



Evaluación diagnóstica de pruebas serológicas para el
diagnóstico de la Enfermedad de Chagas en
Guatemala

PROTOCOLO DE EVALUACIÓN DIAGNÓSTICA

LABORATORIO NACIONAL DE SALU DE GUATEMALA
DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE



Protocolo de evaluación diagnóstica de pruebas serológicas para la enfermedad de Chagas en Guatemala

Elaborado por:

Andrés Caicedo Díaz
Consultor DNDi
Diagnóstico de Enfermedad de Chagas

Andrea Marchiol
Chagas Access Project Manager
DNDi

Rafael Herazo
Referente Médico Proyectos de Acceso Chagas
DNDi

Selene González
Coordinadora UCREVE

Paola Paniagua
Líder Técnico del Laboratorio de Parasitología de la UCREVE

Claudia Valenzuela
Apoyo Técnico del Laboratorio de Parasitología de la UCREVE

Zoraida Morales
Apoyo Técnico del Laboratorio de Parasitología de la UCREVE

Revisión y aprobación:

César Conde
Jefe Laboratorio Nacional de Salud

Tabla de contenido

Objetivo del protocolo	1
1. Diseño teórico	1
1.1. Planteamiento del problema.....	1
2. Objetivos	2
2.1. Objetivo general.....	2
2.2. Objetivos específicos	2
3. Metodología	2
3.1. Enfoque metodológico	2
3.2. Tipo y diseño del estudio	2
3.2.1. Etapa 1: evaluación del algoritmo actual.....	3
3.2.2. Etapa 2: búsqueda de una tercera prueba	3
3.2.3. Etapa 3: evaluación de pruebas adicionales	4
3.3. Instalaciones donde se desarrollará el estudio	4
3.4. Parámetros a estimar.....	5
3.5. Población.....	5
3.6. Diseño muestral	5
3.6.1. Muestras	5
3.6.2. Cálculo del tamaño de la muestra	7
3.6.3. Técnicas serológicas para caracterización de muestras.....	8
3.6.4. Definición del criterio de verdad de las muestras.....	8
3.6.5. Criterios de selección de las muestras.....	9
3.6.6. Procedimiento para la disposición de las muestras	10
3.6.7. Consideraciones especiales para procesamiento de las muestras	12
3.7. Reactivos utilizados.....	12
3.8. Equipos utilizados	13
3.9. Técnicas de recolección de información.....	14
3.10. Control de errores y sesgos.....	15
3.11. Divulgación de los resultados.....	17
4. Cronograma	17

Objetivo del protocolo

Describir y ejecutar los procedimientos, actividades, condiciones y etapas que se deben desarrollar para realizar una evaluación diagnóstica de pruebas serológicas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en Guatemala.

1. Diseño teórico

1.1. Planteamiento del problema

La enfermedad de Chagas (ECh) afecta a un gran número de personas, comunidades y poblaciones a lo largo de Centroamérica y Sudamérica principalmente. Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), cerca de 166.667 personas están infectadas por el parásito en Guatemala, y se esperan cerca de 1.275 casos nuevos al año por transmisión vectorial. El diagnóstico de la ECh sugiere un gran reto técnico y operativo, no solo para las entidades de salud encargadas de este proceso, sino también para los analistas que realizan las pruebas dentro de los laboratorios, dado que existen limitaciones en la disponibilidad de evidencia generada con relación a la calidad de las pruebas utilizadas, aún más en ámbitos locales.

Es imperativo para el sistema de vigilancia de Guatemala y para el programa de prevención y control del Ministerio de Salud Pública, contar con un diagnóstico confiable, oportuno y veraz, pues esto impactará directamente en la calidad de vida de las personas afectadas por esta patología.

El Laboratorio Nacional de Salud (LNS) de Guatemala, es la entidad encargada de elaborar y divulgar los lineamientos actualizados para el diagnóstico de la ECh en el territorio nacional; sin embargo, una de las limitaciones más próximas y de mayor impacto en salud pública es la poca evidencia que existe con relación a la calidad de los procesos diagnósticos, el desempeño de las pruebas utilizadas y de la oportunidad que existe en clasificar finalmente pacientes con esta enfermedad. Es necesario, que el LNS genere evidencia técnica y analítica que indique la calidad de las pruebas diagnósticas utilizadas actualmente.

Adicionalmente, existen limitaciones técnicas que no permiten clasificar oportunamente a un paciente que genere una discordancia en las pruebas actualmente disponibles. Si bien, la recomendación es evaluar la presencia de anticuerpos un par de meses después, la proporción de paciente que vuelven a realizarse la prueba está por debajo del 10 %. Esto limita considerablemente la captación, vigilancia y el tratamiento de personas con la enfermedad de Chagas.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Realizar la evaluación diagnóstica de pruebas serológicas, no cromatográficas, para la detección de anticuerpos IgG anti-*T. cruzi* disponibles en Guatemala, que permita fortalecer las actividades de diagnóstico serológico en el Laboratorio Nacional de Salud para pacientes con sospecha de la enfermedad de Chagas.

2.2. Objetivos específicos

- Estimar las características operativas en términos de sensibilidad, especificidad, valores predictivos y razones de verosimilitud de las dos pruebas de ELISA que son utilizadas dentro del algoritmo actual de diagnóstico serológico propuesto por el LNS de Guatemala.
- Estimar las características operativas de al menos tres pruebas de diferente fundamento analítico, para identificar las técnicas que se puedan utilizar como prueba para solucionar las discordancias del algoritmo actual y aumentar el número de pruebas disponibles para un diagnóstico serológico confiable.

3. Metodología

3.1. Enfoque metodológico

El presente estudio tendrá un enfoque cuantitativo, analítico, y de estimación de características operativas de pruebas diagnósticas, el cual permitirá evaluar el rendimiento diagnóstico de las pruebas comerciales serológicas diseñadas para la detección de anticuerpos de tipo IgG anti-*T. cruzi* existentes, disponibles en Guatemala y que hayan otorgado su aval para la participación en el estudio.

NOTA: para el presente protocolo las pruebas serológicas objeto de evaluación diagnóstica serán denominadas “pruebas índice”, y las pruebas que funcionarán como pruebas “gold estándar” o de referencia, se denominarán “pruebas de referencia”.

3.2. Tipo y diseño del estudio

Es un estudio retrospectivo donde se estimarán las características operativas de pruebas de diagnóstico serológico diseñadas para la detección “*in vitro*” de anticuerpos de tipo IgG anti *T. cruzi*.

El presente ejercicio de evaluación diagnóstica se realizará en dos etapas; cada etapa comprende un eje estructural del proceso, que permitirá de forma integrada aportar

evidencia sobre el desempeño de las pruebas de diagnóstico serológico en la población guatemalteca.

Los ejes estructurales de la evaluación son los siguientes:

1. Evaluación diagnóstica de los métodos serológicos ELISA que conforman el algoritmo actual de diagnóstico serológico en Guatemala. Para este eje se ejecutará la etapa 1 del estudio.
2. Evaluación diagnóstica de métodos diferente a las ELISA (Inmunofluorescencia indirecta, Hemaglutinación Indirecta entre otros, [según disponibilidad actual en el mercado]), como herramienta para solucionar discordancias del algoritmo actual. Para este eje se ejecutará la etapa 2 del estudio.
3. Evaluación diagnóstica de métodos de ELISA diferentes a los que componen el algoritmo de diagnóstico serológico utilizado por el LNS y Quimioluminiscencia. Para este eje se ejecutará la etapa 3 del estudio.

A continuación, se presenta una breve descripción de cada una de las etapas del estudio:

3.2.1. Etapa 1: evaluación del algoritmo actual

Se realizará una evaluación diagnóstica de las pruebas que hacen parte del algoritmo actual de diagnóstico serológico emitido por el Laboratorio Nacional de Salud (LNS) en Guatemala, las cuales son: a) Elisa comercial de antígenos totales de Wiener Lab y b) Elisa comercial de antígenos recombinantes de Wiener Lab.

Para este componente se dispondrán de estándares internacionales validados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), fabricados por el Instituto Nacional para Estándares y Controles Biológicos (NIBSC™, por sus siglas en ingles); que serán procesados por cada una de las pruebas de Elisa que componen el algoritmo actual.

En términos metodológicos, los materiales de referencia (NIBSC™) serán procesados por ambas metodologías de Elisa.

Al finalizar esta etapa del estudio, se comprobará el desempeño diagnóstico del algoritmo diagnóstico actual del LNS en Guatemala.

3.2.2. Etapa 2: búsqueda de una tercera prueba

Una vez se cuente con los resultados de la etapa 1, y si dichos resultados son concordantes con los datos de los estándares de referencia, se podrá afirmar que el desempeño de las pruebas de Elisa de antígenos totales y recombinantes de Wiener es adecuado para el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas en Guatemala.

A partir de la etapa 2, estas pruebas serán las pruebas diagnósticas de referencia para la evaluación diagnóstica que se realizará en la etapa 2 y 3.

En esta etapa se dispondrá de pruebas serológicas de fundamento diferente: inmunofluorescencia indirecta (IFI), Hemaglutinación indirecta (HAI), entre otras; esto con el fin de determinar cuál es la mejor herramienta para dirimir las discordancias entre las pruebas iniciales. En esta etapa se realizará una comparación del desempeño entre las pruebas “index”, frente a las pruebas diagnósticas de referencia.

Para ello, se configurará y ensamblará un panel de muestras previamente caracterizadas, el cual se define como un conjunto de muestras que cuentan con ciertas características preestablecidas y con clasificación serológica previa que permitirá la estimación de las características operativas de las pruebas a evaluar.

3.2.3. Etapa 3: evaluación de pruebas adicionales

Esta etapa se desarrollará simultáneamente con la etapa 2, la diferencia radica en que esta etapa contempla pruebas serológicas, no cromatográficas, de fundamento de ELISA diferente a los que componen el algoritmo de diagnóstico serológico utilizado por el LNS y Quimioluminiscencia. La evaluación de esta última impactará sobre el desempeño de la tamización de las unidades de sangre captadas por los bancos de sangre en Guatemala. De igual manera se utilizará el panel de muestras para comparar el desempeño de estas nuevas pruebas frente a las pruebas de referencia.

NOTA: en caso de que al momento de iniciar el procesamiento técnico de la validación no se cuente con el número esperado de pruebas índice, no se verá afectado el resultado de las últimas dos etapas, sin embargo, mínimo se deberá contar con una prueba de fundamento analítico diferente a la Elisa.

3.3. Instalaciones donde se desarrollará el estudio

El ejercicio de evaluación diagnóstica y todas las etapas que lo componen se desarrollará en las instalaciones del laboratorio de la Unidad Central de Referencia para la Vigilancia Epidemiológica (UCREVE) del laboratorio Nacional de Salud de Guatemala, específicamente en el laboratorio de serología del Área de Parasitología.

Estas instalaciones deberán cumplir con las condiciones ambientales, de infraestructura y técnicas que se requieren para dichos procedimientos según los insertos de cada uno de los estuches.

La coordinación de la UCREVE velará por el cumplimiento de dichas condiciones durante el procesamiento de cada una de las pruebas a evaluar.

3.4. Parámetros a estimar

Para la presente evaluación diagnóstica se calcularán los siguientes estimadores, junto con sus intervalos de confianza al 95% (95%IC):

- Sensibilidad (Se)
- Especificidad (Sp)
- Exactitud (Ex)
- Valor predictivo positivo (VPP)
- Valor predictivo negativo (VPN)
- Razón de verosimilitud positiva (LR+)
- Razón de verosimilitud negativa (LR-)
- Tasa de falsos positivos
- Tasa de falsos negativos

NOTA: las tasas de falsos positivos y negativos no son estimadores recomendados por el CLSI, sin embargo, generan evidencia técnica fuerte que puede facilitar el análisis del desempeño de las pruebas y generar análisis de subgrupos.

3.5. Población

La población objeto del estudio será:

- Pacientes con sospecha de la enfermedad de Chagas de cualquier edad, sexo o procedencia dentro del territorio de Guatemala.
- Gestantes de cualquier edad gestacional de cualquier procedencia o residencia.
- Niños/as
- Donantes de sangre.

3.6. Diseño muestral

3.6.1. Muestras

Para la **Etapa 1**, se cuentan con las siguientes fuentes de muestras biológicas:

- Estándar Biológico de Referencia Internacional, del “The National Institute for Biological Standards and Control” (NIBSC):

Estos estándares internacionales fueron validados previamente por la Organización Mundial de la Salud (OMS), son muestras biológicas de plasma con anticuerpos anti-*T.cruzi* (09/186-09/188), los cuales contienen anticuerpos específicos contra *T.cruzi* DTU TcI y TcII, fabricados por “The National Institute for Biological Standards and Control” (NIBSC), constituidos por muestras de origen biológico de pacientes previamente caracterizados con diferentes metodologías serológicas en distintos laboratorios de referencia a nivel mundial.

Chagas (anti-*T.cruzi* I) antibody in Human Plasma (1st International Standard) 09/188: es un *pool* de plasma de origen humano liofilizado de cuatro donantes voluntarios seropositivos, que contiene anticuerpos anti-*T.cruzi*, representativo de pacientes seropositivos de individuos autóctonos de México, región donde predomina el *T.cruzi* TcI, estas preparaciones pueden ser utilizadas para análisis de desempeño diagnóstico de diferentes metodologías serológicas.

Chagas (anti-*T.cruzi* II) antibody in Human Plasma (1st International Standard) 09/186: es un *pool* de plasma de origen humano liofilizado de diez donantes voluntarios seropositivos, que contiene anticuerpos anti-*T.cruzi*, representativo de pacientes seropositivos de individuos autóctonos de Brasil, región donde predomina el *T.cruzi*, TcII, estas preparaciones pueden ser utilizadas para análisis de desempeño diagnóstico de diferentes metodologías serológicas.

Para la **Etapa 2 y 3**, se cuentan con las siguientes fuentes de muestras:

- Seroteca del Laboratorio Nacional de Salud de Guatemala.

Esta seroteca está ubicada en UCREVE del LNS y cuenta con muestras de suero de pacientes sospechosos con ECh conservadas en congelación a $-20^{\circ}\text{C}\pm 5$, las cuales han sido tomadas por los servicios de salud a nivel nacional, las condiciones por las cuales son tomadas y enviadas estas muestras al LNS son las siguientes:

- Muestras de pacientes que acudieron a un servicio de salud para ser evaluados en consulta por presentar malestar general o sospecha de ECh. De acuerdo con sintomatología o historial del paciente, el médico solicita que se envíe una muestra al LNS para el diagnóstico serológico para confirmar Chagas.
- Muestras de gestantes que fueron tomadas en los servicios de salud de las áreas endémicas para la enfermedad, en cumplimiento a normativa establecida.
- Muestras procedentes de donantes de sangre, quienes fueron seroreactivos en la prueba de Elisa de tamizaje realizada en el Laboratorio de Tamizaje Centralizado para donantes de sangre del Programa de Medicina Transfusional y Bancos de Sangre del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, los cuales buscaron la prueba complementaria de confirmación.
- Seroteca del Laboratorio de Tamizaje Centralizado para donantes de sangre del Programa de Medicina Transfusional y Banco de Sangre del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, incluyendo los caracterizados como seronegativos para anticuerpos anti-*T.cruzi*.
- Seroteca de la Universidad de San Carlos

Estas muestras de suero provienen de proyectos de investigación adelantados por el grupo de investigación de Chagas, y son caracterizadas previamente por técnicas serológicas diferentes a las del algoritmo diagnóstico implementado en el LNS. Algunos proyectos de investigación estuvieron dirigidos a poblaciones específicas como menores de edad y/o gestantes.

3.6.2. Cálculo del tamaño de la muestra

El cálculo del tamaño de la muestra se realizó para un estudio de corte transversal de pruebas diagnósticas con resultado dicotómico (distribución binomial), para comparar proporciones de sensibilidad y especificidad entre dos pruebas. Para calcular el tamaño total de la muestra se realizaron cálculos independientes para sensibilidad y especificidad, los parámetros de sensibilidad esperados determinaron el número de muestras positivas y los parámetros de especificidad esperados determinaron el número de muestras negativas, además, se tuvo en cuenta el número de estuches que serán donados por los proveedores locales.

Se utilizó la siguiente expresión matemática sugerida por Tilaki 2014:

$$n = \frac{\left[Z_{\frac{\alpha}{2}} \sqrt{2 \times \bar{P}(1 - \bar{P})} + Z_{\beta} \sqrt{P_1(1 - P_1) + P_2(1 - P_2)} \right]^2}{(P_1 - P_2)^2}$$

Donde Z_{α} y Z_{β} , tienen los valores estándares de probabilidad de error tipo I (0,05=1,64) y tipo II (0,20=0,84), respectivamente. \bar{P} denota el valor puntual de sensibilidad o especificidad esperado, P_1 indica el máximo valor esperado y P_2 indica el valor mínimo esperado. Para sensibilidad (muestras positivas), $nPos(basado en Se)$, \bar{P} 96,0%, P_1 100% y P_2 92,5%, amplitud del intervalo de confianza 7,5%. Para especificidad (muestras negativas), $nNeg(basado en Sp)$ \bar{P} 98,0%, P_1 100% y P_2 93,0%, amplitud del intervalo de confianza 7,0%.

El tamaño total de la muestra fue entonces estimado, así:

$$\begin{aligned} n &= nPos(basado en Se) + nNeg(basado en Sp) \\ n &= 256 + 245 \\ n &= 501 \end{aligned}$$

Teniendo en cuenta estos parámetros, se considera que cualquier técnica con un desempeño inferior al 92,5% de sensibilidad y/o 93% de especificidad, tiene un desempeño inferior a las técnicas utilizadas como patrón de referencia.

La prevalencia del muestreo fue estimada en 51,1% (Tabla 1).

Tabla 1. Distribución porcentual del cálculo de la muestra según valor real

Valor real	Frecuencia	Porcentaje
Positivo	256	51,1
Negativo	245	48,9
Total	501	100

Fuente: con base en cálculos propios basados en cálculo del tamaño de la muestra.

3.6.3. Técnicas serológicas para caracterización de muestras

NOTA: este apartado solo aplica para la etapa 2 y 3 del proceso, debido a que en la etapa 1 la caracterización de la muestra está dada por la información suministrada por el fabricante de los estándares biológicos internacionales.

Las siguientes deberán ser las pruebas inmunoserológicas utilizadas para establecer el criterio de verdad por laboratorio, el criterio de verdad, está definido como el valor real de cada una de las muestras utilizadas, por ende, es contra esta variables cualitativa que se deberán comparar los resultados de las pruebas “índice”:

1. Técnica de ELISA comercial para detección de anticuerpos de tipo IgG anti *T.cruzi* de antígenos totales de marca Wiener Lab.
2. Técnica de ELISA comercial para detección de anticuerpos de tipo IgG anti *T.cruzi* de antígenos recombinantes de marca Wiener Lab.

3.6.4. Definición del criterio de verdad de las muestras

A continuación, se describe cómo será definido el criterio de verdad según cada etapa del estudio:

Etapa 1

Para esta etapa del estudio el criterio de verdad está dado por el resultado previo de cada uno de los estándares utilizados, este resultado expone la clasificación dada por diferentes laboratorios a nivel mundial que han sido definidos como cooperantes de los fabricantes de estos y avalados por los fabricantes. Por tal motivo, el resultado de la prueba evaluada deberá compararse con el valor que informan los estándares biológicos.

Etapa 2 y 3

Se estableció un criterio de verdad positivo y negativo basado en resultados de pruebas serológicas de referencia.

El criterio de verdad deberá ser establecido de la siguiente manera:

- Criterios de muestras positivas

Será considerada como “positiva” toda muestra de suero que cumpla con los dos criterios expuestos a continuación:

- Elisa de antígenos totales: densidad óptica (DO) absoluta que sea mayor al cut-off calculado en su respectiva corrida analítica.
- Elisa de antígenos recombinantes: densidad óptica (DO) absoluta que sea mayor al cut-off calculado en su respectiva corrida analítica.

- Criterios de muestras negativas

Será considerada como “negativa” toda muestra de suero que cumpla con los dos criterios expuestos a continuación:

- Elisa de antígenos totales: densidad óptica (DO) absoluta que sea menor al cut-off calculado en su respectiva corrida analítica.
- Elisa de antígenos recombinantes: densidad óptica (DO) absoluta que sea menor al cut-off calculado en su respectiva corrida analítica.

NOTA: muestras con resultados discordantes no podrán ser incluidas en el panel de validación, pues no tienen una definición serológica final.

3.6.5. Criterios de selección de las muestras

Para el ejercicio de validación se realizará un muestreo no probabilístico, se seleccionarán las muestras basados en los criterios de selección, como se describe a continuación:

Se deberán aplicar los siguientes criterios de selección a las muestras de suero provenientes de las diferentes fuentes:

- Criterios de inclusión
 1. Muestras de suero de pacientes guatemaltecos con sospecha de ECh dentro del territorio nacional recolectadas durante el periodo comprendido entre los años 2018-2021.
 2. Muestras de suero almacenadas a $-20^{\circ}\text{C}\pm 5$.
 3. Muestras de suero con resultados de pruebas serológicas para la detección de anticuerpos anti *T. cruzi*, específicamente Elisa de antígenos totales y Elisa de antígenos recombinantes (Para el caso de las muestras provenientes del banco de sangre, estas podrán tener solo un resultado de una prueba de Elisa).

4. Muestras de suero de pacientes con sospecha de ECh con historia clínica o ficha clínico-epidemiológica con la que llegan las muestras al VIGILAB.
 5. Muestras de suero de donantes de sangre con información de los resultados de las pruebas serológicas de tamizaje y datos demográficos básicos.
- Criterios de exclusión
1. Muestras que tengan un valor de DO entre un rango de 15% alrededor del Cut-off.
 2. Muestras de suero con resultado de una sola prueba serológica para la detección de anticuerpos anti *T. cruzi*.
 3. Muestras de suero con discordancia entre pruebas serológicas para la detección de anticuerpos anti *T. cruzi*.
 4. Muestras de suero que mostraron evidencia de almacenamiento inadecuado (presencia de contaminación).
 5. Muestras que cuenten con menos de 800uL de suero en cada vial (*el volumen final será por vial independiente, se excluirán muestras que completen el volumen final en más de un vial*).
 6. Muestras de suero con alteraciones o modificaciones en su rotulado.
 7. Muestras de suero con presencia de hemólisis, restos de fibrina o restos macroscópicos no identificados.

3.6.6. Procedimiento para la disposición de las muestras

- Selección de las muestras

Las muestras deberán ser seleccionadas cumpliendo el siguiente proceso estandarizado de depuración y selección:

1. Con ayuda del VIGILAB y de la información otorgada por el Programa de Medicina Transfusional y Bancos de Sangre y de la Universidad de San Carlos, se deberá elaborar una base de datos que cuente con todas las muestras ingresadas y procesadas por el laboratorio de serología del Área de Parasitología de UCREVE y de sus diferentes fuentes, durante el periodo comprendido entre los años 2018-2021. A esta base se le denominara “base_inicial”.

Las variables que deberá tener la base de datos son:

- Demográficas
 - a) Código de identificación único de la muestra en el Vigilab: código que es otorgado por el LNS durante el ingreso de la muestra al laboratorio de la UCREVE.
 - b) Edad: años cumplidos de vida del paciente a quien corresponde dicha muestra.
 - c) Sexo: género al que pertenece el paciente a quien corresponde dicha muestra.
 - d) Departamento de procedencia: departamento al que pertenece el Área de Salud que envía la muestra al LNS.

e) Municipio de procedencia: municipio donde reside el paciente a quien corresponde la muestra.

- Clínicas

f) Síntomas compatibles con la ECh: definir si el paciente tiene mínimo un síntoma compatible con etapa aguda o crónica de la enfermedad de Chagas, de acuerdo con el lineamiento nacional de vigilancia de la enfermedad de Chagas.

- Laboratorio

g) Resultado cuantitativo (DO) de la Elisa de antígenos totales

h) Resultado cuantitativo (DO) de la Elisa de antígenos recombinantes

i) Cut-off estimado en la corrida correspondiente a cada muestra

j) Fuente de la muestra: esta variable hace referencia a alguna de las fuentes posibles de las muestras.

k) Clasificación final: clasificación final serológica de las muestras (positiva o negativa)

2. Se deberán generar dos bases de datos a partir de la "base_inicial", una con las muestras positivas denominada "base_positivos" y otra con las muestras negativas "base_negativos"; esta separación de datos se deberá realizar con la información de la variable número 11 (*dejar Back up de la primera base de datos*).

3. Aplicar a cada base de datos (positivos y negativos) los tres primeros criterios de exclusión (*estos criterios deben aplicarse antes de realizar una inspección física y visual de cada una de las muestras*).

4. Las muestras que cumplan el criterio de exclusión 1, 2 y 3, deberán ser extraídas de cada base de datos.

5. Una vez se extraigan estos datos, se deberá realizar una inspección física de las muestras restantes, y cada una de ellas se deberá evaluar los criterios de exclusión faltantes (4 al 7).

6. Las muestras que cumplan alguno de estos criterios de exclusión, deberán extraerse de la base de datos de cada grupo.

7. Realizar la selección de las muestras de manera aleatoria, hasta completar los siguientes porcentajes de acuerdo con cada una de las variables especificadas.

- Extracción, organización, etiquetado y almacenamiento

Una vez seleccionadas las muestras de suero en las bases de datos, se procederá de la siguiente manera:

1. Con cada una de las muestras seleccionadas en las bases de datos y extraídas físicamente del banco de muestras, se deberán realizar alícuotas en viales de polipropileno de tamaño correspondiente al volumen necesario.

2. Cada grupo de alícuotas deberá ser rotulado por medio de números aleatorios por un profesional ajeno al procesamiento técnico de las muestras. Este rotulado deberá ser consistente con una lista de generación de números aleatorios.
3. Una vez rotuladas las muestras de cada grupo de alícuotas, estas deberán ser llevadas a -20°C hasta el momento de realizar el procesamiento técnico de cada estuche. Las muestras no podrán ser sacadas en ninguna circunstancia antes de este momento.
4. Un día antes del inicio de los ensayos para cada estuche, las muestras deberán ser almacenadas en refrigeración entre 4 y 8°C.

3.6.7. Consideraciones especiales para procesamiento de las muestras

- Cada muestra de suero que conforme el panel de verificación o los estándares biológicos deberán ser procesadas por cada una de las pruebas índice seleccionadas en cada una de las etapas del proceso.
- El procesamiento analítico de las muestras se llevará a cabo de acuerdo con las recomendaciones y procedimientos descritos en el inserto de cada estuche sin ninguna modificación. Las modificaciones no están permitidas en ningún proceso, sea pipeteo, lectura o interpretación de resultados. Cualquier variabilidad en el proceso técnico comparado con el inserto, inhabilitara los resultados obtenidos de la corrida analítica. Esto incluye las condiciones ambientales del laboratorio donde se realice el análisis de las muestras.
- Se tendrán en cuenta los tiempos de lectura de las pruebas descritas en cada uno de los insertos, esto no podrán ser modificados y se sugiere aplicar el tiempo menor de lectura según la prueba.
- Se procesarán las muestras en condiciones óptimas controladas de laboratorio, con un antecedente de monitoreo de condiciones ambientales que garantizará el cumplimiento de la temperatura y humedad relativa. Este monitoreo deberá socializarse previamente con el consultor encargado de la verificación.
- Se deberán garantizar las condiciones de metrología de los equipos utilizados en el proceso analítico de cada uno de los estuches.
- Las muestras de suero deberán ser procesadas por un solo analista, el cual debe evidenciar experiencia en el método en marco de la Unidad de Gestión de Calidad (UGC) existente en los laboratorios de UCREVE. En caso de no poder mostrar evidencia en el método en marco de la UGC, este deberá realizar una capacitación previa antes de montar los ensayos.
- En caso de que todos los estuches no puedan ser procesados por el mismo analista, podrá participar otro analista, pero cada uno de ellos deberá procesar la totalidad de un mismo estuche. Un estuche no puede estar procesado por más de un analista.

3.7. Reactivos utilizados

Se publicará una invitación con los requisitos de participación para el presente estudio en las páginas digitales de socialización e información del LNS a todas las casas comerciales

o proveedores de reactivos de laboratorio de análisis clínico, que tienen a su disposición pruebas serológicas para el diagnóstico de Chagas, los interesados en participar en éste estudio de verificación deberán emitir un oficio de intención de participación dirigido al LNS, donde confirmen su interés por participar y la descripción a detalle de cada uno de los reactivos e insumos con las cantidades a entregar; éste oficio servirá como constancia de participación.

Además deberán presentar un “Compromiso de imparcialidad y confidencialidad” con la finalidad de que se respete la imparcialidad y se garantice la independencia, integridad y confidencialidad del LNS en el ejercicio de sus actividades.

Los reactivos utilizados en la etapa 1 del estudio para evaluar el criterio de verdad en el presente ejercicio se describen en la siguiente tabla:

Tabla 2. Pruebas serológicas de referencia para la evaluación diagnóstica que se realizará en la etapa 2 y 3.

Método	Fabricante	Principio y Fracción antigénica	S (%)*	E (%)*
Métodos convencionales (extracto total)				
Chagatest Lisado	Wiener Lab.	Elisa lisado	100	99,04 - 99,60
Métodos no convencionales				
Antígenos recombinantes				
Chagatest ELISA Rec. V3	Wiener Lab. (Rosario, Argentina)	SAPA, Ag1, Ag2, Ag13, Ag30 y Ag 36	99,13 – 100	98,30 – 99,66

3.8. Equipos utilizados

Son necesarios los siguientes equipos, los cuales están disponibles en el LNS.

Tabla 3. Equipos necesarios para la verificación

Equipo	Inventario	Especificaciones técnicas	Operaciones de confirmación metrológica
Lector de ELISA	En proceso	Con disponibilidad del filtro de lectura de 450 nm y filtro diferencial de 620 nm	Equipo donado por el DNDi. Certificado de calibración inicial vigente

Lavador de placas de ELISA	En proceso	No aplica	Equipo donado por el DNDi. Certificado de calibración inicial vigente
Incubadora	0046915A	Capaz de suministrar una temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$	Certificado de mantenimiento preventivo y calificación vigente
Micropipeta monocanal	RU11650	Capacidad de 20 μl a 200 μl	Equipo donado por el DNDi. Certificado de calibración inicial vigente.
Micropipeta monocanal	RU11510	Capacidad de 100 μl a 1000 μl	Equipo donado por el DNDi. Certificado de calibración inicial vigente.
Micropipeta monocanal	RU11650	Capacidad de 2 μl a 20 μl	Equipo donado por el DNDi. Certificado de calibración inicial vigente
Micropipeta multicanal	K37955J	Capacidad de 30 μl a 300 μl	Certificado de calibración inicial vigente
Refrigeradora almacenamiento de reactivos FOGEL	000C4EB6	Capaz de suministrar temperatura de	Certificado de mantenimiento preventivo y calificación.
Ultra congelador almacenamiento de muestras THERMO	000C8350	Capaz de suministrar temperatura de $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$	Certificado de mantenimiento preventivo y calificación

NOTA: el LNS deberá garantizar las intervenciones metrológicas correspondientes a cada instrumento utilizado. No se iniciará el procesamiento técnico si no se cuenta con las intervenciones metrológicas actualizadas y vigentes.

3.9. Técnicas de recolección de información

- Fuente de información

La fuente de información es primaria, pues los datos se recolectarán de formatos de datos primarios donde se registran directamente los resultados de los equipos de lectura, la unidad de análisis deberá ser cada uno de los resultados generados del procesamiento analítico de las muestras de suero.

Los resultados de cada corrida analítica deberán ser validados de acuerdo con los criterios de validación interna de cada una de las pruebas, incluidos en el manual o inserto de las técnicas.

Adicionalmente, se analizará en cada corrida analítica un control interno negativo y otro positivo, y deberán ser incluidos en los protocolos de trabajo del laboratorio.

- Instrumento de recolección de información

Los resultados deberán ser obtenidos de forma física a través del equipo lector del inmunoensayo, tanto abierto como específico para algunas de las técnicas, con los cuales se obtendrán los índices de interpretación para el análisis de cada una de las muestras.

- Respaldo de los resultados analíticos

Para cada uno de los montajes en las diferentes etapas se deberá generar un respaldo de los análisis realizados. El lector de ELISA deberá estar programado para almacenar digitalmente cada corrida analítica donde se especifique: prueba, resultados de la DO de cada una de las muestras, cut-off de cada corrida analítica y fecha de procesamiento.

Con el fin de generar otro tipo de respaldo se generará evidencia fotográfica de acuerdo con las siguientes especificaciones:

- Para la etapa 1, deberá generarse un registro fotográfico de cada una de las placas procesadas y de cada una de las hojas de resultados que origine el equipo lector de las ELISAs.
- En la etapa 2, para las pruebas de HAI deberá generarse un registro fotográfico de cada una de las placas procesadas y del formato de datos primarios. Finalmente, para las pruebas de IFI se deberá generar resultado fotográfico de los datos primarios.

3.10. Control de errores y sesgos

Con el objetivo de garantizar la validez interna y externa del presente estudio, el posible riesgo de sesgo se controló de la siguiente manera:

- Selección de los pacientes

Las muestras de los pacientes deberán ser seleccionadas a partir de las tres fuentes descritas anteriormente, las cuales tienen sospecha clínica de la infección por *T. cruzi* en el momento de su ingreso al LNS y deberán ser seleccionadas teniendo en cuenta todo el espectro de la infección, desde muestras de pacientes con etapa aguda documentada y con seroconversión evidente (en caso de contar con ellas), correspondientes a aquellos que pueden llegar a encontrarse en el límite de detección de anticuerpos, muestras de pacientes en etapa crónica indeterminada asintomáticos y muestras de pacientes con francas cardiopatías chagásicas. Es decir, que para controlar el sesgo de selección deberá ser cubierto todo el espectro de las etapas clínicas de la enfermedad, además de incluir muestras de pacientes seronegativos.

Las muestras de donantes seronegativos provenientes de Laboratorio de Tamizaje Centralizado aportarán muestra que tengan bajo riesgo de infección por *T. cruzi*.

- Estándar de Referencia

Para la enfermedad de Chagas no existe un “*gold estándar*” de pruebas serológicas, ni tampoco una técnica específica validada y sugerida por la OMS, las pruebas de referencia generalmente son creadas localmente bajo parámetros establecidos por los expertos de diferentes entidades sanitarias internacionales, es decir, cada país o región desarrolla sus metodologías y las estandariza hasta obtener los mejores resultados. Teniendo esto en cuenta, la clasificación final de las muestras está dada por un algoritmo en paralelo, no con el resultado de una única prueba.

- Sesgo de verificación “*Work-up bias*”

Todas las muestras de suero que serán incluidas en el estudio deberán ser sometidas a las pruebas utilizadas como pruebas de referencia. Por tanto, todas las muestras del estudio deberán contar con resultados previos derivados del mismo instrumento de medición, controlando así el sesgo de referencia o verificación parcial.

- Sesgo de incorporación

Ninguna de las pruebas índices en la etapa 2 y 3, hacen parte de las pruebas de referencia, ambos grupos son pruebas independientes. De esta manera se controlará el sesgo de incorporación.

- Enmascaramiento en la interpretación de las pruebas

Una vez seleccionadas las muestras de suero que conformarán el panel de verificación, se deberán realizar alícuotas para las diferentes técnicas a evaluar, las cuales se identificarán con códigos aleatorios de cuatro dígitos para enmascarar o cegar el valor real y aleatorizar el orden de las muestras. De esta manera, en cada uno de los procesamientos realizados por cada técnica de ELISA, los valores reales de referencia (positivo/negativo) estarán enmascarados para el analista, es decir que en ningún momento durante el procesamiento se conocerán los resultados de las pruebas de referencia. Una vez procesadas todas las técnicas de ELISA, se abrirán las claves de los valores reales. De esta forma se controlará el sesgo de sospecha clínica o revisión.

- Exclusiones o indeterminados

Antes de la conformación final del panel de muestras de suero definitivo, se garantizará que el volumen requerido para el procesamiento de todas y cada una de las técnicas sea suficiente, evitando así la pérdida de unidades en el estudio. De esta manera se controlará el sesgo de exclusiones o indeterminados. En caso de que se presente alguna muestra insuficiente para continuar, esta muestra será reemplazada en su totalidad.

- Interpretación de resultados

La interpretación de los resultados de los procesamientos de los sueros se realizará de acuerdo con lo manifestado por los fabricantes de las técnicas serológicas y la lectura de la densidad óptica se realizará de forma automatizada con el equipo que contará con la trazabilidad metrológica garantizada que incluye mantenimientos preventivos y previas verificaciones. De esta manera se controló la pérdida de objetividad en la interpretación de los resultados.

3.11. Divulgación de los resultados

Los resultados de la evaluación serán incluidos en un informe técnico, el cual será aprobado por la Jefatura del Laboratorio Nacional de Salud. Los resultados generados a partir de esta evaluación no podrán ser publicados por ningún integrante del equipo técnico en ninguno momento.

4. Cronograma

El periodo de ejecución de la parte práctica está diseñada hasta agosto 2021. (Tabla 3)

Tabla 3. Cronograma de actividades

Actividad	2021																														
	Marzo					Abril				Mayo				Junio					Julio				Agosto					Septiembre			
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	5	1	2	3	4	1	2	3	4	5	1	2	3	4
1. Preparación del panel de muestras																															
2. Publicación de la convocatoria																															
3. Obtención de estuches de pruebas																															
4. Procesamiento analítico de pruebas Fase I																															
5. Procesamiento analítico de pruebas Fase II y III																															
6. Tabulación de resultados																															
7. Análisis de resultados																															
8. Elaboración del informe																															