

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

EVALUACIÓN DE HOMOGENEIDAD Y ESTABILIDAD DE
ANTICUERPOS IgG ANTI *TRYPANOSOMA CRUZI* EN MUESTRAS DE
SUERO SANGUÍNEO EMPLEADAS COMO ÍTEM DE ENSAYO DEL
PROGRAMA DE EVALUACIÓN EXTERNA DEL DESEMPEÑO DEL
TAMIZAJE DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

Informe presentado a la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial para optar al título de Licenciada en Ingeniería en Biotecnología

Mariel Chaves Gutiérrez

Cartago

Noviembre, 2018

EVALUACIÓN DE HOMOGENEIDAD Y ESTABILIDAD DE ANTICUERPOS IgG ANTI *TRYPANOSOMA CRUZI* EN MUESTRAS DE SUERO SANGUÍNEO EMPLEADAS COMO ÍTEM DE ENSAYO DEL PROGRAMA DE EVALUACIÓN EXTERNA DEL DESEMPEÑO DEL TAMIZAJE DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

Mariel Chaves Gutiérrez¹

RESUMEN

La enfermedad de Chagas es una parasitosis endémica del continente americano ocasionada por el protozooario *Trypanosoma cruzi*. El diagnóstico se basa principalmente en metodologías serológicas como el Inmunoanálisis Quimioluminiscente de Micropartículas (CMIA), técnica empleada en Costa Rica para el tamizaje de la enfermedad en las donaciones sanguíneas. Para ejercer un seguimiento continuo del desempeño de los bancos de sangre, se ha establecido el ensayo de aptitud denominado Programa de Evaluación Externa del Desempeño del Tamizaje de la Enfermedad de Chagas. El objetivo del presente trabajo consistió en evaluar los parámetros de homogeneidad y estabilidad del ítem de ensayo bajo el marco de la norma INTE-ISO/IEC 17043:2010. Para ello se ejecutaron los diseños experimentales y métodos de análisis indicados según la norma INTE/ISO 13528:2016. Se determinó que en términos cuantitativos, existía heterogeneidad en los sueros evaluados y en una parte de los mismos, se identificó una estabilidad insuficiente en cuanto al analito de interés que corresponde a anticuerpos IgG anti *T. cruzi*. El inmunoensayo ARCHITECT Chagas consiste en un método de detección cualitativa con el cual no se detectaron cambios significativos de reactividad en las muestras, por lo que se aceptaron los ítems de ensayo para el uso previsto de evaluación del desempeño de los participantes.

Palabras clave: Enfermedad de Chagas, tamizaje, ensayo de aptitud, homogeneidad, estabilidad.

¹ Informe de Trabajo Final de Graduación, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica, 2018.

Esta obra está sujeta a la licencia Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional de Creative Commons. Para ver una copia de esta licencia, visite <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.



EVALUACIÓN DE HOMOGENEIDAD Y ESTABILIDAD DE ANTICUERPOS IgG ANTI
TRYPANOSOMA CRUZI EN MUESTRAS DE SUERO SANGUÍNEO EMPLEADAS
COMO ÍTEM DE ENSAYO DEL PROGRAMA DE EVALUACIÓN EXTERNA DEL
DESEMPEÑO DEL TAMIZAJE DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

ABSTRACT

Chagas disease is an American continent endemic illness, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*. Diagnosis is mainly based upon serologic methodologies such as Chemiluminescent Microparticle Immunoassay (CMIA), which is employed in Costa Rica for donated blood screening. In order to perform a continuous monitoring of blood banks performance, the Chagas Disease Screening Evaluation Program proficiency test has been established. The objective of the present investigation was to assess the homogeneity and stability of proficiency test items according to INTE-ISO/IEC 17043:2010 standard. For that purpose fulfillment, experimental designs and testing methods were carried out following INTE/ISO 13528:2016 standard guidelines. In quantitative terms, it was determined that the analyzed sera had some heterogeneity degree, as well as insufficient stability regarding the analyte of interest which corresponds to IgG class anti-*T. cruzi* antibodies. Given the qualitative nature of ARCHITECT Chagas immunoassay and the fact that the samples demonstrated no significant reactivity changes, the proficiency test items were accepted as suitable for evaluation of participant performance.

Key words: Chagas disease, screening, proficiency test, homogeneity, stability.

EVALUACIÓN DE HOMOGENEIDAD Y ESTABILIDAD DE
ANTICUERPOS IgG ANTI *TRYPANOSOMA CRUZI* EN MUESTRAS DE
SUERO SANGUÍNEO EMPLEADAS COMO ÍTEM DE ENSAYO DEL
PROGRAMA DE EVALUACIÓN EXTERNA DEL DESEMPEÑO DEL
TAMIZAJE DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

Informe presentado a la Escuela de Biología del Instituto
Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial
para optar al título de Licenciada en Ingeniería en Biotecnología

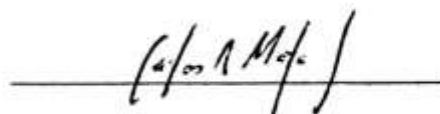
Miembros del Tribunal



Dra. Virginia Montero Campos, Ph.D.
Profesora Asesora – TEC



Dra. Nidia Calvo Fonseca, MSc.
Asesora – CNRP, INCIENSA



Dr. Carlos A. Mata Somarribas, MAG
Lector – CNRP, INCIENSA

DEDICATORIA

A Dios y a quienes me han
brindado su apoyo sin condiciones

AGRADECIMIENTOS

La autora quiere dejar constancia de su agradecimiento a las siguientes instituciones y personas, que colaboraron en el desarrollo del presente proyecto de graduación:

En primer lugar a Dios por permitir la conclusión de esta etapa de estudios.

A familiares y amigos por el apoyo y respaldo brindado durante el proceso.

A la Escuela de Biología y sus profesores por la formación académica y asesoramiento.

Al INCIENSA y al CNR de Parasitología por la oportunidad de llevar a cabo este trabajo.

ÍNDICE GENERAL	Pág.
RESUMEN	II
ABSTRACT	III
DEDICATORIA	V
AGRADECIMIENTOS	VI
ÍNDICE GENERAL	VII
ÍNDICE DE CUADROS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE ANEXOS	XI
ABREVIATURAS	XII
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
II.1 La enfermedad de Chagas.....	3
II.1.1 Agente etiológico.....	3
II.1.2 Ciclo de vida del parásito y mecanismos de transmisión	3
II.1.3 Manifestaciones clínicas de la enfermedad	5
II.2 Enfermedad de Chagas en Costa Rica	5
II.2.1 Diagnóstico y vigilancia basada en laboratorio	6
II.2.2 Tamizaje de la enfermedad de Chagas	7
II.2.2.1 Inmunoanálisis Quimioluminiscente de Micropartículas ARCHITECT Chagas.....	8
II.2.3 Programa de Evaluación Externa del Desempeño del Tamizaje de la Enfermedad de Chagas	8
III. OBJETIVOS	10
III. 1 Objetivo general	10
III.2 Objetivos específicos.....	10
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	11
IV.1 Localización	11
IV.2 Obtención de muestras de suero sanguíneo	11
IV.3 Preparación del ítem de ensayo.....	12
IV.4 Evaluación de homogeneidad	13
IV.5 Evaluación de estabilidad.....	14
V. RESULTADOS	16
V.1 Caracterización de sueros sanguíneos	16
V.2 Evaluación de homogeneidad.....	16
V.3 Evaluación de estabilidad.....	17
VI. DISCUSIÓN	19
VI.1 Análisis preliminar de muestras de suero para la preparación del ítem de ensayo	19

VI.2 Evaluación de homogeneidad del ítem de ensayo	19
VI.3 Evaluación de estabilidad del ítem de ensayo.....	22
VII. CONCLUSIONES	25
VIII. RECOMENDACIONES	26
IX. BIBLIOGRAFÍA	27
X. ANEXOS	32

ÍNDICE DE CUADROS

Núm.	Título	Pág.
1	Codificación asignada a los sueros sanguíneos empleados para la preparación del ítem de ensayo del PEEDCH, año 2018.	12
2	Asignación de códigos a alícuotas generadas a partir de los sueros sanguíneos empleados para la preparación del ítem de ensayo del PEEDCH, año 2018.	12
3	Condiciones ambientales contempladas en la evaluación de la estabilidad de diez alícuotas por suero sanguíneo.	15
4	Análisis preliminar de cinco muestras de suero empleadas como fuente del ítem de ensayo.	16
5	Estimación de medidas de tendencia central y dispersión para la revisión de homogeneidad de cinco sueros sanguíneos.	16
6	Aplicación del criterio de evaluación correspondiente a la revisión de homogeneidad.	17
7	Prueba F de valores de S/CO obtenidos a partir de análisis de submuestras de ítems de ensayo.	17
8	Estimación de coeficientes de variación derivados del análisis de submuestras de ítems de ensayo.	17
9	Aplicación del criterio de evaluación correspondiente a la evaluación de la estabilidad.	18
10	Prueba t para comparación de análisis efectuados de forma previa y posterior a la distribución del ítem de ensayo.	18

ÍNDICE DE FIGURAS

Núm.	Título	Pág.
1	Etiqueta para identificación del ítem de ensayo, ronda de ensayo de aptitud del año 2018.	12
2	Etiqueta para identificación de submuestras derivadas del ítem de ensayo.	13
3	Criterio de evaluación para la determinación de homogeneidad del ítem de ensayo.	14
4	Criterio de evaluación para la determinación de estabilidad del ítem de ensayo.	15

ÍNDICE DE ANEXOS

Núm.	Título	Pág.
1	Etiqueta para identificación de caja para almacenamiento de submuestras correspondientes a la revisión de homogeneidad.	32
2	Fórmulas para la revisión del parámetro de homogeneidad.	33
3	Etiqueta para identificación de caja para almacenamiento de submuestras correspondientes a la revisión de estabilidad.	35

ABREVIATURAS

CMIA: Chemiluminescent Microparticle Immunoassay (Inmunoanálisis quimioluminiscente de micropartículas)

CNRP: Centro Nacional de Referencia de Parasitología

DO: Densidad óptica

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Ensayo Inmunoenzimático)

IgG: Inmunoglobulina G

INCIENSA: Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud

OMS: Organización Mundial de la Salud

OPS: Organización Panamericana de la Salud

PEA: Programa de Ensayos de Aptitud

PEEDCH: Programa de Evaluación Externa del Desempeño del Tamizaje de la Enfermedad de Chagas

S/CO: Signal / Cut-Off (Señal / Punto de corte)

I. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, es endémica del continente americano (BID/OPS/IDRC/CNZ, 2010) y constituye una amenaza para aproximadamente la cuarta parte de la población de América Latina. Esta parasitosis se encuentra estrechamente relacionada con el desarrollo económico y social (Ministerio de Salud, 2010), ya que afecta principalmente a comunidades rurales y periurbanas que viven en condiciones de pobreza (BID/OPS/IDRC/CNZ, 2011).

El agente etiológico de esta enfermedad es el protozooario hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, este parásito se encuentra en el intestino de insectos triatomíneos hematófagos infectados, por lo que la transmisión ocurre cuando las heces del vector entran en contacto con el sitio de la picadura o con membranas mucosas. Otras formas de transmisión corresponden a la de tipo transfusional, tipo congénito y a través de trasplantes de órganos (Bern *et al.*, 2011).

La infección produce inicialmente una manifestación aguda, la cual incluye síntomas variables como debilidad, cefalea, fiebre, dolor articular, náuseas, entre otros (Center for Food Security & Public Health, 2017). Esta fase aguda se autolimita espontáneamente con el alojamiento del protozooario en el sistema fagocítico mononuclear, sistema nervioso y miocardio (Gutiérrez *et al.*, 2007), tras lo cual el individuo infectado pasa a ser asintomático por un periodo prolongado o indefinido (Center for Food Security & Public Health, 2017). Aproximadamente un 30 % de las personas infectadas desarrollan un estadio denominado como fase crónica, caracterizada por alteraciones como lo son megaesófago, megacolon y miocardiopatía dilatada (Gutiérrez *et al.*, 2007).

El diagnóstico durante la fase aguda de la enfermedad se basa en la demostración de la presencia del parásito, ya que durante la misma es posible detectar la forma circulante del protozooario (CeNDIE-ANLIS, 2010). Por otro lado, dado que en la fase crónica la parasitemia es limitada o ausente, el diagnóstico de laboratorio se basa en la detección de anticuerpos IgG anti *T. cruzi* (Otani *et al.*, 2011). En relación a lo anteriormente expuesto, el grupo de expertos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda para la confirmación diagnóstica de la enfermedad de Chagas, la detección del parásito en sangre total y al menos dos pruebas serológicas de distinto principio y diferente fuente de antígeno (Ministerio de Salud, 2010; Murcia *et al.*, 2013).

En el contexto descrito, los análisis a nivel de laboratorio desempeñan un papel esencial en cuanto a la detección, alerta y clasificación de los casos que son estudiados. Es por ello que en Costa Rica se ha elaborado la “Norma de Atención Integral de la Enfermedad de Chagas” (Decreto N° 37269-S) como documento medular de los esfuerzos dirigidos hacia la atención y seguimiento de este evento de salud pública. Dicho protocolo de vigilancia incorpora la participación activa del Centro Nacional de Referencia de Parasitología (CNRP) perteneciente al Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud (INCIENSA) (Ministerio de Salud, 2010). El CNRP surgió en el año 2003 como respuesta ante las necesidades de diagnóstico y vigilancia de las parasitosis, siendo la enfermedad de Chagas la piedra angular (INCIENSA, 2014).

La norma establece que los bancos de sangre públicos y privados del país deben tamizar el 100 % de la donación sanguínea para evitar la transmisión de tipo transfusional de la enfermedad de Chagas. Todos estos establecimientos deben enviar al CNRP del INCIENSA el 100 % de los sueros determinados como positivos y el 5 % de los negativos para ejercer actividades de control y seguimiento mediante la confirmación diagnóstica (Ministerio de Salud, 2010). Adicionalmente, el CNR de Parasitología se constituye como organismo evaluador mediante el Programa de Evaluación Externa del Desempeño del Tamizaje de la Enfermedad de Chagas, el cual permite ejercer un seguimiento continuo del desempeño de los bancos de sangre. Dado el papel de esta entidad en el ámbito nacional, es de suma relevancia la demostración de su competencia como proveedor de un programa de ensayos de aptitud, para lo cual la norma INTE-ISO/IEC 17043:2010 proporciona lineamientos (INTECO, 2010).

Específicamente en lo concerniente al ítem de ensayo del programa, se establecen requisitos que pretenden asegurar que las muestras a ensayar recibidas por los participantes sean comparables y permanezcan estables a lo largo del ensayo de aptitud. Para ello, se deben determinar los criterios de homogeneidad y estabilidad apropiados, basándose en los efectos que tendría la ausencia de los mismos sobre los resultados y la evaluación del desempeño de los participantes (INTECO, 2010). La implementación de estas actividades como parte de los procesos de operación del programa de ensayos de aptitud representaría una contribución al establecimiento y aseguramiento de la calidad del mismo. Tomando en consideración lo anteriormente expuesto, se plantea evaluar los parámetros de homogeneidad y estabilidad del ítem de ensayo del Programa de Evaluación Externa del Desempeño del Tamizaje de la Enfermedad de Chagas bajo el marco de la norma INTE-ISO/IEC 17043:2010.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

II.1 La enfermedad de Chagas

En el año de 1909, el científico de origen brasileño Carlos Chagas describió un nuevo patógeno, así como un padecimiento hasta el momento desconocido por la comunidad científica (Rassi *et al.*, 2015). Con este hallazgo se dio inicio al estudio de la enfermedad de Chagas, también conocida como Tripanosomiasis americana o mal de Chagas, sobre la cual la OMS estima que en el mundo existen entre seis y siete millones de personas infectadas (OMS, 2018). Dicha cifra se concentra principalmente en 21 países de la región latinoamericana, en donde la enfermedad se constituye en un problema de salud pública asociado a factores sociales y económicos. Por otro lado, debido a los patrones de migración poblacional, esta parasitosis ha llegado a representar una problemática en países no endémicos como lo son Canadá, Estados Unidos, Japón, Australia y distintas naciones del continente europeo (WHO, 2012). Como resultado, el empleo de métodos diagnósticos y la publicación de guías para el manejo de la enfermedad son algunas de las medidas que se han implementado a nivel mundial con el objetivo de prevenir su transmisión (Rassi *et al.*, 2015).

II.1.1 Agente etiológico

La infección con el parásito intracelular *Trypanosoma cruzi* da origen a la enfermedad de Chagas. Se han aislado distintas cepas que pertenecen a diversos genotipos del protozooario y que infectan a 150 especies pertenecientes a 24 familias de fauna doméstica y silvestre (Guhl, 2009). Tales capacidades de adaptación y supervivencia en diferentes hospedadores se han asociado con la amplia variabilidad intraespecífica de este agente etiológico (Rimoldi *et al.*, 2012), característica que ha sido el objeto de estudio de numerosas investigaciones con el fin de establecer divisiones o subgrupos dentro de la estructura poblacional de *T. cruzi*. A través de los años y según los enfoques aplicados, estos subgrupos han consistido en diferentes designaciones, incluyendo zimodemas, esquizodemas, biodemas, clonets, linajes, clados, y más recientemente, Unidades Discretas de Tipificación (DTU) y haplotipos (Zingales *et al.*, 2009).

En el año 2009 un comité de expertos llevó a cabo una revisión de la información disponible en lo concerniente a la variabilidad genética de la especie y como resultado se decidió agrupar los aislamientos del parásito en seis Unidades Discretas de Tipificación (*T. cruzi* I - IV) (WHO, 2012). Las técnicas moleculares que permitieron dilucidar estos seis grupos continúan utilizándose para la generación de nueva información que pueda ser empleada como base para la estandarización de una nomenclatura que facilite las futuras investigaciones acerca de las características biológicas, eco-epidemiológicas y de patogenicidad (Zingales *et al.*, 2009).

II.1.2 Ciclo de vida del parásito y mecanismos de transmisión

La manifestación de la enfermedad de Chagas en los humanos ha sido un hecho accidental, producto de su invasión de los focos naturales y los desequilibrios ecológicos generados,

hechos que introdujeron al hombre como miembro activo de la cadena epidemiológica de esta zoonosis (Guhl, 2009).

Trypanosoma cruzi desarrolla su ciclo de vida al alternar entre un insecto y una especie de mamífero, incluyendo animales silvestres, animales domésticos y humanos (Guhl, 2009). Los insectos vectores de esta enfermedad pertenecen al orden Hemiptera, familia Reduviidae y subfamilia Triatominae, y presentan la particularidad de ser hematófagos. Las especies más importantes en cuanto a la transmisión vectorial en la región centroamericana corresponden a *Triatoma dimidiata*, *Rhodnius prolixus* y *Rhodnius pallescens* (Ministerio de Salud, 2010).

El triatomino adquiere el parásito al alimentarse de sangre de un mamífero infectado, tras lo cual el protozoo se multiplica en el intestino posterior del insecto para generar tripomastigotes metacíclicos. Dicho estadio es altamente infeccioso y es la forma que se transmite a los mamíferos cuando el vector defeca al realizar la picadura (Otani *et al.*, 2011). Los hábitos de los triatominos favorecen la transmisión de la enfermedad dado que defecan una vez que se han alimentado y las escoriaciones generadas por su aparato bucal son el sitio de entrada para los tripomastigotes (Gallego, 2006). Esta forma infectante invade las células adyacentes para diferenciarse como amastigotes, los cuales se multiplican por fisión binaria. Tras múltiples procesos de fisión, los amastigotes pasan a ser tripomastigotes sanguíneos y mediante lisis, abandonan la célula hospedera para liberarse en el torrente sanguíneo, hecho que da lugar a la continuación del ciclo (Ministerio de Salud, 2010).

La forma de transmisión vectorial anteriormente descrita corresponde al principal mecanismo de infección de la enfermedad (Rassi *et al.*, 2015). En lo concerniente al ser humano, este tipo de transmisión se presenta mayormente en zonas rurales, donde la probabilidad de entrar en contacto con el insecto vector se ve aumentada (Guhl, 2009). Con respecto a los sectores urbanos, la circulación del parásito permanece aún aislada del contexto domiciliario, por lo que el establecimiento del ciclo está ligado a contactos fortuitos que introducen al hombre en la cadena de transmisión (Rojas, 2007).

El mecanismo de infección a través de transfusión sanguínea ocupa el segundo lugar en importancia, después de la ruta vectorial. El mismo había sido identificado en países latinoamericanos, sin embargo con el incremento de las migraciones hacia regiones no endémicas, se dio lugar a la generación de nuevos escenarios para este tipo de transmisión. El establecimiento de controles como el tamizaje de las donaciones sanguíneas ha permitido prevenir su ocurrencia en países del cono sur como lo son Brasil, Uruguay y Chile, así como en la región centroamericana (Rodrigues, 2015). A pesar de ello, este mecanismo aún representa una problemática de peso en aquellos países donde no se ha decretado la obligatoriedad de tamizar a los donantes que acuden a los bancos de sangre (Guhl, 2009).

La urbanización de la enfermedad de Chagas está estrechamente relacionada con las formas de infección transfusional y congénita. Esta última se da por transmisión de la madre al infante, lo cual puede suceder en cualquier momento de la infección materna, ya sea en la fase aguda, indeterminada o crónica (Moretti *et al.*, 2007). En conjunto con la transmisión vectorial, los mecanismos anteriormente mencionados son los predominantes en comparación

con otras formas de transmisión comprobada que han sido consideradas de menor importancia desde la perspectiva de la salud pública. Sin embargo, algunas de estas han adquirido una mayor importancia epidemiológica en años recientes (Rojas, 2007).

Existe un mecanismo de transmisión por vía digestiva que puede ocurrir por la ingestión de mamíferos naturalmente infectados cuya carne ha sido sometida a un cocimiento incompleto, o bien por el consumo de alimentos contaminados con heces de triatominos o animales infectados. Adicionalmente, ha sido descrita la transmisión mediante trasplante de órganos, esto cuando el donador está infectado y el receptor es susceptible. El riesgo asociado a esta última, se ve aumentado por la inmunosupresión generada como producto de los tratamientos farmacológicos administrados para evitar el rechazo, hecho que facilita la invasión por parte del parásito (Rojas, 2007).

Otra modalidad la constituye la infección por medio de accidentes de laboratorio, al manipular muestras contaminadas, cultivos del protozoario o animales infectados. En este contexto, el empleo de prácticas adecuadas de bioseguridad, así como la competencia del personal son factores primordiales (Rojas, 2007).

II.1.3 Manifestaciones clínicas de la enfermedad

En la evolución de esta parasitosis pueden distinguirse tres fases, en las cuales la presentación clínica y criterios diagnósticos son diferentes (Arrieta *et al.*, 2004), estas corresponden a fase aguda, fase crónica indeterminada y fase crónica determinada o sintomática (Ministerio de Salud, 2011). La fase denominada como aguda se inicia desde que se adquiere la infección y tiene una duración de dos a cuatro meses. Aproximadamente un 90 % de los casos son asintomáticos o presentan una sintomatología mínima, razón por la que pueden pasar inadvertidos o pueden efectuarse diagnósticos errados (Ministerio de Salud, 2010). Cuando se manifiestan síntomas, estos varían entre fiebre, evidencias de entrada del parásito al organismo como el signo de Romana y el chagoma de inoculación, edema, compromiso cardíaco, hepatomegalia y esplenomegalia (Ministerio de Salud, 2011).

La finalización de la fase aguda da lugar al periodo crónico indeterminado o asintomático, que se caracteriza por una serología positiva con escasa o inexistente presencia de parásitos en el torrente sanguíneo. Además, no se presentan síntomas ni signos viscerales (Arrieta *et al.*, 2004), y habitualmente un 70 % de los pacientes persisten en esta condición. Se ha estimado que un 30 % de los infectados chagásicos desarrollan secuelas crónicas irreversibles (Ministerio de Salud, 2010), asociadas a alteraciones fisiopatológicas de corazón, esófago y colon. El compromiso de dichos órganos se evidencia en forma de miocardiopatías, megaesófago y megacolon (Ministerio de Salud, 2014).

II.2 Enfermedad de Chagas en Costa Rica

En el año 1941 se describen los primeros casos de enfermedad de Chagas en Costa Rica (Chinchilla *et al.*, 2006), a pesar de ello, esta zoonosis no había sido considerada como un problema de salud pública hasta el año 2002 (Ministerio de Salud, 2010). A raíz de esto, se

diseñaron y establecieron las actividades de intervención para la situación epidemiológica particular, determinada mayormente por el vector *Triatoma dimidiata* (OPS, 2003), ya que esta especie de triatomino se constituye como principal transmisor domiciliario de la enfermedad en el país (Hernández *et al.*, 2010). Este insecto se ha encontrado en todas las provincias con una tendencia a alcanzar mayores concentraciones en la parte central del territorio nacional, abarcando principalmente el sur de Alajuela y Heredia, y el norte de San José (Zeledón, 2001). En cuanto a los reservorios del parásito, se conocen en nuestro país animales domiciliarios como perros y gatos, además de animales peridomiciliarios dentro de los que se encuentran ratas, ratones y el zorro pelón (*Didelphis marsupialis*) (Farfán y Angulo, 2011).

En el marco de la Iniciativa para el Control de la Enfermedad de Chagas (IPCA), el INCIENSA desarrolló una encuesta entomológica en la cual se determinó la distribución del vector en cinco poblados, a partir de lo cual se obtuvo un 40 % de infestación correspondiente a tres comunidades estudiadas en la zona central de Costa Rica. Cabe destacar que de 12 % a 30 % de los insectos capturados se encontraban infectados con *T. cruzi* lo cual indica la importancia de las medidas de prevención y control para procurar el bienestar de las comunidades (Calvo *et al.*, 2003).

En cuanto a la prevalencia de la enfermedad, entre las décadas de los años setenta y noventa se determinó una prevalencia de 1 % a 11 %, no obstante es importante destacar que estos datos proceden de estudios puntuales realizados en diferentes zonas y grupos poblacionales. En años más recientes se efectuaron en el país varios proyectos realizados por el INCIENSA, entre ellos la realización de una encuesta serológica en 3 437 niños escolares de cinco zonas del país arrojó resultados que oscilaron entre 0,2 % y 0,5 % de prevalencia de infección por IgG anti *T. cruzi* (Calvo *et al.*, 2003). Por otro lado, en un estudio realizado con 3 630 muestras de bancos de sangre, 4,6 % resultaron positivas para la enfermedad de Chagas, lo cual corresponde a un 0,07 % de prevalencia con respecto al total de donadores tamizados. Este valor es menor a lo reportado en estudios previos para muestras provenientes de bancos de sangre (Campos-Fuentes y Calvo-Fonseca, 2013).

II.2.1 Diagnóstico y vigilancia basada en laboratorio

Para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas se requiere no solo estudiar si la persona ha estado en contacto con el vector o si ha estado relacionada con alguno de los mecanismos de transmisión alternativos, sino que además se necesita de la confirmación basada en laboratorio (Miranda *et al.*, 2010). La demostración de la presencia del parásito constituye el diagnóstico de certeza de la infección, sin embargo, esto solamente es posible de manera eficiente durante la fase aguda. Como consecuencia, en etapas posteriores el diagnóstico debe basarse en la detección de anticuerpos específicos (CeNDIE- ANLIS, 2010). Tomando esto en consideración, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha recomendado la aplicación de al menos dos técnicas serológicas de diferente fuente de antígeno (Ministerio de Salud, 2010), sugiriéndose una tercera prueba en caso de discrepancia entre las mismas (Ferrer *et al.*, 2013).

El diagnóstico basado en pruebas inmunológicas es ampliamente utilizado dado que la mayor parte de individuos infectados por *T. cruzi* desarrolla, durante la fase crónica, anticuerpos específicos contra la compleja mezcla antigénica del parásito. En dicha fase, los anticuerpos generados son predominantemente de la clase IgG, mientras que en la fase aguda que le precede, anticuerpos de clase IgM son encontrados principalmente (WHO, 2002). De hecho, la elevación de los anticuerpos IgG se ha descrito como uno de los eventos que marcan el paso a la fase crónica de la enfermedad (La Fuente, 2006).

De acuerdo con los lineamientos de la OMS, en nuestro país se utilizan pruebas parasitológicas como el Strout, que presenta aproximadamente un 100 % de sensibilidad durante la fase aguda. Esta metodología se emplea para determinar la presencia del parásito en el torrente sanguíneo después de cinco a siete días de la infección. Por otro lado, para el diagnóstico durante la fase crónica, se ha establecido la aplicación de al menos dos pruebas serológicas que presenten fuentes de antígeno diferentes. Esto debido a que las pruebas parasitológicas tienen asociada una baja sensibilidad de aproximadamente un 30 % al aplicarse para el diagnóstico de pacientes que se encuentren cursando esta fase (Ministerio de Salud, 2010). En concordancia con lo anterior, actualmente en el Centro Nacional de Referencia de Parasitología (CNRP) de INCIENSA se llevan a cabo las labores de confirmación diagnóstica de la enfermedad de Chagas mediante la aplicación de cuatro metodologías correspondientes a ELISA Lisado, ELISA Recombinante, Inmunofluorescencia indirecta (IFI) e Inmunoanálisis Quimioluminiscente de Micropartículas (CMIA).

II.2.2 Tamizaje de la enfermedad de Chagas

La aplicación de pruebas serológicas para la detección y diagnóstico de la enfermedad de Chagas se extiende a la iniciativa de tamizaje en bancos de sangre públicos y privados con el objetivo de evitar la ocurrencia de infecciones por transfusión sanguínea (Ministerio de Salud, 2010). Esta modalidad constituye la segunda forma de transmisión más importante dado que representa de un 5 % a un 20 % (Miranda *et al.*, 2010), hecho del cual se deriva la importancia de tamizar las unidades de sangre que han sido donadas y realizar la respectiva confirmación diagnóstica. Es necesario cumplir con este proceso ya que es una medida que permite evaluar las actividades de tamizaje ejecutadas por los bancos de sangre del país (Campos-Fuentes y Calvo-Fonseca, 2013).

Según lo establecido en la Norma de atención integral de la enfermedad de Chagas, los bancos de sangre deben tamizar el 100 % de donaciones sanguíneas (Ministerio de Salud, 2010), y enviar al CNRP el total de sueros determinados como positivos, así como el 5 % de los negativos, para su respectiva confirmación diagnóstica (Campos-Fuentes y Calvo-Fonseca, 2013).

La técnica empleada para el tamizaje en bancos de sangre corresponde al Inmunoanálisis Quimioluminiscente de Micropartículas ARCHITECT Chagas, el cual consiste en un inmunoensayo con una alta sensibilidad que permite detectar el marcador diana de la enfermedad de Chagas. Dado el nivel de automatización de esta metodología, es posible

ejecutar el análisis de grandes cantidades de muestras, característica primordial para un sistema de tamizaje de donaciones sanguíneas (WHO, 2010).

II.2.2.1 Inmunoanálisis Quimioluminiscente de Micropartículas ARCHITECT Chagas

El ensayo consiste en un inmunoanálisis de dos pasos que permite la detección cualitativa de anticuerpos IgG anti *Trypanosoma cruzi* en suero sanguíneo (Abbott Laboratories, 2013). En la primera etapa del proceso, se combinan la muestra, el diluyente del método y las micropartículas paramagnéticas recubiertas de antígeno recombinante de *T. cruzi*, tras lo cual los anticuerpos anti *T. cruzi* presentes en la muestra se unen a las micropartículas (Praast *et al.*, 2010). Después de ejecutar un lavado, se añade anticuerpo conjugado anti-IgG humana marcado con acridinio a la mezcla de reacción y tras otro ciclo de lavado, se añaden las soluciones preactivadora y activadora (Abbott Laboratories, 2013). La reacción quimioluminiscente resultante se mide en unidades relativas de luz (URL), estas son detectadas por el sistema óptico del analizador y se relacionan directamente con la cantidad de anticuerpos anti *T. cruzi* presentes en la muestra (Praast *et al.*, 2010).

Los resultados se expresan mediante la división de la señal (URL) generada a partir de la muestra entre el valor del punto de corte, por lo que las unidades corresponden a S/CO (muestra/punto de corte) (Praast *et al.*, 2010). Específicamente, en cuanto a la interpretación, las muestras con valores S/CO menores a 0,80 se consideran no reactivas y las muestras con valores S/CO mayores o iguales a 1,00 se consideran reactivas. Mientras que aquellas que presentan valores S/CO mayores o iguales a 0,80 pero menores a 1,00 se clasifican como indeterminadas ya que se encuentran dentro de la zona gris del ensayo (Abbott Laboratories, 2013).

La técnica ARCHITECT Chagas emplea cuatro antígenos recombinantes, a saber FP3, FP6, FP10 y TcF, que contienen 14 regiones antigénicas distintas. Dichas regiones representan las tres morfologías del ciclo biológico del parásito que constituyen las formas encontradas en el insecto vector y en el hospedador, hecho que permite su empleo en el diagnóstico de las fases aguda y crónica de la enfermedad (Iborra-Bendicho *et al.*, 2012). Esta diversidad antigénica confiere al ensayo una alta sensibilidad, cercana al 100 % (Abbott Laboratories, 2013).

II.2.3 Programa de Evaluación Externa del Desempeño del Tamizaje de la Enfermedad de Chagas

Dado el papel del CNRP en lo concerniente a la vigilancia y el control de enfermedades parasitarias, el centro desarrolla labores de aseguramiento de la calidad como lo son los programas de evaluación externa del desempeño dirigidas a los laboratorios de la red nacional diagnóstica (INCIENSA, 2014). Específicamente se ha desarrollado el Programa de Evaluación Externa del Desempeño del Tamizaje de la Enfermedad de Chagas (PEEDCH) con el objetivo de evaluar la capacidad resolutive de los bancos de sangre al analizar muestras de suero de diferente reactividad.

Este programa se dirige a 18 establecimientos públicos y privados, a los cuales se les evalúa con una periodicidad anual. En cada ronda de ensayo de aptitud se distribuyen cinco muestras de suero sanguíneo incógnitas que el personal del banco de sangre debe analizar para determinar la presencia o ausencia de anticuerpos IgG anti *T. cruzi*. En relación con lo anterior, puede describirse al PEEDCH como un programa de tipo cualitativo ya que los participantes deben evaluar la presencia o ausencia de una propiedad, determinada por la magnitud de la señal proveniente de una metodología diagnóstica (INTECO, 2016). Posteriormente son evaluados basándose en el grado de concordancia que presenten con respecto a los resultados del Laboratorio de Enfermedad de Chagas del CNRP.

El INCIENSA se encuentra en un proceso de fortalecimiento de su Sistema de Gestión de Calidad, razón por la que está destinando gran parte de sus esfuerzos hacia la reestructuración de los Programas de Evaluación Externa del Desempeño desarrollados por los centros de referencia en concordancia con la norma INTE-ISO/IEC 17043:2010 de Evaluación de la conformidad – Requisitos generales para los ensayos de aptitud. Este documento proporciona a las partes interesadas una base coherente para determinar la competencia de los proveedores de ensayos de aptitud (INTECO, 2010).

La norma introduce los conceptos de homogeneidad y estabilidad asociados al ítem de ensayo, con lo cual se pretende asegurar que los participantes reciban muestras incógnitas comparables entre sí y que estas permanezcan estables a lo largo del ensayo de aptitud (INTECO, 2010). La evaluación de estas características se establece en el apartado 4.4.3 Homogeneidad y estabilidad como parte de los requisitos que los proveedores de ensayos de aptitud deben cumplir dentro del esquema de aseguramiento de calidad de su programa.

La demostración de homogeneidad y estabilidad suficientes para el propósito del ensayo de aptitud debe basarse en argumentos técnicos o métodos estadísticos válidos, para lo cual la norma INTE/ISO 13528 proporciona soporte. Dicho documento pretende ser complementario a la norma INTE-ISO/IEC 17043:2010, dado que describe métodos estadísticos para los ensayos de aptitud cuyos resultados reportados son mediciones cuantitativas, o bien observaciones cualitativas sobre los ítems de ensayo (INTECO, 2016).

III. OBJETIVOS

III.1 Objetivo general

Evaluar los parámetros de homogeneidad y estabilidad del ítem de ensayo del Programa de Evaluación Externa del Desempeño del Tamizaje de la Enfermedad de Chagas bajo el marco de la norma INTE-ISO/IEC 17043:2010.

III.2 Objetivos específicos

1. Ejecutar la determinación experimental de homogeneidad y estabilidad del ítem de ensayo conforme a los lineamientos establecidos en la norma INTE/ISO 13528:2016.
2. Realizar la declaración de aceptación o rechazo del ítem de ensayo tomando como base los parámetros de homogeneidad y estabilidad determinados.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1 Localización

El presente proyecto se desarrolló en las instalaciones del Centro Nacional de Referencia de Parasitología, en el periodo comprendido entre febrero y setiembre del 2018. Dicho establecimiento pertenece al Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud, ubicado en Tres Ríos, Cartago.

IV.2 Obtención de muestras de suero sanguíneo

La preparación del ítem de ensayo se llevó a cabo a partir de cinco plasmas reactivos y no reactivos para la enfermedad de Chagas, los cuales provenían de donaciones sanguíneas provistas por establecimientos de la red nacional de bancos de sangre. Específicamente cuatro eran positivos para el marcador serológico correspondiente a la enfermedad de Chagas y uno era negativo.

Dichos plasmas se sometieron a un proceso de desfibrinación para la obtención de suero sanguíneo, esto mediante una secuencia de etapas de calcificación, clarificación o centrifugación, diálisis y filtración (Centro Nacional de Salud Pública, 2006). Posterior al proceso de desfibrinación, se procedió a examinar visualmente las características físicas de cada suero, verificando que estuvieran libres de hemólisis, hiperlipemia y turbiedad.

Para realizar una caracterización de las muestras, se tomaron alícuotas de 1 000 μ L de cada una y se analizaron mediante cuatro metodologías diagnósticas que consistieron en ELISA Lisado, ELISA Recombinante, IFI e Inmunoanálisis Quimioluminiscente de Micropartículas ARCHITECT Chagas. Los resultados obtenidos a partir de cada análisis se documentaron en los registros CNRP-LCH-R04: Determinación de ELISA Lisado y ELISA Recombinante, CNRP-LCH-R03: Determinación de Inmunofluorescencia indirecta para la enfermedad de Chagas y CNRP-LCH-R30: Determinación de Inmunoanálisis Quimioluminiscente de Micropartículas (ARCHITECT).

Cada uno de los cinco sueros se vertió en envases plásticos estériles y se identificó conforme a un código específico, según se indica en el Cuadro 1. Además, se adicionó el preservante Bronidox-L₅ al 5 % en una proporción de 1 μ L por cada 2 mL de suero.

Cuadro 1. Codificación asignada a los sueros sanguíneos empleados para la preparación del ítem de ensayo del PEEDCH, año 2018.

Código de muestra	Reactividad por marcador serológico de enfermedad de Chagas
Pla2018-001	Positiva
Pla2018-003	Positiva
Pla2018-006	Positiva
Pla2018-007	Positiva
Pla2018-008	Negativa

IV.3 Preparación del ítem de ensayo

Se prepararon un total de 64 alícuotas por muestra de suero, con un volumen de 500 µL cada una. Esta actividad se llevó a cabo en una cámara de bioseguridad, utilizando viales estériles y cerrando los mismos a la mayor brevedad. Posteriormente, se asignó una identificación única a cada alícuota, la cual se constituía de las siglas derivadas del programa, un número consecutivo y la indicación del año correspondiente a la ronda de ensayo de aptitud, según se presenta en la Figura 1.

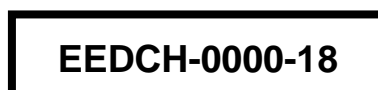


Figura 1. Etiqueta para identificación del ítem de ensayo, ronda de ensayo de aptitud del año 2018.

El consecutivo se asignó en función del número de alícuotas de cada suero, es decir que el código inicial de las alícuotas de un suero corresponde al número consecutivo inmediato al código final de las alícuotas del suero anterior. Siguiendo el orden indicado, en el Cuadro 2 se presenta la codificación asignada a los ítems de ensayo del programa.

Cuadro 2. Asignación de códigos a alícuotas generadas a partir de los sueros sanguíneos empleados para la preparación del ítem de ensayo del PEEDCH, año 2018.

Identificación de muestra	Codificación	
	Código inicial	Código final
Pla2018-001	EEDCH-0001-18	EEDCH-0064-18
Pla2018-003	EEDCH-0065-18	EEDCH-0128-18
Pla2018-006	EEDCH-0129-18	EEDCH-0192-18
Pla2018-007	EEDCH-0193-18	EEDCH-0256-18
Pla2018-008	EEDCH-0257-18	EEDCH-0320-18

La tapa de cada vial se selló con una sección de papel parafinado, y estos se colocaron en cajas de cartón provistas con divisiones. Cada caja se rotuló con la identificación de la muestra de suero, el código (inicial y final) de los viales preparados y la fecha de elaboración correspondiente.

Previo al almacenamiento del ítem de ensayo a una temperatura de -32 °C a -26 °C, se apartaron las alícuotas seleccionadas para realizar las pruebas de homogeneidad y estabilidad, según se indica en los apartados siguientes.

IV.4 Evaluación de homogeneidad

En lo concerniente a la prueba de homogeneidad, el diseño experimental se realizó según el Anexo B – Homogeneidad y estabilidad para ítems de ensayo de aptitud, apartados B.1 Procedimiento general para la verificación de homogeneidad, B.2 Criterio de evaluación para la revisión de homogeneidad y B.3 Fórmulas para la revisión de homogeneidad de la norma INTE/ISO 13528:2016.

Los análisis fueron llevados a cabo por personal técnico del CNRP, utilizando el analizador ARCHITECT *i1000*_{SR} del Laboratorio de Enfermedad de Chagas. Para ello se seleccionaron diez alícuotas de cada muestra de suero de manera aleatoria mediante la aplicación de la fórmula =ALEATORIO.ENTRE(#inicial;#final) en el software comercial Excel. Específicamente, “# inicial” hace referencia al número consecutivo asignado al vial inicial de la muestra de suero y “# final” se refiere al número consecutivo asignado al último vial. Estas se dividieron en dos porciones o submuestras de igual volumen para la obtención de 20 submuestras correspondientes a cada suero y 100 submuestras en total.

Las submuestras generadas se colocaron en viales etiquetados con la identificación de la muestra de suero de la cual provenía el ítem de ensayo, el código de alícuota y el número de submuestra, según puede observarse en la Figura 2. Dichos viales se almacenaron en una caja provista con divisiones y debidamente identificada conforme a su uso previsto (ver Anexo 1).

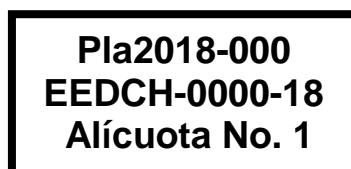


Figura 2. Etiqueta para identificación de submuestras derivadas del ítem de ensayo.

Se procedió a analizar las submuestras bajo condiciones de repetibilidad, específicamente empleando el mismo procedimiento de medición, analista, equipo de medición y lote de reactivos. Aunado a ello, los análisis de submuestras provenientes de la misma muestra de suero se ejecutaron en un solo día.

Una vez obtenidos los resultados de S/CO (muestra/punto de corte), se realizaron los cálculos respectivos para la determinación de la media general (\bar{x}), la desviación estándar dentro de la muestra (s_w) y la desviación estándar entre muestras (s_b) (INTECO, 2016).

Para determinar si los ítems de ensayo podían considerarse suficientemente homogéneos, se comparó la desviación estándar entre muestras (s_b) con el criterio del error máximo permisible (δ_E), esto según se indica en la Figura 3. De acuerdo con el fabricante, el ensayo ARCHITECT Chagas ha sido diseñado para tener una imprecisión tal que el coeficiente de variación total sea menor o igual a un 15 % para muestras cuyos valores se encuentren en el

intervalo 1,00 S/CO a 4,00 S/CO (Abbott Laboratories, 2013), esta medida de imprecisión se equipara con el error máximo permisible mencionado en la norma INTE/ISO 13528:2016. Dado el hecho de que los resultados generados se expresan en S/CO y el error permisible corresponde a un porcentaje, se aplicaron los cálculos respectivos para que los valores fueran comparables. La estimación de los estadísticos antes mencionados se describe en el Anexo 2.

$$s_s \leq 0,1 \delta_E$$

Figura 3. Criterio de evaluación para la determinación de homogeneidad del ítem de ensayo. Fuente: INTECO (2016).

Además, como criterios alternativos para determinar la homogeneidad, se aplicó una prueba F de un análisis de varianza con $\alpha = 0,05$ (INTECO, 2016) y se calculó el coeficiente de variación (CV) en el software Excel.

IV.5 Evaluación de estabilidad

Para la prueba de estabilidad, el diseño experimental se realizó según el Anexo B – Homogeneidad y estabilidad para ítems de ensayo de aptitud, apartados B.4 Procedimiento para la revisión de estabilidad, B.5 Criterio de evaluación para la revisión de estabilidad y B.6 Estabilidad en condiciones de transporte de la norma INTE/ISO 13528:2016.

Se planteó llevar a cabo la evaluación de una muestra de ítems de ensayo una vez se finalizara la ronda del PEEDCH y compararla contra ítems de ensayo evaluados previo al inicio de la ronda (INTECO, 2016). Para tal fin, se utilizaron los resultados derivados de la revisión de homogeneidad, la cual se realizó antes del periodo de distribución del ítem de ensayo a los participantes del programa.

De manera aleatoria, se seleccionaron diez alícuotas de cada muestra de suero mediante la aplicación de la fórmula =ALEATORIO.ENTRE(#inicial;#final) en el software comercial Excel, se excluyeron de este proceso los consecutivos de las alícuotas empleadas para la revisión de homogeneidad. Con el objetivo de contemplar el efecto del transporte sobre el ítem de ensayo, una parte de las alícuotas se sometió al proceso de envío y retorno ejecutado por parte de la empresa que distribuye los materiales de la evaluación del desempeño. Se envió una alícuota en cada una de las ocho rutas de distribución en las que se encuentran incluidos los 18 participantes del PEEDCH, durante el transporte las muestras se mantuvieron dentro de recipientes de poliestireno con geles refrigerantes que permitieran mantener un rango de temperatura de -1 °C a 10 °C. Las dos alícuotas restantes se mantuvieron almacenadas por separado en el CNRP bajo condiciones de congelación y refrigeración. El detalle de las condiciones mencionadas se presenta en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Condiciones ambientales contempladas en la evaluación de la estabilidad de diez alícuotas por suero sanguíneo.

Alícuota	Tipo de condición	Descripción (Ruta de distribución / Rango de temperatura)
A	Transporte	Metropolitana 1
B	Transporte	Metropolitana 2
C	Transporte	Atlántica
D	Transporte	San Carlos
E	Transporte	Brunca
F	Transporte	Metropolitana 3
G	Transporte	Alajuela - Heredia
H	Transporte	Guanacaste
I	Almacenamiento	-32 °C a -26 °C
J	Almacenamiento	-1 °C a 8 °C

La prueba de estabilidad se llevó a cabo una vez cerrado el plazo de dos semanas establecido para la entrega de resultados por parte de los participantes. Previamente, el volumen de los viales se dividió en dos partes iguales para la generación de 20 submuestras por muestra de suero y 100 submuestras en total. Cada porción se rotuló con la identificación de la muestra de suero correspondiente, el código de alícuota y el número de submuestra, según se presenta en la Figura 2. Estas se almacenaron en una caja provista con divisiones y debidamente identificada conforme a su uso previsto (ver Anexo 3).

Los análisis fueron ejecutados por el personal técnico que llevó a cabo las pruebas de homogeneidad, empleando el analizador ARCHITECT *i1000_{SR}* del Laboratorio de Enfermedad de Chagas. A partir de los resultados obtenidos se calculó la media general (\bar{y}_2) para ser comparada con la media del grupo de datos derivados de la revisión de homogeneidad (\bar{y}_1). La comparación se realizó de acuerdo con el criterio indicado en la Figura 4.

$$|\bar{y}_1 - \bar{y}_2| \leq 0,1\delta_E$$

Figura 4. Criterio de evaluación para la determinación de estabilidad del ítem de ensayo. Fuente: INTECO (2016).

La norma INTE/ISO 13528:2016 señala a una prueba *t* para una diferencia significativa con un 95 % de confianza como un análisis estadístico adecuado para detectar una posible inestabilidad del ítem de ensayo, por lo que se ejecutó dicha prueba como método alternativo.

V. RESULTADOS

V.1 Caracterización de sueros sanguíneos

Se analizaron los sueros mediante la aplicación de cuatro metodologías diagnósticas distintas, los resultados obtenidos se presentan a continuación en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Análisis preliminar de cinco muestras de suero empleadas como fuente del ítem de ensayo.

Código de muestra	Resultados							
	ARCHITECT		ELISA Lisado		ELISA Recombinante		IFI	
	S/CO	Punto de corte	DO	Punto de corte	DO	Punto de corte	Título	Punto de corte
Pla2018-001	7,660	1,000	0,703	0,196	1,177	0,299	1/40	1/40
Pla2018-003	14,600	1,000	1,236	0,207	3,254	0,300	1/640	1/40
Pla2018-006	6,130	1,000	0,640	0,207	1,565	0,300	1/40	1/40
Pla2018-007	3,870	1,000	0,810	0,212	1,636	0,299	1/160	1/40
Pla2018-008	0,260	1,000	0,041	0,212	0,040	0,299	<1/20	1/40

S/CO: muestra/punto de corte, DO: densidad óptica.

Al comparar las diferentes metodologías serológicas, se evidenció la obtención de resultados concordantes para todas las muestras analizadas. Además, no se presentaron resultados indeterminados en las técnicas de ELISA Recombinante y ARCHITECT Chagas.

V.2 Evaluación de homogeneidad

A partir de los resultados de cada submuestra procedente de los ítems de ensayo, se determinaron los parámetros estadísticos mostrados en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Estimación de medidas de tendencia central y dispersión para la revisión de homogeneidad de cinco sueros sanguíneos.

Código de muestra	Parámetros estadísticos		
	Media general (\bar{x})	DE dentro de la muestra (s_w)	DE entre muestras (s_s)
Pla2018-001	7,832	0,618	0,123
Pla2018-003	14,090	0,614	0,643
Pla2018-006	6,495	0,180	0,234
Pla2018-007	4,207	0,134	0,123
Pla2018-008	0,064	0,005	0,002

DE: Desviación estándar.

Para realizar la comparación requerida, el porcentaje de error permisible correspondiente a un 15 % se expresó en valores de S/CO según puede apreciarse en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Aplicación del criterio de evaluación correspondiente a la revisión de homogeneidad.

Código de muestra	δ_E	$0,1 \delta_E$	Comparación	Interpretación
Pla2018-001	1,175	0,117	$s_s > 0,1 \delta_E$	No se cumple
Pla2018-003	2,114	0,211	$s_s > 0,1 \delta_E$	No se cumple
Pla2018-006	0,974	0,097	$s_s > 0,1 \delta_E$	No se cumple
Pla2018-007	0,631	0,063	$s_s > 0,1 \delta_E$	No se cumple
Pla2018-008	0,010	0,001	$s_s > 0,1 \delta_E$	No se cumple

δ_E : Error máximo permisible.

El criterio de aceptación no se cumplió para los sueros sanguíneos evaluados, por lo que según este método de análisis los ítems de ensayo no se consideran adecuadamente homogéneos. De acuerdo con recomendaciones de la norma INTE/ISO 13528:2016 para este tipo de escenario, se llevó a cabo una prueba F , la cual evidenció diferencias estadísticamente significativas entre las varianzas de los sueros Pla2018-003 y Pla2018-006. Los valores obtenidos se presentan en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Prueba F de valores de S/CO obtenidos a partir de análisis de submuestras de ítems de ensayo.

Código de muestra	Probabilidad	F	Valor crítico para F
Pla2018-001	0,544	0,921	3,020
Pla2018-003	0,042	3,200	3,020
Pla2018-006	0,015	4,368	3,020
Pla2018-007	0,069	2,698	3,020
Pla2018-008	0,300	1,407	3,020

Además, se determinó el coeficiente de variación de cada juego de datos como medida adicional para valorar la variabilidad de las muestras con respecto al criterio del fabricante, en el Cuadro 8 se observan los valores obtenidos.

Cuadro 8. Estimación de coeficientes de variación derivados del análisis de submuestras de ítems de ensayo.

Código de muestra	Coefficiente de variación (%)
Pla2018-001	5,354
Pla2018-003	5,508
Pla2018-006	4,095
Pla2018-007	3,695
Pla2018-008	7,179

V.3 Evaluación de estabilidad

Tras el cierre del periodo para la recepción de resultados de los participantes del PEEDCH, se analizaron las alícuotas sometidas a diferentes condiciones de transporte y almacenamiento.

Se procedió a calcular la media general para realizar la comparación de valores con respecto al primer grupo de datos derivados de la revisión previa a la distribución y aplicar el criterio correspondiente, esta información se presenta a continuación en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Aplicación del criterio de evaluación correspondiente a la evaluación de la estabilidad.

Código de muestra	Media general (\bar{y}_2)	$ \bar{y}_1 - \bar{y}_2 $	$0,1 \delta_E$	Comparación	Interpretación
Pla2018-001	7,471	0,361	0,117	$ \bar{y}_1 - \bar{y}_2 > 0,1 \delta_E$	No se cumple
Pla2018-003	13,397	0,693	0,211	$ \bar{y}_1 - \bar{y}_2 > 0,1 \delta_E$	No se cumple
Pla2018-006	6,412	0,083	0,097	$ \bar{y}_1 - \bar{y}_2 < 0,1 \delta_E$	Se cumple
Pla2018-007	3,825	0,382	0,063	$ \bar{y}_1 - \bar{y}_2 > 0,1 \delta_E$	No se cumple
Pla2018-008	0,067	0,003	0,001	$ \bar{y}_1 - \bar{y}_2 > 0,1 \delta_E$	No se cumple

\bar{y}_1 : Media general de revisión previa a la distribución, \bar{y}_2 : Media general de revisión de estabilidad, δ_E : Error máximo permisible.

Mediante este método de evaluación de estabilidad, únicamente el suero Pla2018-006 cumplió con el criterio, por lo que se clasificó como suficientemente estable. Por otro lado, mediante la ejecución de una prueba t , se determinó que no existían diferencias significativas entre las medias de los dos grupos de datos correspondientes a los sueros Pla2018-006 y Pla2018-008. Los resultados derivados de dicho análisis pueden observarse en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Prueba t para comparación de análisis efectuados de forma previa y posterior a la distribución del ítem de ensayo.

Código de muestra	Probabilidad $P(T \leq t)$ dos colas	Estadístico t	Valor crítico de t (dos colas)
Pla2018-001	0,036	2,263	2,101
Pla2018-003	0,024	2,459	2,101
Pla2018-006	0,516	0,662	2,101
Pla2018-007	0,002	3,724	2,101
Pla2018-008	0,216	-1,282	2,101

VI. DISCUSIÓN

VI.1 Análisis preliminar de muestras de suero para la preparación del ítem de ensayo

El diagnóstico de la enfermedad de Chagas es complejo, tanto en laboratorios de diagnóstico, como en aquellos establecimientos que llevan a cabo labores de tamizaje (Bergmann & Aires, 2013). Este escenario está definido por la inexistencia de una prueba diagnóstica que clasifique a un individuo como seropositivo o seronegativo para la enfermedad de Chagas con parámetros de sensibilidad y especificidad que alcancen porcentajes de 100 % (Pereira *et al.*, 2012). Es decir que las técnicas disponibles no han llegado a cumplir las características de un patrón de referencia o estándar de oro (*gold standard*) (Balouz *et al.*, 2017). Como resultado, se ha establecido un diagnóstico basado en dos o más pruebas serológicas de diferentes principios o antígenos, recomendándose el uso de una tercera en caso de discrepancias (Levy *et al.*, 2009).

Una gran parte de los métodos comerciales disponibles están basados en la utilización de antígenos recombinantes los cuales ofrecen la ventaja de minimizar los posibles problemas de baja especificidad. Este hecho adquiere relevancia si se toma en consideración que infecciones endémicas de las mismas regiones, como la leishmaniosis, pueden generar reacciones cruzadas. Sin embargo, generalmente estas técnicas tienen asociada una sensibilidad menor en comparación con aquellas que emplean el parásito completo como fuente de antígeno (Balouz *et al.*, 2017).

Dada la complejidad inherente al diagnóstico de la enfermedad de Chagas, puede vislumbrarse la importancia de caracterizar las muestras de suero que se emplean como fuente del ítem de ensayo mediante la aplicación de diferentes metodologías serológicas. En este caso, los ensayos de ELISA Recombinante y ARCHITECT Chagas han sido diseñados con antígenos recombinantes como parte de su principio de funcionamiento (Wiener Laboratorios, 2000; Iborra-Bendicho *et al.*, 2012), mientras que en el ensayo de ELISA Lisado se utilizan antígenos que corresponden a zonas altamente conservadas entre distintas cepas del parásito (Wiener Laboratorios, 2000). Por otro lado, la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) es de tipo convencional y para la detección de los anticuerpos diana se emplea todo el parásito como fuente de antígeno (Comité de expertos de la OMS, 2002). Cada una de estas cuatro pruebas presenta características que les confieren distintos niveles de sensibilidad y especificidad, por lo que aplicadas en conjunto a los sueros analizados, permitieron generar un diagnóstico serológico certero basado en una concordancia del 100 % en cuanto a la reactividad de las muestras.

VI.2 Evaluación de homogeneidad del ítem de ensayo

La revisión de homogeneidad debe realizarse una vez que los ítems de ensayo han sido empacados en su forma final y de manera previa a la distribución a los participantes del programa, esto con el fin de contemplar un posible efecto del embalaje sobre las muestras (INTECO, 2010; Chabirand *et al.*, 2014). De acuerdo con lo anterior, los ítems de ensayo evaluados en la revisión de homogeneidad habían sido seccionados en volúmenes de 500 μ L,

colocados en viales estériles, sellados con papel parafinado y rotulados con la codificación respectiva. Esta corresponde a la presentación final en la que son distribuidos a los bancos de sangre participantes.

Se prepararon un total de 64 alícuotas por muestra de suero, contemplando el número de ítems de ensayo que debían ser analizados en las verificaciones de homogeneidad y estabilidad. Así como la cantidad requerida para distribuir a los participantes y un excedente para posibles solicitudes de reemplazo de incógnitas. Se seleccionaron diez ítems de ensayo por suero sanguíneo según se recomienda en la norma INTE/ISO 13528:2016, la cual indica que el número evaluado podría ser menor en caso de que se disponga de datos de revisiones anteriores de ítems de ensayo preparados siguiendo los mismos procedimientos (INTECO, 2016). Dado que la metodología de ARCHITECT Chagas es de reciente implementación en el proceso de tamizaje de la enfermedad de Chagas y que por ende, esta correspondía a la primera ronda de ensayo de aptitud en la que se evaluaba a los participantes con este método, se siguió el lineamiento de evaluar una mayor cantidad de incógnitas.

Aunado a ello, se ha recomendado el análisis de diez muestras para matrices en las que puedan generarse grandes impactos derivados de una falta de homogeneidad, como cambios en el valor asignado (Chabirand *et al.*, 2014). Existen diversos factores que pueden afectar la homogeneidad del ítem de ensayo, los cuales varían dependiendo del área en la que se desarrolla el programa de comparaciones interlaboratoriales y el objetivo de este. De forma general, como posibles fuentes de heterogeneidad deberían considerarse el procedimiento para la preparación y embalaje de las incógnitas, así como la metodología aplicada para la segregación de las muestras y respectiva generación de submuestras, ambos procesos requieren grados de documentación y detalle tales que permitan una ejecución controlada. Además, es importante conocer la matriz que alberga el analito de interés de la revisión de homogeneidad, dado que esta podría introducir variaciones relacionadas con otros componentes que interfieran con la señal generada (Lafargue *et al.*, 2004). Asimismo, el análisis de esta cantidad de muestras, o inclusive un número mayor se recomienda para matrices en las que pueda haber una heterogeneidad inherente (Chabirand *et al.*, 2014). Ejemplo de ello lo constituyen materiales como hormigón y concreto (Kimhi *et al.*, 2006), o bien muestras de suelo, que por su naturaleza y distribución de componentes podrían presentar una mayor variabilidad asociada.

En el caso particular de la metodología ARCHITECT Chagas, el fabricante indica que para la obtención de resultados exactos, las muestras no deben presentar fibrina, eritrocitos ni partículas en suspensión (Abbott Laboratories, 2013). Los sueros empleados fueron obtenidos mediante procesos de desfibrinación y se sometieron a una revisión para determinar la ausencia de hemólisis y turbiedad, esto sumado a la experiencia que posee el personal del CNRP en cuanto a la manipulación y análisis de sueros sanguíneos como matriz, sustentan el hecho de que no se esperara un efecto de heterogeneidad dada por la matriz. Sin embargo, se ejecutó la evaluación de diez alícuotas para poder realizar un análisis estadístico representativo, considerando además, que el análisis de una menor cantidad de ítems de ensayo podría disminuir la probabilidad de detección (Tholen *et al.*, 2006).

Según lo requerido por la normativa, los análisis se realizaron bajo condiciones de repetibilidad. Dichas condiciones incluyen pero no se limitan al mismo procedimiento de medición, observador, instrumento de medición, condiciones ambientales, lugar y repetición en un periodo corto de tiempo. La ejecución de ensayos de esta forma previene la inclusión de fuentes de variación diferentes al sistema de medición empleado (Portuondo y Portuondo, 2010).

El estadístico de desviación estándar entre muestras (s_s) determinado a partir del conjunto de datos generados, debe compararse en primera instancia con la desviación típica para la evaluación de aptitud (σ_{pt}). El establecimiento de este valor permite delimitar la variación que puede considerarse como aceptable para los resultados reportados por los participantes, y la norma indica distintos métodos para su estimación. Uno ampliamente utilizado consiste en determinar el valor a partir de la dispersión existente entre los resultados reportados por los participantes en la ronda actual o en rondas previas (Noblett, 2012). La aplicación de este método podría resultar inadecuado para un número limitado de participantes, como es el caso del PEEDCH, dado que los estadísticos determinados a partir de un número reducido de resultados pueden no ser suficientemente confiables (INTECO, 2016). Por esta razón y por la ausencia de datos de rondas anteriores, se utilizó el error máximo permisible (δ_E) como base para el criterio de evaluación de homogeneidad.

Este concepto puede definirse como un error de medida, que ha sido establecido con respecto a un valor cuantitativo de referencia, permitido por especificaciones para una medición o instrumento de medida dado (INTECO, 2016). Para el ensayo de ARCHITECT Chagas se ha determinado una imprecisión total de un 15 %, la cual consiste en una combinación de la intraserial, interserial e interdiaria. Dicho valor fue reportado por parte del fabricante, como resultado de un estudio de precisión ejecutado según los lineamientos de la guía EP5-A2 del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (Abbott Laboratories, 2013).

Al aplicar el criterio de evaluación correspondiente, se determinó que ninguno de los cinco sueros cumplía con el mismo (ver Cuadro 6), por lo que no puede asegurarse que los ítems de ensayo sean lo suficientemente homogéneos. El método empleado se basa en comparar la variabilidad de las muestras ensayadas contra una fracción del criterio de evaluación (Tholen *et al.*, 2014), que en este caso correspondía al error máximo permisible. Ante un incumplimiento de este criterio de verificación, la norma indica que el proveedor puede incluir la desviación estándar entre muestras (s_s) en la incertidumbre del valor asignado al ítem de ensayo (INTECO, 2016), sin embargo, el método de ensayo del PEA radica en una detección cualitativa por lo que no procede tal acción.

Una alternativa para la verificación de homogeneidad, se basa en un análisis de varianza, en el cual se ensaya un número adecuado de muestras por duplicado. La relación de las varianzas entre muestras y las varianzas entre réplicas se utiliza en un estadístico F evaluado con un nivel de significancia de 0,05 (Tholen, 1998; INTECO, 2016). Siguiendo recomendaciones de la norma, se realizó una prueba F que permitió determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las varianzas de las alícuotas correspondientes a los sueros Pla2018-003 y Pla2018-006 (ver Cuadro 7). Los valores del estadístico F para ambos

sueros fueron mayores con respecto al valor crítico para F , lo cual se interpreta como evidencia de que las varianzas entre los grupos de réplicas evaluados son desiguales. Asimismo, la probabilidad (valor p) estimada resultó ser menor a 0,05 en los dos casos, y dado que esta está asociada con la hipótesis de que las diferencias observadas se deben al azar, el hecho de obtener valores tan pequeños permite rechazar dicha explicación (LeBlanc, 2004).

Como fuente de información adicional con respecto a la variabilidad de los sueros, se calcularon los coeficientes de variación de los mismos (ver Cuadro 8) y se compararon con lo reportado por el fabricante. En todos los casos el porcentaje estimado resultó ser menor con respecto al 15 % derivado del estudio de imprecisión (Abbott Laboratories, 2013), por lo que se cumple el parámetro determinado por el fabricante como parte de las características específicas de funcionamiento del método.

A pesar del incumplimiento del criterio de evaluación de homogeneidad y de la determinación de diferencias significativas en las varianzas de dos de los sueros, en todos los casos, los resultados demostraron ser consistentes en cuanto a reactividad (positividad/negatividad). Con respecto a esto, el documento INTE/ISO 13528:2016 indica que para aquellos ensayos de aptitud que evalúan propiedades medidas en escalas cualitativas, la demostración de homogeneidad debería evidenciar que la totalidad de los ítems de ensayo presentan los valores esperados para la propiedad bajo estudio. En el caso de algunas propiedades de tipo cualitativo, es posible verificar la homogeneidad mediante análisis cuantitativos, para lo cual una prueba convencional de evaluación como la aplicada, resulta apropiada. O bien, se considera aceptable una demostración de que todos los resultados están por encima o por debajo de un valor de corte establecido (INTECO, 2016).

En ese mismo sentido, se ha señalado que es posible considerar muestras como suficientemente homogéneas aunque estas no lo sean estrictamente en términos de los resultados cuantitativos generados. Cabe mencionar que cualquier muestra que presente defectos de homogeneidad en cuanto a propiedades de tipo cualitativo, debería ser excluida del proceso de evaluación del desempeño de los participantes (Chabirand *et al.*, 2014).

VI.3 Evaluación de estabilidad del ítem de ensayo

El procedimiento básico para revisión de estabilidad indicado en la norma INTE/ISO 13528:2016 establece que se debe analizar una cantidad $2g$ de ítems de ensayo, con $g \geq 2$ (INTECO, 2016). Para esta evaluación se analizaron diez alícuotas por suero sanguíneo, cada una por duplicado, para disponer de la misma cantidad de datos con respecto a la verificación de homogeneidad.

Ha sido ampliamente señalado que las condiciones de transporte podrían constituirse en un importante factor que influya en la estabilidad del ítem de ensayo, por lo que como parte del diseño experimental podría incluirse una comprobación adicional por algún efecto generado a raíz de dichas condiciones (INTECO, 2016; Chabirand *et al.*, 2014). Algunos modelos de estudio se basan en emular las condiciones de transporte o en someter las incógnitas a factores

que puedan favorecer o acelerar cambios para proveer una mayor garantía sobre su estabilidad (INTECO, 2016). En este caso particular, una parte de las muestras evaluadas fueron sometidas a condiciones reales de transporte de forma que los resultados reflejaran fielmente cualquier efecto que pudiera manifestarse en las incógnitas distribuidas a los bancos de sangre. Adicionalmente, otra parte fue almacenada en refrigeración y congelación que corresponden a las condiciones que usualmente se emplean para la conservación de muestras de suero sanguíneo.

Mediante la comparación de la diferencia entre las medias de los conjuntos de datos previos y posteriores a la distribución contra una fracción del error máximo permisible, se determinó que únicamente el suero Pla2018-006 podía ser considerado como suficientemente estable (ver Cuadro 9). Ante el incumplimiento del criterio de evaluación la norma indica que podrían tomarse distintas medidas, siendo una de estas la cuantificación del efecto de la inestabilidad para contemplarlo en la incertidumbre del valor asignado (INTECO, 2016; INTECO, 2010). Tal y como se mencionó anteriormente, el método de ensayo es de tipo cualitativo, por lo que no se asocia una incertidumbre cuantitativa al valor asignado, dentro de la que se pueda incluir la inestabilidad del ítem de ensayo.

La aplicación de una prueba estadística adecuada para identificar diferencias entre dos conjuntos de datos constituye una alternativa para este tipo de evaluación, por lo que se realizó una prueba *t* a partir de las medias de los dos conjuntos de datos (ver Cuadro 10). Este análisis permitió determinar que dos de los sueros no presentaban diferencias significativas en sus medias, específicamente el suero Pla2018-006, observación que concuerda con lo indicado según comparación con el error máximo permitido, y el suero Pla2018-008. Los valores de probabilidad en ambos casos fueron mayores a 0,05 por lo que se acepta el supuesto de que la diferencia entre las medias de los conjuntos de datos evaluados puede deberse a errores aleatorios. Esta interpretación también puede hacerse a partir del estadístico *t*, cuyo valor para ambos sueros fuer mayor que el valor crítico de *t* (Harris, 2007).

Los análisis cuantitativos realizados determinaron un nivel de estabilidad adecuado en solamente dos de los sueros evaluados, no obstante, las revisiones experimentales de este parámetro pueden limitarse a la revisión de un cambio significativo del ítem en el desarrollo de la ronda del ensayo de aptitud. Esto cuando la inestabilidad del ítem sea improbable, supuesto que puede derivarse de estudios experimentales anteriores, experiencia o conocimiento previo de la matriz y del mensurando (INTECO, 2016). La experiencia adquirida en el CNRP en lo concerniente a la manipulación y conservación de muestras de suero ha permitido determinar que los anticuerpos IgG que constituyen el analito de interés de las técnicas serológicas ejecutadas como parte de la rutina, son biomoléculas estables bajo condiciones adecuadas de refrigeración y congelación.

La recomendación universal indica que las muestras de suero se limiten al mínimo de ciclos de congelación/descongelación para evitar alteraciones de las biomoléculas presentes (Castejon, 2017). Basándose en esto, se procura que las muestras incógnitas del PEEDCH no sufran múltiples procesos de congelación y descongelación para prevenir que se vea comprometida la conservación de los anticuerpos. Las medidas establecidas para manipular

las muestras y el empleo de equipo bajo estrictos controles metrológicos en el CNRP, sumado a revisiones de literatura que señalan la afectación mínima de inmunoglobulinas IgG e IgM en sueros sometidos a los factores antes mencionados (Castejon, 2017; Castro & Jost, 2013), proveen justificaciones técnicas que sustentan la apreciación de que las incógnitas mantienen una estabilidad suficiente para el uso previsto.

VII. CONCLUSIONES

El método de análisis basado en la comparación de la desviación estándar entre muestras (s_s) con una fracción del error máximo permisible (δ_E) y la aplicación de la prueba F permitieron detectar indicios de heterogeneidad en términos cuantitativos, en la totalidad y en parte de los sueros sanguíneos evaluados respectivamente. Sin embargo, tomando como base la obtención de valores de coeficientes de variación concordantes con las especificaciones del fabricante del sistema de medición y el hecho de que no se presentaron variaciones que afectaran la propiedad cualitativa de reactividad de las muestras, pueden aceptarse los sueros como ítem de ensayo del Programa de Evaluación Externa del Desempeño del Tamizaje de la Enfermedad de Chagas.

Las diferencias existentes entre las medias del conjunto de datos obtenidos previo a la distribución de los materiales del PEEDCH y del conjunto de datos derivados del análisis realizado posteriormente, evaluadas en comparación con una fracción del error máximo permisible y mediante el estadístico t , indicaron que algunos sueros sanguíneos no presentaban una estabilidad suficiente en términos cuantitativos. No obstante, al considerar la experiencia adquirida en el CNRP en cuanto al manejo y conservación de este tipo de matriz, así como la ausencia de cambios significativos en cuanto a la propiedad cualitativa de reactividad del ítem de ensayo, es posible aceptar el grado de estabilidad evidenciado para el uso previsto.

VIII. RECOMENDACIONES

Tomando en consideración el hecho de que se empleó el valor del error máximo permisible (δ_E) reportado por el fabricante como base para aplicar los criterios de evaluación de las revisiones de homogeneidad y estabilidad, se recomienda que para futuras determinaciones de estos parámetros se utilice el valor derivado de la evaluación de precisión que se realice como parte del proceso de verificación del método ARCHITECT Chagas que se tiene previsto. De esta manera, podrían evaluarse la homogeneidad y estabilidad del ítem de ensayo con respecto al parámetro de desempeño de la metodología establecido bajo las condiciones específicas del Laboratorio de Enfermedad de Chagas del CNRP.

En estrecha relación con la precisión de la técnica, podría evaluarse el rango de concentraciones del analito que rodean al punto de corte, el cual se ha denominado intervalo C_5 - C_{95} . El establecimiento de dicho intervalo para el método ARCHITECT Chagas permitiría conocer las lecturas de S/CO para las que se puede esperar obtener resultados consistentemente negativos o consistentemente positivos, información que formaría parte de los criterios a considerar para la selección del ítem de ensayo.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Abbott Laboratories. (2013). *ARCHITECT SYSTEM. Chagas*. Wiesbaden, Germany: Abbott Laboratories. 7 p.
- Arrieta, R., Daquino, B., Rosso, N., Ferreras, M.G. y Juárez, N. (2004). Evaluación de una metodología de tamizaje en la enfermedad de Chagas en San Luis, Argentina. *Salud Pública de México*, 46(5), 430-437.
- Balouz, V., Agüero, F. & Buscaglia, C.A. (2017). Chagas disease diagnostic applications: present knowledge and future steps. *Advances in Parasitology*, 97, 1-45.
- Bergmann, A.A. & Aires, B.M.E. (2013). Conventional serological performance in diagnosis of Chagas' disease in southern Brazil. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 17(2), 174-178.
- Bern, C., Kjos, S., Yabsley, M.J. & Montgomery, S.P. (2011). *Trypanosoma cruzi* and Chagas' Disease in the Unites States. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(4), 655-681.
- BID/OPS/IDRC/CNZ. (2011). *Programa Regional para el Control de la Enfermedad de Chagas en América Latina. Iniciativa de Bienes Públicos Regionales*. Montevideo, Uruguay: BID. 248 p.
- BID/OPS/IDRC/CNZ. (2010). *Programa Regional para el Control de la Enfermedad de Chagas en América Latina. Lineamientos y Recomendaciones Técnicas y de Política Pública para el abordaje de la Enfermedad de Chagas*. Montevideo, Uruguay: BID. 84 p.
- Calvo, N., Zeledón, R., Barboza, M.P., Sánchez, G. y Navas, L. (2003). Encuesta Serológica y Entomológica para la Enfermedad de Chagas en Costa Rica, 2001-2002. *Boletín Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud*, 15(3), 4-5.
- Campos-Fuentes, E. y Calvo-Fonseca, N. (2013). Confirmación diagnóstica del tamizaje de enfermedad de Chagas en Costa Rica. *Revista Costarricense de Salud Pública*, 22(1), 4-8.
- Castejon, M.J., Yamashiro, R., Oliveira, C.C., Oliveira, E.L., Silveira, P.R. & Oliveira, C.A.F. (2017). Effect of multiple freeze-thaw cycles on the stability of positive anti-treponemal serum samples. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 53(4), 246-251.
- Castro, A.R. & Jost, H.A. (2013). Effect of Multiple Freeze and Thaw Cycles on the Sensitivity of IgG and IgM Immunoglobulins in the Sera of Patients With Syphilis. *Sexually Transmitted Diseases*, 40(11), 870-871.
- Center for Food Security & Public Health. (2017). *American Trypanosomiasis*. Ames, Iowa: Iowa State University. 12 p.
- Centro Nacional de Diagnóstico e Investigación de Endemoepidemias- ANLIS. (2010). *Síntesis de la Guía de Diagnóstico y Tratamiento de Pacientes con Enfermedad de Chagas. Programa Nacional de Chagas*. Argentina: Ministerio de Salud de la Nación. 24 p.

- Centro Nacional de Salud Pública. (2006). *Elaboración de Paneles de Sueros para la Evaluación Externa del Desempeño en Inmunoserología*. Perú: Instituto Nacional de Salud. 10 p.
- Chabirand, A., Anthoine, G., Pierson, O. & Hostachy, B. (2014). The organization of proficiency testing in plant pathology (qualitative methods of analysis) according to the ISO/IEC 17043: example of the French national reference laboratory. *Accreditation and Quality Assurance*, 19, 111-125.
- Chinchilla, M., Castro, A., Reyes, L., Guerrero, O., Calderón-Arguedas, O. y Troyo, A. (2006). Enfermedad de Chagas en Costa Rica: Estudio comparativo en dos épocas diferentes. *Parasitología Latinoamericana*, 61, 138-145.
- Comité de expertos de la OMS. (2002). *Control de la Enfermedad de Chagas: Segundo informe del comité de expertos de la OMS*. Ginebra, Suiza: Organización Mundial de la Salud. 124 p.
- Farfán, G.A.E. y Angulo, S.V.M. (2011). Conducta alimentaria de poblaciones de *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) en una zona endémica y sus implicaciones epidemiológicas. *Revista de Salud Pública*, 13(1), 163-172.
- Ferrer, E., Lares, M., Viettri, M. y Medina, M. (2013). Comparación entre técnicas inmunológicas y moleculares para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(5), 277-282.
- Gállego, B.J. (2006). *Manual de Parasitología. Morfología y biología de los parásitos de interés sanitario*. España: Publicacions I Edicions de la Universitat de Barcelona. 516 p.
- Guhl, F. (2009). Enfermedad de Chagas: Realidad y perspectivas. *Biomédica*, 20(3), 228-234.
- Gutiérrez, S.O., Molina, S.S., Calvo, F.N., Romero, T.L., Esquivel, A.L. y Campos, E. (2007). Enfermedad de Chagas en pacientes con miocardiopatía dilatada idiopática en Costa Rica. *Acta Médica Costarricense*, 49(2), 97-101.
- Harris, D.C. (2007). *Análisis químicos cuantitativo*. (3a. ed.). (Trad. N.V. Berenguer y M.A. Berenguer). Barcelona, España: Editorial Reverté. 924 p.
- Hernández, J.L., Rebollar-Téllez, E.A., Infante, F., Morón, A. y Castillo, A. (2010). Indicadores de Infestación, Colonización e Infección de *Triatoma dimidiata* (Latreille) (Hemiptera: Reduviidae) en Campeche, México. *Neotropical Entomology*, 39(6), 1024-1031.
- Iborra-Bendicho, M.A., Albert-Hernández, M., Márquez-Contreras, C. y Segovia-Hernández, M. (2012). ARCHITECT Chagas®: una nueva herramienta diagnóstica en la enfermedad de Chagas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30(8), 463-465.
- INCIENSA. (2014). *Centro Nacional de Referencia de Parasitología*. Recuperado el 03 de octubre de 2018 de http://www.inciensa.sa.cr/inciensa/centros_referencia/parasitologia.aspx

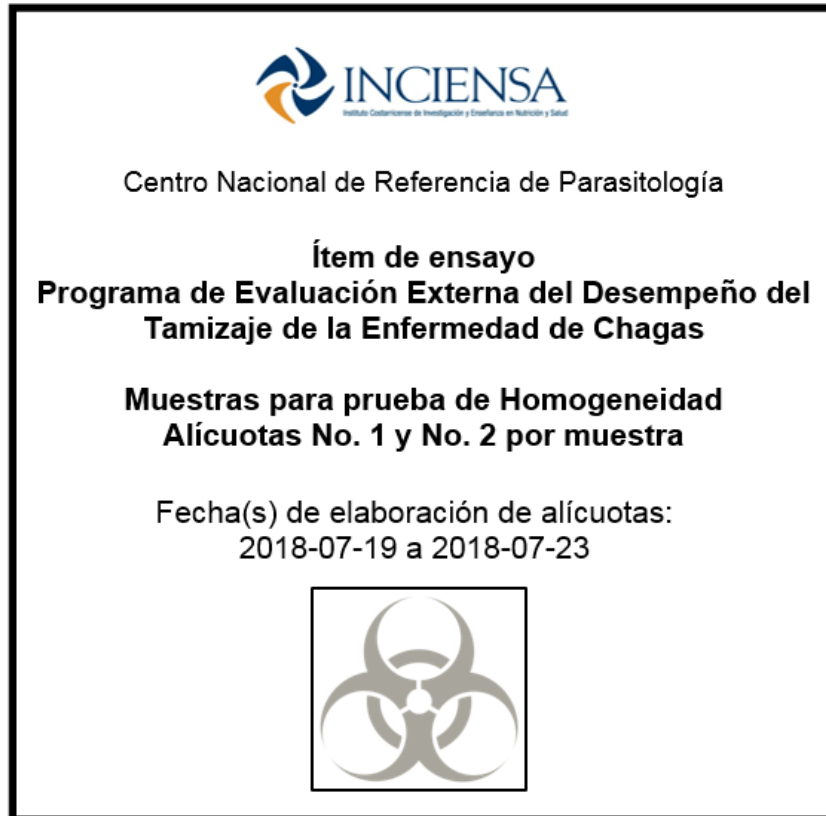
- INTECO. (2016). *INTE/ISO 13528:2016 Métodos estadísticos para utilizar en ensayos de aptitud mediante comparaciones interlaboratorio*. San José, Costa Rica: Instituto de Normas Técnicas de Costa Rica. 108 p.
- INTECO. (2010). *INTE-ISO/IEC 17043:2010 Evaluación de la conformidad – Requisitos generales para los ensayos de aptitud*. San José, Costa Rica: Instituto de Normas Técnicas de Costa Rica. 58 p.
- Kimhi, L., Zlotnikov, C. & Kuselman, I. (2006). Local comparability of proficiency testing results: determination of concrete slump and compressive strength values. *Accreditation and Quality Assurance*, 11, 577-583.
- Lafargue, M.E., Biogéaud, S., Rutledge, D.N. & Feinberg, M.H. (2004). Proficiency testing schemes: solutions for homogeneity control. *Accreditation and Quality Assurance*, 9(6), 333-339.
- La Fuente, Z.C.A. (2006). Inmunología de la infección por *T. cruzi* y de la enfermedad de Chagas. *Enfermedades Emergentes*, 8(1), 17-19.
- LeBlanc, D.C. (2004). *Statistics: Concepts and Applications for Science*. United States of America: Jones and Bartlett Publishers. 382 p.
- Levy, M.Z., Bowman, N.M., Kawai, V., Plotkin, J.B., Waller, L.A., Cabrera, L., Steurer, F., Seitz, A.E., Pinedo-Cancino, V.V., Cornejo, del C.J.G., Cordova, B.E., Ellis, M., F., Maguire, J.H., Gilman, R.H. & Bern, C. (2009). Spatial Patterns in Discordant Diagnostic Test Results for Chagas Disease: Links to Transmission Hotspots. *Clinical Infectious Diseases*, 48, 1104-1106.
- Ministerio de Salud. (2011). *Guía de Diagnóstico, Tratamiento y Prevención de la Enfermedad de Chagas*. Santiago, Chile: Ministerio de Salud. 38 p.
- Ministerio de Salud. (2010). *Norma de Atención Integral de la Enfermedad de Chagas*. San José, Costa Rica: Imprenta Nacional. 40 p.
- Ministerio de Salud. (2014). *Norma General Técnica. Control y Prevención Nacional de la Enfermedad de Chagas*. Santiago, Chile: Ministerio de Salud. 98 p.
- Miranda, A.N., Olmos, V.O.J y Santiago, O.L.A. (2010). *Estudio de los Factores de Riesgo y Georreferenciación de Casos Positivos en una Zona Hiperendémica a la Enfermedad de Chagas*. (Tesis de Grado). Universidad Veracruzana. Veracruz, México.
- Moretti, E., Basso, B. y Moya, P. (2007). Manejo de la transmisión congénita. Estado actual y perspectivas. En Organización Panamericana de la Salud y Fundación Mundo Sano. *La enfermedad de Chagas a la puerta de los 100 años del conocimiento de una endemia americana ancestral* (pp. 167-178). Brasil: OPS.
- Murcia, L., Carrilero, B., Saura, D., Iborra, M.A. y Segovia, M. (2013). Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(Supl.1), 26-34.
- Noblett, T. (2012). Establishing the standard deviation for proficiency assessment ($\hat{\sigma}$) in microbiology PT/EQA schemes. *Accreditation and Quality Assurance*, 17, 383-388.

- OMS. (2018). *La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana)*. Recuperado el 10 de octubre de 2018 de [http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
- OPS. (2003). *Informe Final: VIa Reunión de la Comisión Intergubernamental de la Iniciativa de los Países de Centro América para la Interrupción de la Transmisión Vectorial y Transfusional de la Enfermedad de Chagas (IPCA)*. Tegucigalpa, Honduras: Organización Panamericana de la Salud. 40 p.
- Otani, M., Hockley, J., Guzmán, B.C., Rijpkema, S., Luquetti, A.O., Duncan, R., Rigsby, P., Albajar-Viñas, P. & Padilla, A. (2011). *Expert Committee on Biological Standardization. Evaluation of two International Reference Standards for antibodies to Trypanosoma cruzi in a WHO collaborative study*. Geneva, Switzerland: World Health Organization. 66 p.
- Pereira, G.de A., Louzada-Neto, F., Barbosa, V.de F., Ferreira-Silva, M.M. & Moraes-Souza, H. (2012). Performance of six diagnostic tests to screen for Chagas disease in blood banks and prevalence of *Trypanosoma cruzi* infection among donors with inconclusive serology screening based on the analysis of epidemiological variables. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 34(4), 292-297.
- Portuondo, P.Y. y Portuondo, M.J. (2010). La Repetibilidad y Reproducibilidad en el Aseguramiento de la Calidad de los Procesos de Medición. *Tecnología Química*, 3(2), 117-121.
- Praast, G., Herzogenrath, J., Bernhardt, S., Christ, H. & Sickinger, E. (2010). Evaluation of the Abbott ARCHITECT Chagas prototype assay. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 69(1), 74-81.
- Rassi, A., Rassi, A. & Marin-Neto, J.A. (2015). Chagas Disease. In Franco-Paredes, C. & Santos-Preciado, J.I. (Eds.), *Neglected Tropical Diseases – Latin America and the Caribbean* (pp. 45-71). Vienna, Austria: Springer.
- Rimoldi, A., Tomé, A.R., Luz, A.D., Tita, F.M.Z., Martínez, I., Freitas, A.R., Barreto, C.R.M. & Aristeu, R.J. (2012). Morphological, biological and molecular characterization of three strains of *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) isolated from *Triatoma sordida* (Stal) 1859 (Hemiptera, Reduviidae) and a domestic cat. *Parasitology*, 139(1), 37-44.
- Rodrigues, C.J. (2015). The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(3), 277-282.
- Rojas, A.A. (2007). Manejo de las vías alternativas de transmisión. En Organización Panamericana de la Salud y Fundación Mundo Sano. *La enfermedad de Chagas a la puerta de los 100 años del conocimiento de una endemia americana ancestral* (pp. 179-186). Brasil: OPS.
- Tholen, D., Boley, N., Gun-Monro, J., Gust, J., Korth, W., Noble, M., Petinos, P. & Wruck, D. (2014). *ILAC Discussion Paper on Homogeneity and Stability Testing*. Australia: International Laboratory Accreditation Cooperation. 13 p.

- Tholen, D., Chappel, R. & Francis, B. (2006). Use of participant EQA results to assess sample homogeneity and stability for qualitative analytes. *Accreditation and Quality Assurance*, 11, 400-407.
- Tholen, D.W. (1998). Statistical treatment of proficiency testing data. *Accreditation and Quality Assurance*, 3, 362-366.
- WHO. (2002). *Control of Chagas Disease*. Geneva, Switzerland: World Health Organization. 120 p.
- WHO. (2012). *Research Priorities for Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis. Technical Report of the TDR Disease Reference Group on Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis*. Geneva, Switzerland: WHO Press. 116 p.
- WHO. (2010). *Screening Donated Blood for Transfusion-Transmissible Infections. Recommendations*. Geneva, Switzerland: WHO Press. 73 p.
- Wiener Laboratorios. (2000). *Chagatest. ELISA lisado. Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la detección de anticuerpos anti-Trypanosoma cruzi*. Rosario, Argentina: Wiener Laboratorios. 6 p.
- Wiener Laboratorios. (2000). *Chagatest. ELISA recombinante v.4.0. Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la detección de anticuerpos anti-Trypanosoma cruzi*. Rosario, Argentina: Wiener Laboratorios. 6 p.
- Zeledón, R. (2001). *Una estrategia para el control de la Enfermedad de Chagas en Costa Rica y su relación con programas similares en los otros países centroamericanos*. Tres Ríos, Costa Rica: INCIENSA.
- Zingales, B., Andrade, S.G., Briones, M.R.S., Campbell, D.A., Chiari, E., Fernandes, O., Guhl, F., Lages-Silva, E., Macedo, A.M., Machado, C.R., Miles, M.A., Romanha, A.J., Sturm, N.R., Tibayrenc, M. & Schijman, A.G. (2009). A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revisión meeting recommends TcI to TcVI. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(7), 1051-1054.

X. ANEXOS

Anexo 1. Etiqueta para identificación de caja para almacenamiento de submuestras correspondientes a la revisión de homogeneidad.



Anexo 2. Fórmulas para la revisión del parámetro de homogeneidad. Fuente: INTECO (2016).

La estimación de la desviación estándar dentro de las muestras (s_w) y la desviación estándar entre muestras (s_s) para el caso común de diseño en el que se preparan dos porciones o submuestras a partir de cada ítem de ensayo, puede realizarse mediante la aplicación de las siguientes fórmulas.

- Definición del promedio de los ítems de ensayo analizados.

$$\bar{x}_t = \frac{(x_{t,1} + x_{t,2})}{2} \quad (\text{Fórmula 1})$$

- Estimación de la amplitud entre las porciones de ensayo (submuestras).

$$w_t = |x_{t,1} - x_{t,2}| \quad (\text{Fórmula 2})$$

- Cálculo del promedio general.

$$\bar{\bar{x}} = \frac{1}{g} \sum_{t=1}^g \bar{x}_t \quad (\text{Fórmula 3})$$

- Estimación de la desviación estándar de los promedios muestrales.

$$s_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{1}{(g-1)} \sum_{t=1}^g (\bar{x}_t - \bar{\bar{x}})^2} \quad (\text{Fórmula 4})$$

- Estimación de la desviación típica dentro de las muestras.

$$s_w = \sqrt{\frac{1}{2g} \sum_{t=1}^g w_t^2} \quad (\text{Fórmula 5})$$


Las sumas en las fórmulas 3, 4 y 5 son con respecto a los ítems de ensayo ($t = 1, 2, \dots, g$).

- Estimación de la desviación estándar entre muestras.

$$s_s = \sqrt{\max\left(0, s_{\bar{x}}^2 - \frac{s_w^2}{2}\right)} \quad (\text{Fórmula 6})$$

Nota: La estimación de la varianza entre muestras s_s^2 puede resultar en un valor negativo cuando s_s es relativamente menor que s_w . Esto puede esperarse cuando los ítems de ensayo son muy homogéneos. En este caso, $s_s = 0$.

Anexo 3. Etiqueta para identificación de caja para almacenamiento de submuestras correspondientes a la revisión de estabilidad.


Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud

Centro Nacional de Referencia de Parasitología

Ítem de ensayo
Programa de Evaluación Externa del Desempeño del
Tamizaje de la Enfermedad de Chagas

Muestras para prueba de Estabilidad
Alícuotas No. 1 y No. 2 por muestra

Fecha(s) de elaboración de alícuotas:
2018-09-11 a 2018-09-14

