	<b>0.019</b>	<b>Desviación</b>	<b>0.003</b>
<b>CV</b>	<b>3.575</b>	<b>CV</b>	<b>1.026</b>	<b>CV</b>	<b>6.727</b>	<b>CV</b>	<b>0.691</b>
<b>VC</b>	<b>0.272</b>	<b>VC</b>	<b>0.281</b>	<b>VC</b>	<b>0.286</b>	<b>VC</b>	<b>0.383</b>

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

<b>Placa T1</b>			<b>Placa T2</b>		
<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
<b>Placa T3</b>			<b>Placa T4</b>		
<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.

<b>Placa 1</b>		<b>Placa 2</b>		<b>Placa 3</b>		<b>Placa 4</b>		<b>Placa 5</b>		<b>Placa 6</b>		<b>Placa 7</b>		<b>Placa 8</b>	
<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
<b>Media</b>	<b>0.219</b>	<b>Media</b>	<b>0.267</b>	<b>Media</b>	<b>0.259</b>	<b>Media</b>	<b>0.207</b>	<b>Media</b>	<b>0.288</b>	<b>Media</b>	<b>0.369</b>	<b>Media</b>	<b>0.358</b>	<b>Media</b>	<b>0.258</b>
<b>Desviación</b>	<b>0.009</b>	<b>Desviación</b>	<b>0.004</b>	<b>Desviación</b>	<b>0.007</b>	<b>Desviación</b>	<b>0.006</b>	<b>Desviación</b>	<b>0.005</b>	<b>Desviación</b>	<b>0.009</b>	<b>Desviación</b>	<b>0.004</b>	<b>Desviación</b>	<b>0.004</b>
<b>CV</b>	<b>4.309</b>	<b>CV</b>	<b>1.498</b>	<b>CV</b>	<b>2.743</b>	<b>CV</b>	<b>2.917</b>	<b>CV</b>	<b>1.715</b>	<b>CV</b>	<b>2.559</b>	<b>CV</b>	<b>0.982</b>	<b>CV</b>	<b>1.568</b>
<b>VC</b>	<b>0.219</b>	<b>VC</b>	<b>0.267</b>	<b>VC</b>	<b>0.259</b>	<b>VC</b>	<b>0.207</b>	<b>VC</b>	<b>0.288</b>	<b>VC</b>	<b>0.369</b>	<b>VC</b>	<b>0.358</b>	<b>VC</b>	<b>0.258</b>

Tabla 73. Unidades Panbio para cada placa de tratamiento.

<b>Placa 1</b>			<b>Placa 2</b>			<b>Placa 3</b>			<b>Placa 4</b>		
<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
<b>Placa 5</b>			<b>Placa 6</b>			<b>Placa 7</b>			<b>Placa 8</b>		
<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



<b>LCE</b>	
<b>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)</b>	
CLAVE: 2710-22-48	Fecha de emisión: 07 de Marzo de 2013
	Autoridad emisora: QFB Bernardo Martínez Miguel Coordinador del Área de Enfermedades Transmisibles del LCE
	No. Páginas: 61      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

13.5.2 ELISA IgM



2710-22-50

---

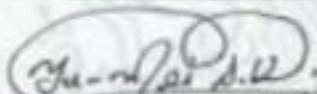
---

**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	
<b>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)</b>	
<b>Clave 2710-22-50</b>	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	
<b>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)</b>	
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-Mel 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