



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

Facultad de Ciencias y Filosofía “Alberto Cazorla Talleri”

**“FACTORES RELACIONADOS EN LA DETERMINACIÓN DE
LA POTENCIA (DOSIS EFECTIVA 50) DE LAS VACUNAS
ANTIRRÁBICAS EN CULTIVO CELULAR DE USO
VETERINARIO PRODUCIDAS DURANTE EL 2011-2016.”**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE
SEGUNDA ESPECIALIDAD PROFESIONAL EN ESTADÍSTICA
EN INVESTIGACIÓN**

Autora:

ROXANA ELIZABETH JIMENEZ DE LA CRUZ

ASESORA:

LUZ CARBAJAL ARROYO

LIMA – PERÚ

2017

RESUMEN

Introducción: La potencia de las vacunas antirrábicas para uso veterinario producidas por el Instituto Nacional de Salud es determinada mediante el método in vivo NIH, este ensayo biológico tiene una alta variabilidad 25-400% debido a muchos factores como la propia respuesta del animal, su ambiente, la cepa o línea del animal, la cepa de virus para la prueba de reto, la experiencia del analista, la propia variabilidad inherente, entre otros. El objetivo del presente trabajo fue conocer ciertos factores que pueden estar relacionados con la determinación de la potencia.

Métodos: Se recopiló información relacionados al ensayo de potencia de los expedientes de los lotes de vacunas fabricados entre el 2011-2016, se realizó el análisis descriptivo de todas las variables cualitativas y cuantitativas, posteriormente se realizó el análisis inferencial mediante el análisis de varianza de un factor y se evaluó la potencia de la vacuna y del antígeno con las otras variables estudias pH y DL50 del virus. El análisis de varianza de medidas repetidas se utilizó para observar el comportamiento del pH y potencia de la vacuna en diferentes momentos de evaluación. El método Splines se utilizó para determinar la relación entre las variables cuantitativas potencias de vacuna y antígeno. Por último, mediante el método de correlación intraclase y el método de Bland y Altman se determinó el grado de acuerdo o concordancia entre evaluadores. Se utilizaron los programas estadísticos Combistasts versión Demo para realizar el test de validez estadística de la prueba NIH, Stata 12 para ejecutar el análisis descriptivo e inferencial (Anova de una vía, Anova de medidas repetidas, Splines), con el

programa Excel 2013 se elaboró las tablas estadísticas, y el programa Epidat 4.1 se utilizó para determinar la correlación intraclase.

Resultados: Los resultados arrojaron que la variabilidad del ensayo de potencia de las vacunas fue de 24.7%, siendo la media de 1.7 ± 0.4 UI/dosis. La variabilidad del antígeno fue de 26.3%, con una media de 1.9 ± 0.5 UI/dosis. Se encontró diferencia estadísticamente significativa entre las potencias del antígeno frente a los diferentes grupos de pH de antígeno ($p < 0.05$). El modelo Splines mostró que un segmento de la variable potencia de antígeno fue significativo explicando la variable potencia de vacuna, pero como modelo total no fue significativo. El grado de acuerdo entre los evaluadores fue buena (86%). No se evidenció diferencia estadísticamente en los meses de evaluación en la potencia de la vacuna, pero sí en el pH.

Conclusiones: Se determinó que existe diferencia estadísticamente significativa entre los diferentes grupos de pH del antígeno con respecto a su potencia. Además, se concluyó que el pH de la vacuna varía en el tiempo.

Palabras claves: vacuna, rabia, potencia, pH, prueba in vivo.

ABSTRACT

INTRODUCTION: The potency of anti-rabies vaccines for veterinary use produced by the National Institute of Health is determined using the NIH in vivo method, this biological assay has a high variability 25-400% due to many factors such as the animal's own response, its Environment, animal strain or line, virus strain for challenge test, analyst's expertise, inherent variability among others. The objective of the present study was to recognize certain factors related to the determination of potency.

METHODS: It compiled information related to the potency test of the vaccines batch produced among 2011-2016. It compiled information related to the potency test of the vaccines batch produced among 2011-2016. The descriptive analysis of all the qualitative and quantitative variables was carried out, then the inferential analysis was carried out by the analysis of variance one way, where the potency of the vaccine and the antigen were evaluated with the other variables studied: pH and virus's DL50. The analysis of variance of repeated measures was used to observe the behavior of the pH and the potency of the vaccine at different times of evaluation. The Splines method was used to determine the relationship between quantitative variables (vaccine and antigen potencies). Finally, it used the intraclass correlation method and the Bland and Altman method, to determine the degree of agreement between evaluators. The statistical programs Combistasts Demo version was used to carry out the evaluation of validity test, Stata 12 was used to the descriptive and inferential analysis (One-way Anova, Repeated measures Anova,

Splines), the statistical tables were elaborated with Excel 2013, and the Epidat 4.1 program was used to determine the intraclass correlation.

RESULTS: The results showed that the variability of the vaccine potency test was 24.7%, with a mean of 1.7 ± 0.4 IU / dose. The variability of the antigen was 26.3%, with a mean of 1.9 ± 0.5 IU / dose. A statistically significant difference was found between the antigen's potency versus the different antigen's pH groups ($p < 0.05$). The Splines model showed that a segment of the antigen's potency was significant explaining the vaccine potency variable, but as a total model it was not significant. The degree of agreement among the evaluators was moderate (67%). To evaluate the potency of the vaccine at different times, it was not statistically different in the months evaluated, but the pH changed significantly through the time.

CONCLUSIONS: It was determined that there is a statistically significant difference among the different pH groups of the antigen with respect to their potency. It is also concluding that the pH of the vaccine varies over time.

Keywords: vaccine, rabies, potency, pH, in vivo test.

“FACTORES RELACIONADOS EN LA DETERMINACION DE LA POTENCIA (DOSIS EFECTIVA 50) DE LAS VACUNAS ANTIRRÁBICAS EN CULTIVO CELULAR DE USO VETERINARIO PRODUCIDAS DURANTE EL 2011-2016.”

INFORME DE ORIGINALIDAD

16%

INDICE DE SIMILITUD

16%

FUENTES DE INTERNET

3%

PUBLICACIONES

4%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1

cybertesis.unmsm.edu.pe

Fuente de Internet

2%

2

vocabularios.caicyt.gov.ar

Fuente de Internet

1%

3

docplayer.es

Fuente de Internet

1%

4

www.scielo.org.co

Fuente de Internet

1%

5

insteractua.ins.gob.pe

Fuente de Internet

1%

6

www.slideshare.net

Fuente de Internet

1%

7

www.ub.edu

Fuente de Internet

1%

8

www.researchgate.net

Fuente de Internet

<1%

INDICE

I.	INTRODUCCION	1
1.1	MARCO TEÓRICO	4
1.1.1	Marco teórico	4
1.1.2	Marco conceptual.....	17
1.2.	ANTECEDENTES	21
II.	PREGUNTA DE INVESTIGACION	25
2.1	PROBLEMA PRINCIPAL	25
2.2	PROBLEMAS ESPECÍFICOS	25
III.	OBJETIVOS.....	25
3.1	OBJETIVO PRINCIPAL.....	25
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
IV.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	26
4.1	ELEMENTOS DE ESTUDIO	26
4.2	CRITERIOS DE INCLUSIÓN	26
4.3	CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	27
4.4	MUESTRA.....	27
4.5	PLAN DE ANÁLISIS DE DATOS.....	28
4.5.1	Limitaciones del estudio	29
4.5.2	Variables del estudio.....	30
4.5.3	Análisis estadístico e interpretación de la información	31
V.	RESULTADOS	32
VI.	DISCUSION	42
VII.	CONCLUSIONES	44
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	45
	ANEXOS.....	49
	ANEXO 01 INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS	49
	ANEXO 02 DEFINICIÓN OPERACIONAL DE LAS VARIABLES	51
	ANEXO 03 CARTA DE AUTORIZACION	52
	ANEXO 04 RESULTADOS CON 78 DATOS.....	53
	ANEXO 05 GRAFICOS.....	57
	ANEXO 06 LISTA DE COMANDOS EMPLEADOS (STATA)	65
	ANEXO 07 CODIGOS Y UNIDADES EMPLEADAS EN STATA	67

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Análisis de las variables cualitativas.....	33
Tabla 2.	Porcentaje de supervivencia de ratones	34
Tabla 3.	Análisis estadístico de las variables cuantitativas	35
Tabla 4.	Análisis de varianza de un factor	36
Tabla 5.	ANOVA de un factor de variables cuantitativas vs cualitativas	37
Tabla 6.	Análisis mediante regresión lineal y modelo Splines	38
Tabla 7.	Análisis de Coeficiente de Correlación Intraclase	40
Tabla 8.	Análisis de las variables potencia y pH por mes de evaluación	40
Tabla 9.	Análisis de varianza de medidas repetidas.....	42

I. INTRODUCCION

La producción de las vacunas antirrábicas en cultivo celular de uso veterinario consiste en cultivar el virus en líneas celulares de riñón de hámster neonato (BHK-21), después de algunos procesos de siembra y cosecha se obtiene el antígeno vírico de la rabia y luego es inactivado con bromoetilamina, en éste punto se evalúa la potencia para conocer si tiene las características mínimas necesarias para ser usada en la producción, el proceso se conoce como producto en etapa de material de partida o antígeno virus rábico inactivado, una vez confirmada su potencia el antígeno es formulado para ser envasado y convertirse en vacuna antirrábica en cultivo celular (producto terminado) en el cual también se realiza el ensayo de potencia para su liberación y comercialización del producto. El hecho de usar diferentes concentraciones de antígenos en cada lote de producción, provocan más aún que las potencias sean variables lote a lote, sumándole otras variables como la no estandarización y validación de los métodos de manufactura y de control de calidad, y el simple uso de animales de experimentación (1) (2).

A lo largo del tiempo se viene desarrollando la determinación de la potencia NIH de la vacuna antirrábica uso veterinario, que se produce en el Centro Nacional de Productos Biológicos (CNPB) del Instituto Nacional de Salud (INS). El Perú no escapa de la realidad, el INS como ente encargado de la producción nacional de las vacunas antirrábicas en cultivo celular para uso veterinario, realiza la determinación de la potencia

mediante el ensayo in vivo de potencia NIH desarrollada en 1953 por el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos.

Como se observa mucha variabilidad en cuanto a la estimación de la potencia de las vacunas antirrábicas, la Organización mundial de la Salud (OMS) y distintas organizaciones regulatorias han tratado de establecer lineamientos para reducir y controlar dicha variabilidad y uniformizar los procedimientos, técnicas, especificaciones, diseños experimentales en las diferentes entidades que fabrican este tipo de producto a nivel mundial, pero no elimina el problema, en algunos casos solo lo reduce (3) (4) (5).

Para asegurar la calidad, eficacia y eficiencia de las vacunas se realizan controles de calidad durante el proceso productivo (material de partida), en la etapa final (producto terminado) y en mediante estudios de seguimiento (estabilidad). Todo lote de vacuna antes de ser distribuida y comercializada tiene que cumplir con ciertos requisitos amparados por la ley de la salud en el Perú, una de ellas es la más importante asegurar la capacidad de producir inmunidad protectora necesaria en la población destino.

La rabia es una enfermedad que apareció desde 2300 años antes de Cristo siendo la primera vacuna de la rabia producida en 1885 por Louis Pasteur, se probó por primera vez en un niño mordido por un perro con rabia. La vacuna se elaboró a partir del tejido seco de la medula espinal de conejos infectados con el virus; posteriormente en 1911 el Lieutenant-Colonel Sir David Semple en India desarrolló la vacuna inactivada usando métodos químicos como el fenol. En 1959 empezaron a producir las vacunas

derivadas de embrión de huevo de pato para luego pasar a las células humanas diploides (1978 Wiktor, Plotkin y Koprowski). Estos 2 últimos tipos de vacunas son usadas actualmente para tratamiento post exposición y como método preventivo contra la rabia. La inmunización pasiva se llevó a cabo por primera vez en 1953 en Irán (6).

La rabia es una enfermedad zoonótica infecciosa, siendo un problema mundial de salud pública, la rabia es causada por un virus del género Lyssavirus que se trasmite al humano a través de la saliva de animales infectados de procedencia doméstica como perros gatos o silvestre como los murciélagos, zorros, zorrillos cuando suceden mordeduras o arañazos. El periodo de incubación es variable puede ir desde 10 días hasta 8 meses, los síntomas son cefalea, tembladeras, fiebre, nerviosismo y alteraciones motoras. Esta enfermedad es mortal cuando aparecen los síntomas, es por ello la gran importancia de la prevención mediante las vacunaciones caninas para reducir el riesgo en humanos (7).

Aunque la rabia se erradicó y controló a lo largo de los años en América latina mediante el uso de vacunas antirrábicas de uso humano y veterinario, aún aparecen casos en humanos por mordeduras de perros en Bolivia, Brasil y otros. También se reportó casos de rabia canina en lugares donde ya no había, como es Argentina, Paraguay, Brasil y Perú. En total se registraron 111 casos de rabia en humanos desde el 2011 en América Latina y el Caribe (7) (8) (9).

Se calcula que más de 15 millones de personas reciben vacunación post exposición, pero a pesar que se tiene una alta cobertura de prevención las muertes de humanos por rabia supera los 70.000 casos por año (7).

El virus de la rabia pertenece a la familia Rhabdoviridae, género Lyssavirus tipo 1, tiene forma de bala o bastoncillo y mide entre 130 y 240 por 65 y 80 nanómetros (nm). Consta de una sola cadena de ARN y su envoltura está constituida por lípidos cuya superficie contiene cinco proteínas estructurales: la G (glicoproteína) que alterna con proteínas matrices M1 y M2; en la nucleocápside se encuentran las proteínas N (nucleoproteína), NS (nucleocápside) y L (transcriptasa) codificadas por el ARN. La glicoproteína G es el mayor componente antigénico, responsable de la formación de anticuerpos neutralizantes que son los que confieren inmunidad (10) (11).

En la actualidad para determinar la potencia de las vacunas antirrábicas se toma como referencia la prueba de potencia NIH desarrollado por el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos en los años 1950 (3), los cuales elaboraron procedimientos, métodos y normas técnicas para evaluar la calidad de dichas vacunas.

1.1 MARCO TEÓRICO

1.1.1 Marco teórico

Los ensayos biológicos abarca 3 categorías: los ensayos de unión (ELISAs), los ensayos basados en células y los ensayos con animales, siendo éste último el más complejo que los otros en cuanto al cuidado, tiempo empleado en el mantenimiento, el elevado número de animales a usar y la alta variabilidad, pero se utilizan porque se puede comparar o estimar la respuesta biológica del animal frente a alguna droga y así medir la actividad que éste produce, permitiendo simular la respuesta biológica en un ser vivo. Se ha estimado que la variabilidad de estos

ensayos esta sobre el 400% (7) (12) en comparación con los de unión que va desde el 5 al 20%.

La prueba de potencia NIH es un ensayo experimental in vivo, realizado en ratones de experimentación, es el test estándar a nivel internacional para evaluar la potencia de las vacunas antirrábicas tanto para uso humano como veterinario, ésta técnica es muy costosa por el gran número de animales que se utilizan en el ensayo, las instalaciones requeridas para su mantenimiento y control, el tiempo empleado de los operarios y la larga duración de la prueba de 28 días (7) (13). Por otro lado, la OMS recomienda cumplir varios parámetros en cuanto a la validación del ensayo, uno de ellos implica la calificación de los analistas que ejecutan la prueba y el establecimiento de la variabilidad del ensayo.

La potencia de la vacuna antirrábica es determinada comparando la dosis necesaria para proteger a ratones contra los efectos clínicos de la dosis de virus de la rabia administrados intracerebralmente, con la cantidad de una referencia calibrada en Unidades Internacionales (UI), necesarias para proveer la misma protección (14). La estimación de la potencia en general tiene mucha imprecisión, actualmente varios laboratorios productores del mundo están implementando y validando pruebas in vitro como los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA), y pruebas como la Seroneutralización y RIFFT que utilizan menos animales, con la finalidad de reemplazar a la prueba de potencia NIH, lo cual conllevaría a minimizar el error y disminuir la variabilidad (15).

Las pruebas estadísticas que se utilizaron en el presente estudio fueron:

a) Correlación intraclase

Para establecer el grado de acuerdo entre 2 o más variables cuantitativas; el coeficiente de correlación intraclase CCI es la mejor opción. El CCI es la proporción que supone la varianza entre sujetos sobre la variabilidad total, se deriva del análisis de varianza de medidas repetidas(16) (17) (18), permite conocer cuál es el grado de la concordancia o de acuerdo que existe entre 2 o más operadores, métodos o instrumentos. Como se conoce existen 3 modelos los cuales dependerá según el objetivo del estudio, el modelo de un factor o una vía aleatorizado estudia la concordancia de varios evaluadores en un mismo sujeto, el modelo de doble vía aleatorizado va dirigido cuando los evaluadores como los sujetos están distribuidos aleatoriamente, y finalmente el modelo de doble vía con efecto fijo cuando se define los evaluadores y los sujetos son elegidos aleatoriamente. En este trabajo se evaluó la concordancia utilizando el modelo de doble vía aleatorizado para observar el grado de correlación entre operadores (concordancia inter observador) tomando como medición el resultado de la potencia NIH (variable cuantitativo continua) de una misma vacuna evaluada al mismo tiempo. Los supuestos que se deben de cumplir para esta prueba son principalmente la normalidad de las variables, además de

mantener la independencia de los datos, pero que al derivar de una ANOVA de medidas repetidas este supuesto no se cumple provocando un poco de imprecisión, además una gran desventaja es que al igual que el coeficiente de Pearson es muy sensible a la variabilidad de los datos, si la variabilidad entre estos es muy poca el CCI va a ser bajo, independientemente de que los métodos sean o no concordantes y a mayor variabilidad entre los sujetos, mayor va a ser el CCI (19), otra desventaja es que no explica o discrimina la variabilidad entre los métodos de medición o la diferencia debida a las observaciones (16) (19). Cortez y colaboradores (2010) mencionan: “al igual que para el coeficiente de Kappa, su interpretación es bastante subjetiva y se han presentado diferentes tablas para su interpretación, siendo que valores mayores a 0.90 se consideran muy buenos, buenas entre 0.71 a 0.90, moderada 0.51 a 0.70, mediocre con valores de 0.31 a 0.50, y nula o mala con valores menores a 0.30 (17) (20). La fórmula es la siguiente:

$$CCI = \frac{k * \text{Suma cuadrados entre} - \text{Suma cuadrados total}}{(k - 1) * \text{Suma cuadrados total}}$$

Donde k es el número de observaciones que se toman de cada sujeto.

Para estas debilidades, Lin (1989) desarrolló un método alternativo conocido como el coeficiente de correlación de concordancia (CCC), en el cual mide la concordancia mediante el análisis de la dispersión de los datos de ambos métodos en un plano cartesiano, evaluando 2 coeficientes el de Pearson (precisión) y el coeficiente de corrección de sesgo (exactitud), siendo más exigente la calificación del grado de acuerdo en términos de reproducibilidad. Más adelante Bland y Altman, mejoraron el método de Lin, mediante un gráfico de dispersión, estableciendo las diferencias entre dos mediciones del mismo sujeto o fenómeno en el eje de las ordenadas (y) frente a la media obtenida de ambas mediciones en el eje de las abscisas (x), estableciendo sus límites de concordancia según las desviaciones estándares de 1,96. La ventaja de este método es que es robusto cuando las variables no cumplen la distribución normal (16). Además; éste método brinda límites de concordancia de la diferencia de las mediciones partiendo de los intervalos de confianza +2 desviaciones estándar, lo que permite contrastarla con lo establecido en el estudio, y determinar si es o no de relevancia (20) (21).

b) Análisis De Varianza De Medidas Repetidas

El análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas también conocido como diseño intrasujeto o diseño de bloques

aleatorizados es empleado principalmente para 3 motivos como señala Llobell y colaboradores: evaluar el comportamiento de sujetos en diferentes condiciones en estudios transversales, cuando se desea medir a los mismos sujetos al realizarles diferentes pruebas psicométricas, y cuando se quiere realizar una evaluación longitudinal a lo largo del tiempo (22), siempre y cuando se cumpla el supuesto de normalidad, homogeneidad de varianza (o esfericidad) e independencia. Llobell y colaboradores también mencionan que al usar a los mismos sujetos para realizar varias mediciones se minimizan costos y tiempo, incrementa la potencia y precisión de la prueba ya que controla las diferencias individuales y por ende la variabilidad intrasujeto es eliminada del error, atribuyendo solo la variabilidad entre los grupos. El modelo es el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \beta_i + T_j + \varepsilon_{ij}$$

i: 1, 2, n_j, j= 1,2,.....,k

Donde:

Y_{ij} = la puntuación del i sujeto bajo la j condición experimental o tratamiento.

μ = la media global de los datos del experimento.

$\beta_i = \mu_i - \mu$, es el efecto asociado al iésimo sujeto.

$T_j = \mu_j - \mu$, es el efecto del jésimo nivel de la variable tratamiento A.

$\varepsilon_{ij} = Y_{ij} - \mu_j$, es el error experimental asociado al i sujeto bajo el j tratamiento.

Una de las desventajas o inconvenientes de éste estadístico es que se produce los llamados efectos de arreste, efectos de orden o secuencia de administración o la propia fatiga del sujeto, pero que se puede solucionar mediante la técnica de contrabalanceo descrito por Underwood y Shaughnessy (1978), aleatorizando el orden en la administración de los tratamientos (22)(23)(24)(25). El principal inconveniente de ésta prueba es que se incumple un importante supuesto estadístico el de independencia ya que son las mismas unidades de análisis o sujetos los que son medidas varias veces, produciéndose el efecto sistemático y generando la existencia de correlación entre los errores, Girden señala “cuanto mayor sea el patrón de correlaciones, menor será la varianza residual, aumentando la probabilidad de que los resultados de la prueba F resulten estadísticamente significativos” (24). Éste problema ligado al no cumplimiento de la esfericidad o homogeneidad de varianzas se soluciona realizando unos ajustes de corrección (Box, Huynh-Feldt, Geisser-Greenhouse) reduciendo los grados de libertad para que el F se conserve, no se cometa el error tipo I y la potencia no baje (22).

La hipótesis nula del modelo asume que los efectos de los tratamientos o momentos son nulos, quiere decir que no hay diferencia en las medias de éstos. Siendo la hipótesis alterna lo contrario, al menos existe una desigualdad de una media. El

estadístico de prueba F, bajo un nivel de significancia de $\alpha=0.05$, se halla mediante el cálculo de las sumas de cuadrados: $SC_{total} = SC_{sujeto} + SC_{tratamiento} + SC_{sujeto \times tratamiento}$. La comparación múltiple por Bonferroni es usada en este tipo de ANOVA ya que es el más conservador permitiendo comparar mediante la distribución T las diferencias de medias. El tamaño del efecto de un ANOVA medidas repetidas está dado según la fórmula de *eta²parcial* (26) (27):

$$n^2p = \frac{SC_{condicion}}{SC_{condicion} + SC_{error}}$$

La contraparte al ANOVA de medidas repetidas es el estadístico no paramétrico de Friedman desarrollado en 1937, se usa cuando no se cumple el supuesto de normalidad, o cuando se tiene la variable en escala ordinal, siempre y cuando cumpla con los supuestos de independencia entre los tratamientos y de aleatorización de los datos (28).

Estas pruebas son las indicadas para realizar el análisis del comportamiento en el tiempo de las potencias y del pH de las vacunas a evaluar, para poder definir si hay cambios significativos o no en el tiempo de estos 2 atributos importantes que definen la calidad de la vacuna y que asegura su eficacia según su fecha asignada de caducidad.

Uno de los supuestos de ANOVA de medidas repetidas es la esfericidad mediante el uso de la prueba de Mauchly, pero en el estudio se consideró utilizarla prueba de Levene porque ésta

es más versátil, siendo los datos convertidos y tratados como si fueran de ANOVA One way. Mauchly tiene la desventaja de ser sensible a la desviación de la normalidad multivariada y el test de Levene es robusto a la no normalidad de los datos (22).

c) Análisis de Varianza de un Factor

Por otro lado la prueba Análisis de varianza de una vía sirve para comparar la media en más de 2 grupos, la variable dependiente es cuantitativa, la independiente es cualitativa o categórica, además no es necesario que todos los grupos sean del mismo tamaño, y cuanto mayor es el tamaño de los grupos es menos importante garantizar la normalidad o homocedasticidad (igualdad de varianzas de los grupos), el ANOVA one way es robusto con respecto a la normalidad de los datos excepto en el caso de varianzas desiguales en muestras con tamaños distintos (29). Esta prueba se usa para determinar si la variabilidad de la variable cuantitativa es explicada por la diferencia entre los grupos de las variables cualitativas mas no por la variabilidad dentro de los grupos, y si es estadísticamente significativo, ya que la varianza se descompone en la variabilidad que existe entre tratamientos y dentro tratamientos (25) (30). Siendo el modelo:

$$Y_{ij} = \mu + T_j + \varepsilon_{ij}$$

$i: 1, 2, \dots, n_j, \dots$ $j= 1, 2, \dots, k$

Donde:

Y_{ij} = la puntuación del i sujeto bajo la j condición experimental o tratamiento.

μ = la media global de los datos del experimento.

$T_j = \mu_j - \mu$, la diferencia entre la media global y la media de j tratamiento,

es el efecto o impacto de la variable tratamiento.

$\varepsilon_{ij} = Y_{ij} - \mu_j$, es el error experimental aleatorio asociado al i sujeto bajo el

j tratamiento, cantidad en la cual la media individual difiere de la media de la

población.

Por ser una prueba paramétrica los supuestos que se requieren son: normalidad, independencia, aleatoriedad de los datos y homogeneidad de las varianzas, pero el incumplimiento de la normalidad puede ser permisible siempre y cuando se cumplan los demás supuestos, y la homogeneidad de las varianzas cuando los grupos son del mismo tamaño (29), además Azmeri menciona que el Anova es aún mejor opción que la prueba no paramétrica Kruskal Wallis cuando la muestra es pequeña $n < 30$ (31).

La hipótesis nula asume que los grupos o tratamientos experimentales provienen de la misma población y por lo tanto las medias son iguales. La hipótesis alternativa asume que por lo menos hay un par de medias que son diferentes de las demás.

El estadístico de prueba F, bajo un nivel de significancia de $\alpha=0.05$, se halla mediante el cálculo de las sumas de cuadrados: $SC_{total} = SC_{entre} + SC_{dentro}$

Para establecer el tamaño del efecto se usó la fórmula de Omega cuadrado ω^2 según Olejnik 2003 (26) y Pagano 2010 y (29):

$$\omega^2 = \frac{SC_{entre} - (k-1)CM_{dentro}}{SC_{total} + CM_{dentro}}$$

Para cualquier análisis de varianza cuando se rechaza la hipótesis nula se realizan análisis posteriores como las comparaciones múltiples para determinar en cuál o cuáles de las medias poblacionales son las diferentes. En la actualidad hay varias pruebas para este análisis según la distribución estadística para realizar el cálculo: basadas en la distribución t (Bonferroni, Dunn-Sidak, Holm-Shaffer), basadas en la distribución del rango estudentizado (Newman, Duncan, Peritz), las basadas en la distribución F (Scheffe, F de Newman, F de Ryan), entre otras. La prueba de Scheffe compara todas las posibles medias, usando el error típico de la varianza residual o intragrupo obtenida del análisis de la varianza y no requiere que el modelo sea equilibrado, además ésta prueba es la más conservadora que controla todas las posibles comparaciones asegurando no cometer el error tipo I (29).

A pesar que algunas variables no cumplieron el test de normalidad, se decidió utilizar ANOVA, porque según la

literatura ésta prueba es robusta y es mínimamente afectada al violar dicho supuesto, así como la homogeneidad de varianza en muestras de tamaño igual (29) (31).

d) Modelo De Regresión Mediante El Uso De Splines

El uso de los análisis de regresión lineal cuando se desea analizar una variable explicativa o independiente en razón de una variable dependiente es muy usado en la actualidad siempre y cuando cumplan los supuestos de distribución normal, linealidad, aleatoriedad, e independencia. La regresión según la finalidad que se busca puede estimar o predecir el valor de una variable a partir del modelo generado. Este modelo va de la mano de la correlación la cual mide la relación entre las variables en estudio (25) (30) (32).

Cuando no se cumple el supuesto de linealidad en las variables cuantitativas el modelo de regresión lineal no es el adecuado, para ello el modelamiento mediante segmentos (SPLINES) es una alternativa para relaciones no lineales, aunque existe otros más (Lowess, transformaciones, polinomios) pero por su sencillez y fácil interpretación son los comunes, las ventajas de este modelo es que amolda y suaviza la curva que es definida en porciones por polinomios, además funciona bien en curvas complicadas y lo más importante se puede usar en diferentes modelos de regresión (lineal, logística, poisson, etc). El concepto del modelo es simple, se generan varios segmentos

de la variable (x) que son unidos por nudos en diferentes puntos, cada segmento se transforma en una función polinómica (lineal, cúbicos o cuadráticos y luego se estima en el modelo de regresión requerido, mientras más nudos se generen, se ajusta mejor a los datos (33)(34)(35)(36)(37) (38)(39). El modelo es el siguiente:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 S_1 + \beta_2 S_2 + \beta_3 S_3$$

Dónde:

β_0 = es la pendiente,

$\beta_1, \beta_2, \beta_3$ = son los coeficientes de la variable x;

S_1, S_2, S_3 = son los segmentos creados.

La interpretación de los coeficientes hallados en los Splines lineales es que el coeficiente del primer Splines lineal es la pendiente para el primer segmento, y los demás coeficientes son las diferencias en las pendientes con respecto al primer segmento (33).

Cálculo de las pendientes:

$$S_1 = X_1$$

$$S_2 = X_1 + X_2$$

$$S_3 = X_1 + X_2 + X_3$$

Se evalúa también la linealidad de los segmentos mediante el test de Wald, donde la hipótesis nula es:

$H_0: \beta S_2 = \beta S_3 = \dots = \beta S_k = 0$, (linealidad entre X y Y). Los coeficientes de los Splines adicionales son similares a 0 (33).

La utilización de Splines tiene muchas ventajas las más principales es que puede ofrecer mejor ajuste a variedades de formas y es aplicable a varios modelos de regresión, pero como desventajas es que es un poco difícil su interpretación, el número y/o ubicación de los nudos es arbitraria pero no afecta su función y requiere regular tamaño de muestra.

Para comparar varios modelos se puede utilizar 2 criterios y seleccionar el mejor modelo, éstas son llamadas medidas de información que brindan comparación entre distintos modelos, el primero es el AIC (Akaike Information Criteria), se calcula usando la verisimilitud del modelo y el número de parámetros, siendo su fórmula: $(-2 \ln L + 2k)/N$. Y el segundo es el BIC (Bayesian Information Criteria), usa la verosimilitud del modelo y sus grados de libertad, siendo su fórmula: $D^2 - (N-k) \ln(N)$. La interpretación de ambos criterios son similares; mientras sean menores el modelo tiene mejor ajuste (40).

1.1.2 Marco conceptual

- **Anticuerpo:** Moléculas de inmunoglobulinas que tienen una secuencia específica de aminoácidos en virtud de la que interactúan sólo con un antígeno, o algo muy similar, que induce su síntesis en las células de la serie linfocítica (especialmente las células plasmáticas) (41).
- **Antígeno:** Sustancias que son reconocidas por el sistema inmune y que inducen una reacción inmune (41).
- **Animal de laboratorio.** - El Animal de laboratorio es “cualquier especie animal que se mantiene bajo condiciones determinadas y se utiliza con fines científicos” (42).

- **Análisis de regresión.** - Procedimientos para encontrar la función matemática que mejor describa la relación entre una variable dependiente y una o más variables independientes. en regresión lineal la relación se reduce a ser una línea recta y se utiliza el análisis de los mínimos cuadrados para determinar lo que mejor se ajusta. en regresión logística la variable dependiente es cualitativa más que continuamente variable y se utilizan las funciones de verosimilitud para encontrar la mejor relación. en la regresión múltiple, se considera que la variable dependiente depende de más que de una única variable independiente (41).
- **Análisis de varianza (ANOVA).** - Una técnica estadística que evalúa la contribución de los factores incondicionales para la variación en la media de una variable dependiente continua (41).
- **ANOVA de medidas repetidas:** Análisis de varianza usada para medir variables continua en diferentes momentos o en el mismo tiempo (22).
- **ANOVA de un factor:** Análisis de varianza usada para medir la variabilidad de un fenómeno continuo explicado por la diferencia de grupos de variables cualitativas (25) (30).
- **Coefficiente de correlación intraclass:** Método para evaluar la concordancia entre 2 o más mediciones de variables cuantitativas (16) (17) (18).
- **Concentración de iones de Hidrogeno.** - Normalidad de una solución con respecto a los iones de HIDRÓGENO. Está relacionado a las mediciones de acidez en la mayoría de los casos por $\text{pH} = \log \frac{1}{2} \left[\frac{1}{2} \right]$

(H +)], donde (H +) es la concentración de iones de hidrógeno en gramos equivalentes por litro de solución (41).

- **Concordancia:** Correspondencia o conformidad de una cosa con otra (16)
- **Concordancia Inter observador:** Consistencia entre observadores distintos al evaluar una misma medida en un mismo individuo (20)
- **Dosis efectiva mediana (DE50).**- Es la dosis que produce una respuesta en el 50 por ciento de la población (14).
- **Dosis letal mediana (DL50).**- La dosis de sustancias venenosas o tóxicas o la dosis de radiación ionizante que se requiere para matar al 50 por ciento de la población sometida a prueba (41).
- **Estabilidad de medicamentos.**- La integridad química y física de un producto farmacéutico (41).
- **Estadística no paramétrica.** - Una clase de métodos estadísticos aplicable a un gran grupo de distribuciones de probabilidades empleados para probar la correlación, localización, independencia, etc. En la mayoría de los test estadísticos no paramétricos los resultados originales u observaciones son remplazados por otra variable que contiene menos información. Una clase importante de test no paramétricos emplea las propiedades ordinales de los datos. Otra clase de test emplea información acerca de si una observación está por encima o por debajo de algún valor fijado como la media, y una tercera clase se basa en la frecuencia de ocurrencia de series en los datos (41).

- **Fiabilidad:** Grado en el que se obtienen los mismos valores al efectuar la medición en más de una ocasión bajo condiciones similares (20).
- **Modelos estadísticos.-** Representación de un sistema, proceso o relación a través de una forma matemática en la cual las ecuaciones se usan para inferir o estimar su funcionamiento o interrelación (41).
- **Modelos lineales:** Modelos estadísticos en los cuales el valor de los parámetros son linealmente proporcionales a las variables dependientes, por ejemplo, $y = a + bx$, donde y es la respuesta, x es un factor de interés y a & b son los parámetros (41).
- **Potencia de la vacuna:** La relación entre una respuesta inmune adaptativa y la dosis de la vacuna administrada (41).
- **Rabia.-** Infección viral aguda del sistema nervioso central que afecta a los mamíferos incluyendo a los humanos. Es causada por el virus de la rabia y que se extiende generalmente por la contaminación con saliva cargada de virus de las mordeduras infligida por animales rabiosos. Son importantes vectores animales el perro, gato, murciélago, zorro, mapache, mofeta y lobo (41).
- **Reactivo biológico.** - El reactivo biológico es un animal estandarizado, lo que significa que tiene una composición genético-sanitaria definida, son criados y mantenidos en ambientes controlados que cumplen con los requerimientos específicos para cada especie, los cuales garantizan, además el bienestar animal (42).
- **SPLINES:** Modelo usado cuando se presentan relaciones no lineales de variables cuantitativas. Se basa en partir la variable x en segmentos

unidos por nudos. Se puede usar en cualquier tipo de modelo de regresión (33).

- **Validez:** Expresa el grado en el que realmente se mide el fenómeno de interés (20).
- **Virus de la rabia.** - Especie típica de LYSSAVIRUS causante de rabia en humanos y en otros animales. La transmisión es fundamentalmente por mordedura de animales a través de la saliva. El virus es neurotrópico y se multiplica en las neuronas y miotubos de los vertebrados (41).
- **Zoonosis.-** Enfermedades de animales no humanos que pueden transmitirse a HUMANOS o pueden ser transmitidas de humanos a animales no humanos (41).

1.2. ANTECEDENTES

El Centro Nacional de Productos Biológicos del Instituto Nacional de Salud es el responsable de la producción de la vacuna antirrábica en cultivo celular de uso veterinario para cubrir las necesidades de programas de prevención y vacunación canina en el país, la producción se realiza bajo los lineamientos de la OMS según informe técnico nº 31 (2), el producto tiene una vigencia de 15 meses a partir de su fecha de fabricación, éste es una suspensión líquida mantenida y fabricada en una línea celular BHK, preservada con hidróxido de aluminio y elaborada a partir del virus de la rabia inactivado denominado comúnmente como material de partida, la potencia mínima requerida (eficacia) de la vacuna establecida por las entidades regulatorias es de 1.0 UI/dosis, las vacunas

antirrábicas producidas por el INS superan dicha especificación cumpliendo con todos los controles de calidad en cuanto a su eficacia, seguridad y calidad.

La potencia de la vacuna es estimada mediante el ensayo de potencia NIH in vivo que viene a ser un ensayo biológico con respuesta cuantitativa (vivo/muerto, todo/nada), el cual es usado cuando es difícil o laborioso medir el efecto en cada unidad experimental en una escala cuantitativa, contando el número de animales en el cual ocurre el evento(14). En este tipo de ensayos in vivo se utilizan reactivos biológicos (ratones albinos), el esquema de inmunización consiste en 2 tiempos con intervalos de 7 días con 3 diluciones, al día 14vo se inocula una cantidad conocida y fija de virus y se observa por 10 días la cantidad de sobrevivientes de ratones, en total el ensayo de potencia NIH dura 28 días (3).

Se conoce que por ser valoraciones biológicas éstas son poco precisas debido al error experimental propio del ensayo, propiciando ensayos inválidos cercanos al 42% (7) influenciados por factores internos y externos del ensayo(1) (43). Estos factores son la propia variabilidad inherente de las respuestas biológicas de los animales de experimentación, la raza, el estado de salud y edad adecuada de los animales, el tipo de cepa de CVS (cepa virus fijo) empleada, la virulencia del mismo (dosis reto DL50), el performance y experticia de los analistas que realizan el ensayo (1) (3).

Además de ello, en la rutina se evidencia que los resultados de las potencias de los diferentes lotes evaluados de las vacunas

antirrábicas que se producen son muy variables entre analistas que evalúan un mismo lote, entre diferentes lotes y dentro de un mismo lote a lo largo del tiempo (estudios de seguimiento).

Miceli y colaboradores en 1993, evaluaron estadísticamente la reproducibilidad de la potencia in vivo NIH de vacunas antirrábicas en Cerebro de ratón lactante (CRL) en BHK con la prueba in vitro de contrainmunolectroforesis (CIE) mediante el análisis de regresión lineal y el coeficiente de correlación donde obtuvieron una buena correlación, también evaluaron la disminución de la potencia de la vacuna en CRL almacenadas a 37°C mediante regresiones lineales (44) (15).

Weimersheimer José y Rubio Elizabeth (1999) estudiaron la termo estabilidad de la vacuna antirrábica al probar la radiación gamma como inactivador del virus, en su artículo mencionaron que las vacunas antirrábicas producidas en cultivo celular al someterlos a estudios de estabilidad (para comprobar su comportamiento en diferentes tiempos) sufrieron cambios o disminución de la potencia, éstos cambios fueron atribuidos al uso de la beta propiolactona que actúa en la formulación como inactivador del virus, lo cual tiene ciertos inconvenientes si no se almacena adecuadamente (45) (46).

Stokes W. y col (2012) en su trabajo publicado concerniente a métodos alternativos para determinar la potencia de las vacunas antirrábicas de uso humano y veterinario, detallaron todos los retos que conlleva la prueba de potencia in vivo, mencionando que la variabilidad del ensayo es enorme (25 al 400%), y que si no se tiene

los procesos de producción validados éste se agranda, por otro lado recomendaron que por registrarse ensayos inválidos (42%) al no cumplir los parámetros establecidos, se debería ejecutar 2 ensayos más para definir la potencia de la vacuna, lo cual involucra el aumento de uso de animales (7).

Gontu Abhinay y colaboradores en el 2014 emplearon el análisis de correlación de Pearson y regresión lineal en la cuantificación de antígenos donde enfrentaron la prueba in vitro versus la prueba in vivo NIH (1).

En el 2015 Sigoillot y colaboradores publicaron un trabajo concerniente a la cuantificación de la glicoproteína G del virus de la rabia usando anticuerpos monoclonales mediante un técnica in vitro ELISA, los resultados determinaron que la glicoproteína G cambia su estructura tridimensional cuando se sometía a diferentes pH afectando la antigenicidad del virus. Demostraron que a pHs superiores a 7, la glicoproteína se hallaba en su estructura nativa la cual le brindaba una propiedad altamente antigénica, y al disminuir el pH menos de 6.4 la glicoproteína se inactivaba, pero en un estado reversible (11).

II. PREGUNTA DE INVESTIGACION

2.1 PROBLEMA PRINCIPAL

¿Existirá relación entre la potencia de las vacunas antirrábicas en cultivo celular de uso veterinario con la potencia del Antígeno de virus rábico inactivado, el pH de los antígenos, el pH de la vacuna, la DL50 obtenida, la concordancia entre analistas que ejecutan el ensayo, y el comportamiento de la potencia y pH en los diferentes periodos de evaluación?

2.2 PROBLEMAS ESPECÍFICOS

- ¿Se conoce si la potencia y pH del antígeno (material de partida), el pH de la vacuna y la Dosis letal media (DL50) del virus están relacionadas con la potencia de la vacuna?
- ¿Se conoce el grado de concordancia o de acuerdo entre los evaluadores al realizar la prueba de potencia en un mismo lote de vacuna?
- ¿Se conoce el comportamiento de la potencia y del pH de las vacunas en el tiempo?

III. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Conocer la relación entre la potencia de las vacunas antirrábicas en cultivo celular de uso veterinario con la potencia y pH del Antígeno de virus rábico inactivado, el pH de la vacuna, Dosis letal media (DL50) del virus, la concordancia entre analistas que ejecutan el ensayo, y el

comportamiento de la potencia y pH en los diferentes periodos de evaluación.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar a los factores (potencia y pH del Antígeno de virus rábico inactivado, pH de la vacuna, Dosis letal media (DL50) del virus) que estén relacionados con la potencia de la vacuna.
2. Determinar el grado de concordancia o acuerdo entre los analistas que evalúan la potencia de un mismo lote de vacuna simultáneamente.
3. Describir el comportamiento de la potencia y del pH de las vacunas evaluadas durante los diferentes meses de evaluación.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

La investigación fue de tipo básica, cuantitativa, longitudinal, retrospectiva, observacional y descriptiva.

4.1 ELEMENTOS DE ESTUDIO

Los elementos de estudio son las vacunas antirrábicas en cultivo celular de uso veterinario producidas en el INS durante el 2011 al 2016.

4.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Los lotes de vacunas, para ser considerados dentro del estudio como unidades de muestreo, debían cumplir con los siguientes criterios:

- Los lotes de vacunas fabricados durante el 2011 al 2016.
- Cumplir con el test de validez estadístico para ensayos biológicos:
 - ✓ Regresión $p < 0,05$: Existe relación lineal entre el logaritmo de la dosis y la respuesta

- ✓ Linealidad y paralelismo $p > 0,05$: No existe desviaciones significativas de paralelismo y linealidad
- ✓ Límites superior e inferior de la vacuna (25-400%).

Además de las siguientes condiciones:

- ✓ Dosis Letal 50 (12 -50 DL50/0.03 mL)
- ✓ Porcentaje de sobrevivencia $\leq 60\%$ de animales en la menor dilución en la vacuna de referencia y la muestra.
- ✓ Los lotes de vacunas producidos según protocolo de producción establecido, sin ninguna modificación o alteración relevante que implique la calidad del producto.

4.3 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Los lotes de vacunas que presentaron alguno de los criterios listados abajo, no fueron considerados como unidades muestrales del estudio:

- Los lotes de vacunas que no cumplieron los criterios de validez mencionadas arriba.
- Los lotes de vacunas en estudio de estabilidad por motivos de cambios o desviaciones respecto a los protocolos de fabricación.

4.4 MUESTRA

Para el desarrollo del análisis, se seleccionaron los expedientes de los lotes de vacunas evaluados durante los años 2011 al 2016, se realizó un análisis exploratorio de datos para la descripción de las características generales, y la limpieza respectiva.

La unidad de análisis fueron frascos de lotes de vacunas antirrábicas en cultivo celular de uso veterinario y de antígenos virus rábicos inactivados.

4.5 PLAN DE ANÁLISIS DE DATOS

- Para evaluar la potencia se recolectó 91 lotes de vacuna con sus respectivos lotes de antígenos (41) los cuales sirvieron para fabricar las vacunas, se evaluó los criterios de inclusión y exclusión.
- Para el estudio de seguimiento, de los 91 lotes se escogieron a 27 lotes que cumplieron con los criterios de inclusión y de exclusión.

Se recolectó la información según formulario **Anexo 1**.

Se realizó la verificación y limpieza de la base de datos secundarios; para evaluar la potencia de la vacuna relacionada a las diferentes variables en estudio de los 91 lotes se eliminaron 7 lotes de vacunas y 6 lotes de antígenos porque no cumplieron el test de validez del ensayo, quedando solo 78 valores, de éstos 78 valores se eliminaron 5 datos atípicos de pH (7.5 y 7.9) correspondientes a 3 lotes de antígeno quedando 73 datos, además se eliminó un valor atípico de pH de vacuna de 7.8 (lote 10600514) quedando solo 72 datos para el análisis correspondiente. Los 13 lotes de vacunas eliminados por no cumplir el test de validez fueron: 11000791, 11000781, 10800601, 10500481, 11000602, 10800613, 10600196, 10400391, 11100841, 11100831,

10800603, 11100974 y 11100964, los 5 lotes de vacunas eliminados por datos atípicos de pH fueron: 10900671, 10900661, 1100612, 10200164 y 10200124.

Con respecto al estudio de seguimiento de las variables potencia y pH de vacuna, se obtuvo la siguiente distribución de datos:

Tiempo (mes)	Frecuencia de lotes		Frecuencia de lotes	
	Inicial	Eliminados	Potencia	pH
1(0)	27	04	23	23
2 (3)	12	03	9	9
3 (6)	18	03	15	15
4 (9)	16	01	15	14
5 (12)	24	04	20	20
6 (15)	23	02	21	21
7 (18)	13	01	12	12
Total	133	18	115	114

Inicialmente se obtuvo 133 valores correspondientes de los 27 lotes, se depuraron 18 valores por no cumplir el test de validez del ensayo, quedando solo 115 para el caso de la potencia y 114 para el pH porque se detectó un valor perdido.

4.5.1 Limitaciones del estudio

- La limitante principal fue que se utilizó datos secundarios, por lo que no se pudo tener control en la recolección directa de los datos y en el diseño del estudio.

- Otra limitante hallada fue que no se encontró otros trabajos similares al realizado para poder realizar la discusión de los resultados obtenidos y compararlos.
- No se calculó el tamaño de muestra para el estudio, ya que se tomó en cuenta todos los expedientes de lotes que se tenía.
- Por otro lado no se evaluaron otras variables confusoras como el tipo de inactivador del virus, el tipo de frasco de envasado o el tipo de adyuvante utilizado, siendo el trabajo presente base para elaborar investigaciones posteriores.

4.5.2 Variables del estudio

- ✓ Potencia de vacuna antirrábica
- ✓ Potencia de antígeno
- ✓ pH de antígeno
- ✓ pH de vacuna
- ✓ Dosis letal media del ensayo de potencia (DL50)
- ✓ Evaluadores de la potencia
- ✓ Mes de seguimiento de la vacuna

La evaluación de las variables se llevó a cabo mediante su definición operacional, en la cual se establece la descomposición de las variables en sus indicadores y escalas de medición **Anexo 02.**

4.5.3 Análisis estadístico e interpretación de la información

Para el procesamiento y análisis de los datos se utilizaron los programas estadísticos Combistasts versión Demo para realizar el test de validez estadística de la prueba NIH, Stata 12 para ejecutar el análisis descriptivo e inferencial (ANOVA de una vía, ANOVA de medidas repetidas, Splines), con el programa Excel 2013 se elaboró las tablas estadísticas, y el programa Epidat 4.1 se utilizó para determinar la correlación intraclase mediante el método Bland y Altman.

- ✓ Se realizó un análisis estadístico de todas las variables cualitativas y cuantitativas, se utilizó la prueba Z para comparar dos proporciones independientes, así como la prueba Chi² de bondad de ajuste para categorías con más de 2 grupos para determinar si las frecuencias observadas y las esperadas son o no iguales entre los grupos. Los supuestos de la prueba Chi²: $n > 30$ y frecuencias esperadas > 5 se cumplieron en todos los casos. Se utilizó la prueba de Shapiro Wilk para evaluar la normalidad de las variables.
- ✓ Para identificar que variables (pH de vacuna, pH de antígeno y DL50) están relacionadas a la potencia de la vacuna, se utilizó ANOVA de un factor. También se consideró evaluar la potencia del antígeno frente a grupos de pH del antígeno y DL50. Se evaluaron los supuestos de normalidad, homogeneidad de varianzas e independencia de los datos, la prueba de post hoc según Scheff y el tamaño del efecto. Se utilizó la técnica de los

Splines lineales para evaluar el comportamiento de las 2 variables cuantitativas: potencia de vacuna y potencia de antígeno.

- ✓ Para determinar el grado de acuerdo entre evaluadores se utilizó el coeficiente de correlación intraclase (CCI), además se utilizó el método de Bland y Altman para evaluar el sesgo sistemático y precisión de los valores.
- ✓ Para describir el comportamiento de la potencia y pH de la vacuna en diferentes momentos de evaluación se utilizó ANOVA de medidas repetidas, se corroboró sus supuestos y se realizó la prueba de post hoc de Bonferroni, así como el tamaño del efecto.

V. RESULTADOS

En el análisis de las variables cualitativas estudiadas (**Tabla 01**), se observó que el porcentaje de test válidos de la vacuna y del antígeno fue mayor al 90%. Por otro lado, se determinó que el pH más frecuente de la vacuna fue de 8.0 con un 63.9% (Figura N°01), y del antígeno fue de 7.7 representando un 48% (Figura N°02). La DL50 obtenida durante el ensayo de potencia NIH para el caso de la vacuna fue de 16 a 20 DL50/0.03 mL (Figura N°03) y del antígeno la más frecuente fue 13 DL50/0.03 mL (Figura N°04). Dichos resultados presentaron diferencias de proporciones a nivel poblacional ($p < 0.05$).

TABLA 1. ANÁLISIS DE LAS VARIABLES CUALITATIVAS

Variable	Grupos	Frecuencia observada	%	IC95%	Prueba estadística (p-valor)
Vacuna Test de Validez	No Cumple	7	7.7	2.2; 13.2	8.07* (0.000†) 2 gl
	Si Cumple	84	92.3	86.8; 97.8	
	Total	91	100.0		
Antígeno Test de Validez	No Cumple	8	8.8	3.0; 14.6	7.86* (0.000†) 2 gl
	Si Cumple	83	91.2	85.4; 97.0	
	Total	91	100.0		
PH de Vacuna	7.9	17	23.6	15.04;35.05	31.62** (0.000†) 2 gl
	8	46	63.9	51.94;74.33	
	8.1	9	12.5	6.53;22.61	
	Total	72	100.0		
PH de Antígeno	7.6	11	15.1	8.4;25.5	12.29** (0.0021†) 2 gl
	7.7	35	48.0	36.5;60.6	
	7.8	27	37.0	26.5;48.8	
	Total	73	100.0		
DL50 Vacuna	13	22	30.1	20.54;41.85	9.03** (0.0289†) 3 gl
	16-20	25	34.3	24.09;46.07	
	25-32	18	24.7	15.94;36.07	
	40-50	8	11.0	5.48;20.70	
	Total	73	100.0		
DL50 Antígeno	13	28	38.4	27.73;50.21	13.85** (0.0031†) 3 gl
	16-20	24	32.9	22.90;44.68	
	25-32	9	12.3	6.43;22.32	
	40-50	12	16.4	9.45;27.05	
	Total	73	100.0		

*Prueba Z, **Prueba Chi2. Hipótesis nula: Frecuencia observadas = esperadas

† p<0.05: Diferencia estadísticamente significativa al 95%

Las proporciones de las frecuencias esperadas fueron equitativas ya que no existen antecedentes de su distribución.

gl= grados de libertad. IC 95%: Intervalo de confianza al 95%

Fuente: Elaboración propia.

Los lotes que cumplieron con el porcentaje de sobrevivencia de ratones en las diluciones 1/5 (>60%) y 1/125 (<25%) de la vacuna de referencia y la muestra (vacuna y antígeno) fueron mayores al 93% (**Tabla 02**).

TABLA 2. PORCENTAJE DE SOBREVIVENCIA DE RATONES

	(Sobrevivencia Menor al 25%)	(Sobrevivencia Mayor al 60%)
	N (%)	N (%)
Vacuna Referencia	89 (97.8)	88 (96.7)
Vacuna Prueba	86 (94.5)	87 (95.6)
Vacuna Referencia	85 (93.4)	91 (100.0)
Antígeno Prueba	85 (93.4)	87 (95.6)

N=91.

Fuente. Elaboración propia

El análisis estadístico de las variables cuantitativas (**Tabla 03**), mostró que la media \pm desviación estándar de la potencia de los lotes de vacunas evaluadas fue de 1.7 ± 0.4 UI/dosis con un coeficiente de variación de 24.7%, los valores de las potencias se encontraron entre 1.0 y 2.6 UI/dosis, siendo su rango mínimo aceptable 1.0 UI/dosis, los datos mostraron distribución normal ($p > 0.05$). El 50% de las muestras analizadas tuvieron potencias mayores a 1.6 UI/dosis. La distribución se mostró levemente asimétrica con tendencia positiva y un comportamiento leptocúrtico (Figura N°05).

La media \pm desviación estándar de la potencia del antígeno fue de 1.9 ± 0.5 UI/dosis con un coeficiente de variación de 26.3%; los valores de las potencias de los antígenos se encontraron entre 1.1 y 3.2 UI/dosis, siendo su rango mínimo aceptable 1.0 UI/dosis. El 50% de las muestras analizadas tuvieron potencias mayores a 1.8 UI/dosis. Los datos presentaron distribución no normal ($p < 0.05$), asimetría positiva y un comportamiento leptocúrtico moderado (Figura N°06).

TABLA 3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS VARIABLES CUANTITATIVAS

Variable	Estimadores	Valor	p-valor†
POTENCIA VACUNA	Media	1.7	
	Desviación estándar	0.42	
	Varianza	0.17	
	Mediana	1.6	
	Mínimo	1	>0.05*
	Máximo	2.6	
	Asimetría	0.3677124	
	Curtosis	2.359692	
	CV	24.7	
	IC 95 %	1.6; 1.8	
	POTENCIA ANTIGENO	Media	1.9
Desviación estándar		0.5	
Varianza		0.29	
Mediana		1.8	
Mínimo		1.1	<0.05
Máximo		3.2	
Asimetría		1.097727	
Curtosis		3.887768	
CV		26.3	
IC 95 %		1.7; 2.0	

†Prueba de Shapiro Wilk de normalidad.

*La potencia de la vacuna tiene distribución normal $p>0.05$.

CV: Coeficiente de variación. IC95%: Intervalo de confianza al 95%

N=73.

Fuente: Elaboración Propia

En cuanto al Análisis de varianza de un factor (**Tabla 04**) se estimaron las medias y sus errores estándares e intervalos de confianza de las variables cuantitativas frente a las cualitativas.

TABLA 4. ANÁLISIS DE VARIANZA DE UN FACTOR

Variables	Grupos	N	□ ±SE	IC95%
Potencia vacuna vs pH vacuna (N=72)	7.9	17	1.68 ± 0.102	1.47;1.88
	8	46	1.67 ± 0.062	1.55;1.80
	8.1	9	1.76 ± 0.141	1.47;2.04
Potencia vacuna vs pH Antígeno (N=73)	7.6	11	1.58 ± 0.127	1.33;1.83
	7.7	35	1.71 ± 0.071	1.57;1.86
	7.8	27	1.70 ± 0.081	1.54;1.87
Potencia vacuna vs DL50 Vacuna (N=73)	13	22	1.68 ± 0.090	1.50;1.86
	16-20	25	1.63 ± 0.084	1.46;1.80
	25-32	18	1.82 ± 0.099	1.62;2.01
	40-50	8	1.63 ± 0.148	1.33;1.92
Potencia de Antígeno vs DL50 Antígeno (N=73)	13	28	1.99 ± 0.102	1.78;2.19
	16-20	24	1.77 ± 0.110	1.55;1.99
	25-32	9	1.86 ± 0.180	1.50;2.21
	40-50	12	1.83 ± 0.156	1.52;2.14
Potencia de Antígeno vs pH Antígeno (N=73)	7.6	11	1.36 ± 0.150	1.07;1.66
	7.7	35	1.95 ± 0.088	1.78;2.11
	7.8	27	1.99 ± 0.100	1.80;2.18

□: Media, SE: Error Estándar, IC95%: Intervalo de confianza al 95%

Fuente: Elaboración Propia

Se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los distintos grupos de pH de antígeno con la potencia del mismo F: 6.9; p=0.0018. (Figura N°11), el tamaño del efecto según Omega fue de 14%. Al realizar la prueba de post hoc según Scheffe se evidenció que el grupo de pH 7.6 difiere más en cuanto a la potencia con los grupos 7.7 y 7.8 significativamente. En las demás variables evaluadas no se evidenció diferencia significativa (p>0.05), (Figura N°07-10). Además, se evaluaron los supuestos de homogeneidad de varianza, normalidad de las variables cuantitativas,

independencia de los datos y aleatoriedad, cumpliéndose todas ellas excepto la variable cuantitativa *Potencia de antígeno* que no cumplió normalidad, pero se decidió usar ANOVA de un factor por ser una prueba robusta (**Tabla 05**).

TABLA 5. ANOVA DE UN FACTOR DE VARIABLES CUANTITATIVAS VS CUALITATIVAS

Análisis de Varianza un Factor	Fuente de variación	Suma cuadrados	gl	cuadrados medios	F (p valor)	Bartlett (p valor)[†]
Potencia vacuna vs pH vacuna (N=72)	Entre grupos	0.05169	2	0.0258	0.14 (0.8653)	0.826
	Dentro grupo	12.30151	69	0.1783		
Potencia vacuna vs pH antígeno (N=73)	Entre grupos	0.15444	2	0.0772	0.44 (0.6477)	0.867
	Dentro grupo	12.36885	70	0.1767		
Potencia vacuna vs DL50 Vacuna (N=73)	Entre grupos	0.41025	3	0.1368	0.78 (0.5097)	0.775
	Dentro grupo	12.11304	69	0.1756		
Potencia de Antígeno vs DL50 Antígeno (N=73)	Entre grupos	0.62779	3	0.2093	0.72 (0.5430)	0.07
	Dentro grupo	20.03276	69	0.2903		
Potencia de Antígeno vs pH Antígeno (N=73)	Entre grupos	3.40157	2	1.7008	6.9 (0.0018)*	0.142
	Dentro grupo	17.25898	70	0.2466		

†Prueba Barlett de homogeneidad de varianzas.

Hipótesis nula de la prueba ANOVA: Las medias de los diferentes grupos son iguales.

*p<0.05: Diferencia Estadísticamente significativa al 95%. gl= grados de libertad.

F: Relación de cuadrados medios entre y dentro grupos.

Tamaño del efecto según Omega cuadrado ω^2 : 14%

Fuente: Elaboración Propia

Se ejecutó la regresión lineal mediante el método de Segmentos (Splines) para evaluar si existía relación entre la potencia de la vacuna con la potencia del antígeno. Al analizar los supuestos de normalidad de los residuos estudentizados se evidenció la distribución no normal, debido a algunos valores atípicos presentes. La homocedasticidad e independencia sí estuvieron presente, pero no se cumplió con el supuesto de linealidad ya que se observaron cierto patrón en la distribución de los datos (Figura N ° 12). Se generó y comparó 3 modelos: modelo A (regresión lineal simple), modelos B usando Splines donde los nudos fueron elegidos manualmente, y el modelo C usando Splines y donde los nudos fueron definidos mediante los comandos del paquete estadístico STATA 12 (**Tabla 06**), el criterio de información Akaike Information Criteria **AIC** se utilizó para elegir el mejor modelo que explique la variabilidad de la potencia de la vacuna (Figura N°13), eligiéndose el modelo B.

TABLA 6. ANÁLISIS MEDIANTE REGRESIÓN LINEAL Y MODELO SPLINES

Modelos	Coefficientes (IC95%)	p valor	AIC	P†
Regresión lineal ^A	0.10 (-0.79;0.29)	0.261	81.1697	----
Segmento 2 nudos 1.8-2.4 ^B	0.79 (0.16;1.42)	0.014*	78.75024	0.038**
Segmento 2 nudos 1.7-1.9 ^C	1.62(0.17;3.07)	0.029*	80.61552	0.116

* $p < 0.05$: Diferencia estadísticamente significativa, el segmento es importante en el modelo.
†Test de Wald (linealidad); **Hipótesis nula: $\beta_2 = \beta_3 = \dots = \beta_k = 0$, los coeficientes de los Splines adicionales son similares a 0, existe relación lineal entre potencia de antígeno y potencia de vacuna. Se rechaza hipótesis nula.

A. R^2 ajustado: 0.4%, $F(1,28)$ $p > 0.05$

B. Segmentos generados manualmente con nudos 1.8 y 2.4. R^2 ajustado: 10%, $F(2,57)$, $p > 0.05$. Interpretación del segmento 2 significativo Potencia del antígeno de 1.8-2.4 UI/dosis: Por cada unidad de potencia de antígeno, la media de la potencia de la vacuna aumenta en 0.79 UI/dosis siendo estadísticamente significativo ($p < 0.05$).

C. Segmentos generados por default nudos 1.7 y 1.9. R^2 ajustado: 4%, $F(1,92)$, $p > 0.05$. Interpretación del segmento 2 significativo Potencia del antígeno de 1.7-1.9 UI/dosis: Por cada unidad de potencia de antígeno, la media de la potencia de la vacuna aumenta en 1.62 UI/dosis siendo estadísticamente significativo ($p < 0.05$).

AIC: Akaike Information Criteria, IC 95%: Intervalo de confianza al 95%.

N=73

Fuente: Elaboración Propia

Respecto al análisis de coeficiente de correlación intraclase (CCI) en la evaluación del grado de concordancia entre 3 operadores (**Tabla 07**), los resultados globales del CCI arrojaron un 86% de correlación y éste es estadísticamente significativa $p < 0.000$ (N=10). Seguidamente se realizó el método de Bland y Altman por pares de evaluadores para determinar las diferencias entre las concordancias, el cual mostró que existe mayor diferencia entre las medias del evaluador 1 y 2, siendo 0.10 UI/dosis la diferencia entre ambas (Figura N ° 14), sus límites de concordancia de las diferencias estuvieron entre -1.28:1.48 UI/dosis reflejados en su CCI del 71 %, los evaluadores 2 y 3 mostraron un CCI de 85 % y solo se diferenciaron en un 0.09 UI/dosis, por último los evaluadores 1 y 3 obtuvieron un CCI de 83 % con una diferencia de medias de tan solo un 0.01 UI/dosis.

TABLA 7. ANÁLISIS DE COEFICIENTE DE CORRELACIÓN INTRACLASE

Evaluadores	CCI	IC95%	p valor	Media de las diferencias (Límites de concordancia de las diferencias**)
1-2	0.71	-0.25;0.93	0.047*	0.10 (-1.28;1.48)
2-3	0.85	0.41; 0.96	0.005*	0.09 (-0.82;1.00)
1-3	0.83	0.25;0.96	0.011*	0.01 (-1.29;1.31)
1-2-3	0.86	0.60;0.96	0.000*	

*p<0.05: Diferencia estadísticamente significativa al 95%. ** Método según Bland y Altman. CCI: Coeficiente de correlación intraclass. IC 95%: Intervalo de confianza al 95%. Fuente: Elaboración propia. N=10

Fuente: Elaboración Propia

Se realizó el análisis de las variables potencia y pH de vacuna según los meses de evaluación, en el cual se observó una tendencia a disminuir de la potencia y de aumentar en el pH a través del tiempo (**Tabla 08**).

TABLA 8. ANÁLISIS DE LAS VARIABLES POTENCIA Y PH POR MES DE EVALUACIÓN

Variables	Mes de evaluación	X±SE	IC95%
Potencia de Vacuna N=115	0°	1.8±0.98	1.6; 1.9
	3°	1.8±0.17	1.5; 2.1
	6°	1.9±0.13	1.7; 2.2
	9°	1.6±0.13	1.4; 1.9
	12°	1.4±0.11	1.2; 1.6
	15°	1.6±0.10	1.4; 1.8
	18°	1.4±0.15	1.2; 1.7
pH de Vacuna N=114	0°	8.01±0.013	7.98; 8.04
	3°	8.11±0.002	8.07; 8.16
	6°	8.16±0.017	8.13; 8.20
	9°	8.20±0.018	8.16; 8.23
	12°	8.20±0.015	8.17; 8.23
	15°	8.23±0.014	8.21; 8.26
	18°	8.26±0.020	8.22; 8.30

X: Media, SE: Error Estándar, IC95%: Intervalo de confianza al 95%.

Fuente: Elaboración Propia

Se llevó a cabo el análisis de varianza de medidas repetidas (**Tabla 09**), previamente se evaluaron los supuestos de Normalidad para la variable dependiente en cada nivel del factor intrasujeto mediante la prueba Shapiro Wilk, la potencia de vacuna no presentó normalidad ($p < 0.05$), a comparación de la variable pH de vacuna que si presentó normalidad ($p > 0.05$), se evaluó el supuesto de homogeneidad o esfericidad de las varianzas (varianzas de las diferencias entre cada 2 niveles del factor Mes son iguales) mediante la prueba de Levene en vez de la prueba de Mauchly ($p > 0.05$), cumpliendo el supuesto ambas variables. Los resultados del análisis de la varianza arrojaron que la media de los pHs de las vacunas es diferente en los distintos meses de evaluación (F: 29.34; p: 0.000), también se observó la tendencia de aumento del pH según transcurre los meses de evaluación (Figura N ° 16) y es estadísticamente significativa, posteriormente se efectuó la prueba de post hoc de Bonferroni para comparar los meses, lo cual se confirmó que existe diferencia estadísticamente significativa entre los meses ($p < 0.05$). El tamaño del efecto de la prueba según Eta fue de 69% (moderado). Por otro lado la variable potencia se observó una tendencia de disminución de la potencia al transcurrir los meses de evaluación pero ésta es estadísticamente no significativa, la potencia se mantuvo dentro de su rango establecido > 1.00 UI/dosis (Figura N ° 15)

TABLA 9. ANÁLISIS DE VARIANZA DE MEDIDAS REPETIDAS

Variable	Fuente de variación	Suma cuadrados	gl	cuadrados medios	F† (p valor)
Potencia vacuna (N=115)	Intra grupos (Vacunas)	8.6593	26	0.3333	2.18 (0.0529)
	Entre grupo (Mes)	2.7664	6	0.461	
	Error	17.3258	82	0.2112	
pH vacuna (N=114)	Intra grupos (Vacunas)	0.3176	26	0.0122	29.34 (0.000)*
	Entre grupo (Mes)	0.7007	6	0.1168	
	Error	0.3224	81	0.0039	

† ANOVA de medidas repetidas. Hipótesis nula: Las medias en los diferentes momentos son iguales. Tamaño del efecto según Eta cuadrado parcial n^2p : 69%

* $p < 0.05$: Diferencia Estadísticamente significativa al 95%. gl= grados de libertad.

F: Relación de cuadrados medios ente y dentro grupos.

Fuente: Elaboración Propia

VI. DISCUSION

De 91 lotes, el 14% tuvieron resultados de potencia de vacunas y de antígenos inválidos porque no cumplieron el test de validez respectivo, en comparación con el 42% mencionado por Stokes (7). La causa de los ensayos inválidos fue mayormente por no cumplir el test de validez de los ensayos biológicos: límites superior e inferior de la potencia estimada, linealidad y paralelismo.

Además se tuvo que eliminar 5 datos atípicos de pH del antígeno 7.5 y 7.9, porque éstos aunque se hallaban dentro de la especificación del pH, solo estuvieron presentes en una baja proporción (2 datos de 7.5 y 3 datos con 7.9), considerando que la información es secundaria y que las demás frecuencias de los pH son 11, 35 y 27. En el anexo 4 se muestra el

procesamiento de los 78 datos considerando los valores atípicos demostrando que no hubo variaciones significativas en los resultados con 73 datos.

Las medias de las potencias de las vacunas y antígenos no superan el 30% de la variabilidad, siendo considerados como datos homogéneos (7).

Aunque se encontró diferencia estadísticamente entre los grupos de pH del antígeno con la potencia en el análisis de varianza de un factor, el tamaño del efecto de la prueba solo representó un 14% de la variabilidad del antígeno.

Si bien se observó en la tabla 06 que el modelo B fue mejor que los modelos A y C según test AIC (siendo el Splines 2 significativo), el modelo total de la regresión fue estadísticamente no significativo $p > 0.05$, por lo que la potencia de antígeno no explicó la variabilidad de la potencia de la vacuna, similares resultados sucedieron con los modelos A y C.

Al analizar el grado de correlación mediante el CCI entre 3 evaluadores se obtuvo un coeficiente bueno de 86 % en una muestra de 10, esto se debe manejar con mucho cuidado y saber diferenciar si lo hallado se debe a la poca muestra y a la variabilidad de los datos, que hace elevar el coeficiente de correlación, como menciona Stokes y Bruckner la variabilidad en este tipo de ensayo es muy alto (7) (47).

El pH de la vacuna aumentó al transcurrir los meses de evaluación, el mes 9 fue el mes crítico ya que es ahí donde superó el pH establecido de 8.2, con tendencia ascendente, a pesar que el p valor fue menor a 0.05, los intervalos

de confianza se entrecruzaron por lo que no se podría establecer una diferencia marcada entre las medias de los pHs en los diferentes meses de evaluación. En el caso de la potencia de los mismos lotes evaluados en los diferentes meses, se observó una tendencia a disminuir pero que ésta diferencia no fue significativa, coincidiendo con los resultados de José E. Weimersheimer (45) y el de Ana María Díaz que realizaron la estabilidad por 15 meses de vacuna antirrábica en Cerebro de ratón lactante (48).

VII. CONCLUSIONES

- No se identificó a ninguna variable en estudio que esté relacionada significativamente a la potencia de la vacuna, pero si se observó que la potencia del antígeno difiere según el pH del antígeno siendo esta diferencia estadísticamente significativa, aunque el tamaño del efecto solo fue de un 14%.
- Se determinó el grado de correlación entre los operadores que evalúan la potencia de las vacunas, siendo ésta buena 86% (71%-90%), y con poca diferencia de medias entre ellas.
- Se describió el comportamiento del pH y la potencia de la vacuna en diferentes momentos de evaluación, observándose que el pH aumenta y la potencia disminuya a medida que transcurre el tiempo, pero estos cambios no fueron significativos.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Abhinay G, Dessain S, Srikanth A, Senthilkumar R, Vidyasagar P, Praveen A, et al. A novel site-II directed glycoprotein estimation ELISA to aid rabies vaccine manufacture for veterinary and human use. *Vaccine*. 2014;32(2):209–13.
2. Organizacion Mundial de la Salud. Comit e de expertos de la OMS en patrones Biologicos-Informe 31. 1981. p. 29.
3. Organizacion Mundial de la Salud. Tecnicas de laboratorio aplicadas a la rabia-Publicaciones Cientificas n  23. Washington 6 D.C.; 1956.
4. Gibert R, Alberti M, Poirier B, Jallet C, Tordo N, Morgeaux S. A relevant in vitro ELISA test in alternative to the in vivo NIH test for human rabies vaccine batch release. *Vaccine* [Internet]. 2013;31(50):6022–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.10.019>
5. Romberg J, Lang S, Balks E, Kamphuis E, Duchow K, Loos D, et al. Potency testing of veterinary vaccines: The way from in vivo to in vitro. *Biologicals*. 2012;40(1):100–6.
6. Xiang ZQ, Hildegund E. Vaccines. Rabies Sci Basic Dis its Manag [Internet]. Third Edit. 2013;527–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-396547-9.00014-6>
7. Stokes W, Mcfarland R, Kulpa-eddy J, Gatewood D, Levis R, Halder M, et al. Biologicals Report on the international workshop on alternative methods for human and veterinary rabies vaccine testing : State of the science and planning the way forward q. *Biologicals* [Internet]. 2012;40(5):369–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2012.07.005>
8. Vigilato M, Cosivi O, Knobl T, Clavijo A, Silva H. Rabies update for Latin America and the Caribbean. *Emerg Infect Dis*. 2013;19(4):678–9.
9. Jimenez R. Conociendo a la Vacuna Antirrabica de uso veterinario [Internet]. 2017. Available from: <http://insteractua.ins.gob.pe/2017/11/conociendo-la-vacuna-antirrabica-de-uso.html>
10. Barcena G. Expresion de la Glicoproteina del virus rabico en *Lactococcus lactis*. 2012.
11. Sigoillot-claude C, Battaglio M, Fiorucci M, Gillet D, Vimort A, Giraud Y, et al. A versatile in vitro ELISA test for quantification and quality testing of infectious , inactivated and formulated rabies virus used in veterinary

- monovalent or combination vaccine. *Vaccine* [Internet]. 2015;33(32):3843–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.06.091>
12. Krämer B, Kamphuis E, Hanschmann KM, Milne C, Daas A, Duchow K. A multi-dose serological assay suitable to quantify the potency of inactivated rabies vaccines for veterinary use. *Biologicals* [Internet]. 2013;41(6):400–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2013.08.003>
 13. Thraenhart O, Blancou J, Aubert M. Results of an inquiry on potency testing of rabies vaccine by the NIH test: suggestions for further improvement. *Sci Tech Rev Off Int des Epizoot.* 1989;8(4):917–9.
 14. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. EUROPEAN FARMACOPOEIA 8.0-Volume 1. France: Council of Europe; 2013. p. 617, 1010.
 15. Miceli G, Torroba J, Diaz A. Evaluación de la técnica de contraelectroforesis para determinar la potencia antigénica de las vacunas antirrábicas. *Rev Ins Med Trop.* 1993;35(6):543–50.
 16. Cortés E, Rubio J, Gaitán H. Métodos estadísticos de evaluación de la concordancia y la reproductibilidad de pruebas diagnósticas. *Rev Colomb Obstet Ginecol.* 2010;61(3):247–55.
 17. Esquivel C, Velasco, Rubin- de Celis E, Rodríguez E, González G, Castillo C. Coeficiente de correlación intraclass vs correlación de Pearson de la glucemia capilar por reflectometría y glucemia plasmática. *Med Interna Mex.* 2006;22(3):165–71.
 18. Mandeville P. Tema 9: El Coeficiente de Correlación Intraclass. *Cienc UANL.* 2005;VIII:414–6.
 19. EPIDAT 4. CONCORDANCIA Y CONSISTENCIA. 2014. p. 17.
 20. Fernández P, Díaz P. La fiabilidad de las mediciones clínicas: El análisis de concordancia para variables numéricas. 2004. p. 1–11.
 21. Bland M, Altman D. Comparing methods of measurement: why plotting difference against standard methods is misleading. *Lancet.* 1995;346:1085–7.
 22. Llobell J, Jose G, Garcia F. Diseño de medidas repetidas. *Man Psicol Exp Metodol Investig* [Internet]. 1996;133–62. Available from: <http://www.uv.es/~friasnav/MedidasRepetidasMixto.pdf>
 23. Departamento de Sociología de la Universidad Complutense de Madrid. Cap. 16: Análisis de varianza con medidas repetidas: El procedimiento MLG: Medidas repetidas. In: *Guía para el análisis de datos.* 2013.
 24. Girden E. ANOVA repeated measures [Internet]. London: The International

- Professional Publishers; 1992. 14 p. Available from: <https://us.sagepub.com/en-us/sam/anova/book3652#contents>
25. Wayne D. Analisis of Variance. In: JACOBS J, editor. Bioestadistics. 9th ed. USA: Rosatone, Laurie; 2009. p. 346–52; 306–34, 410–50.
 26. Olejnik S, Algina J. Generalized eta and omega squared statistics: measures of effect size for some common research designs. *Psychol Methods*. 2003;8(4):434–47.
 27. Lakens D. Calculating and reporting effect sizes to facilitate cumulative science: A practical primer for t-tests and ANOVAs. *Front Psychol*. 2013;4(NOV):1–12.
 28. Pardo ARA. Análisis no paramétrico: El procedimiento Pruebas no paramétricas [Internet]. 2010. 581–646 p. Available from: <zotero://attachment/213/>
 29. Pagano R. Overview of One-Way ANOVA. In: Understanding Statistics in the Behavioral Sciences. Jon-David Hague; 2013. p. 418–25.
 30. Bejarano, Leopoldo; Mormontoy, Wilfredo, Tipacti C. Muestreo e Inferencia Estadística. 1st ed. Tipacti C, editor. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2006. 95–113, 223–234 p.
 31. Khan A, Rayner G. Robustness to non-normality of common tests for the many-sample location problem. *J Appl Math Decis Sci*. 2003;7(4):187–206.
 32. Kirkwood, Betty; Sterne J. Multiple Regresion. In: Goodgsme F, editor. *Medical Stadistical*. Second edi. London: Blackwell; 2006. p. 98–106.
 33. Carnero AM. Modelando relaciones no- lineales : Splines Supuesto de linealidad Supuesto de linealidad. 2015.
 34. Wold S. Spline Fucntions in Data Analysis. Vol. Vol. 16, *Technometrics*. 1974. p. 1–11.
 35. Wayne D. Bioestadistics. 9th Editio. Jacobs J, editor. USA: Rosatone, Laurie; 2009. 410–450 p.
 36. Dupont WD, Plummer WD. $I = 1, " , N \}$. :1–18.
 37. Taylan P, Weber GW, Liu L. On foundations of parameter estimation for generalized partial linear models with B-splines and continuous optimization. *AIP Conf Proc* [Internet]. 2010;1239(1):297–304. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.camwa.2010.04.040>
 38. Bellman R, Kashef B, Lee E, Vasudevan R. Differential quadrature and splines. *Comp Math with Appl*, [Internet]. 1975;1(3–4):371–6. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0898-1221\(75\)90038-3](http://dx.doi.org/10.1016/0898-1221(75)90038-3)

39. Hill C, Manuscript A. NIH Public Access. *Changes*. 2012;22(6):874–5.
40. Petrov N, Csake F, Hirotsugu. Akaike Information Criterion. *Budapest Akad Kiado IEEE Trans Autom Control AC*. 1973;19(1979):267–81.
41. Decs. *Descriptores en Ciencias de la Salud*.
42. Hernández S. El modelo animal en las investigaciones biomédicas. *Biomedicina*. 2006;2(3):252–6.
43. Kamphuis E, Meyer H, Göpfert C, Schildger H, Hanschmann K, Krämer B, et al. Rabies Vaccines for Human Use : Potency Testing Without Mouse Challenge ? :215–9.
44. Miceli G, Nosetto E, Madero JE, Diaz A. Determinacion de la concentracion de antígeno en vacunas antirrabicas de uso veterinario por una prueba inmunoenzimatica. *ANALECTA Vet*. 2002;296(22):38–41.
45. Weimersheimer, Jose; Rubio E. Alternativa para inactivar vacunas antirrabicas usnado radiacion gamma (Co-60). 1999;30(4):313–6.
46. Diaz A, Perdomo G, Becco O. Estabilidad de la vacuna antirrabica en cerebro de raton lactante almacenada a distintas temperaturas. *Bol Saint Panam*. 1988;104(3):261–70.
47. Bruckner L, Cussler K, Halder M, Barrat J, Castle P, Duchow K, et al. Three Rs Approaches in the Quality Control of Inactivated Rabies Vaccines: The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 48. *ATLA Altern to Lab Anim*. 2003;31(4):429–54.
48. Diaz, Ana; Perdomo, Graciela; Becco O. Estabilidad de la vacuna antirrabica en cerebro de raton lactante almacenada a distintas temperaturas. *J Chem Inf Model*. 2013;

ANEXOS

ANEXO 01 INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

"FACTORES RELACIONADOS EN LA DETERMINACION DE LA POTENCIA (DOSIS EFECTIVA 50) DE LAS VACUNAS ANTIRRABICAS EN CULTIVO CELULAR DE USO VETERINARIO PRODUCIDAS EN EL INSTITUTO NACIONAL DE SALUD EN LOS AÑOS 2011-2015."

Nº DE FORMULARIO

FECHA

I DATOS DE LA PRUEBA POTENCIA NIH DE LA VACUNA

Nº DE LOTE		FECHA DEL ENSAYO		cepa CVS				
FECHA DE EXPIRA		POTENCIA ELEGIDA		Titulo				
VARIABLES		Evaluador 1		Evaluador 2.....		Evaluador 3.....		
Especificacion		Resultado	cumple	Resultado	cumple	Resultado	cumple	
POTENCIA	POTENCIA	(No menos de 1,0 UI/dosis)						
	DL50	(12-50 DL50/0.03mL)						
	LIMITE SUPERIOR	(No mayor al 400%)						
	LIMITE INFERIOR	(No menor del 25%)						
	Desviacion de Linealidad	(No significativo)						
	Desvio de Paralelismo	(No significativo)						
	REGRESION	(Significativo)						
	SUPERVIVENCIA DE RATONES	Diluciones	VRN	Muestra	VRN	Muestra	VRN	Muestra
		1/5						
		1/25						
1/125								
VARIABLE	Especificacion	Resultado	cumple					
PH	(7.8-8-2)							

II DATOS DE LA PRUEBA POTENCIA NIH DEL ANTIGENO

Nº DE LOTE		FECHA DEL ENSAYO		cepa CVS				
FECHA DE EXPIRA		POTENCIA ELEGIDA		Titulo				
VARIABLES		Evaluador 1.....		Evaluador 2.....		Evaluador 3.....		
Especificacion		Resultado	cumple	Resultado	cumple	Resultado	cumple	
POTENCIA	POTENCIA	(No menos de 1,0 UI/dosis)						
	DL50	(12-50 DL50/0.03mL)						
	LIMITE SUPERIOR	(No mayor al 400%)						
	LIMITE INFERIOR	(No menor del 25%)						
	Desviacion de Linealidad	(No significativo)						
	Desvio de Paralelismo	(No significativo)						
	REGRESION	(Significativo)						
	SUPERVIVENCIA DE RATONES	Diluciones	VRN	Muestra	VRN	Muestra	VRN	Muestra
		1/5						
		1/25						
1/125								
VARIABLE	Especificacion	Resultado	cumple					
PH	(7.8-8-2)							

NOMBRE Y FIRMA

**“FACTORES RELACIONADOS EN LA DETERMINACION DE LA POTENCIA (DOSIS EFECTIVA 50) DE LAS VACUNAS ANTIRRABICAS EN CULTIVO CELULAR DE USO VETERINARIO
 PRODUCIDAS EN EL INSTITUTO NACIONAL DE SALUD EN LOS AÑOS 2011-2015.”**

III SEGUIMIENTO DE LA POTENCIA Y PH DE LA VACUNA

LOTE		Mes evaluacion	0		3		6		9		12		15		18		
		Fecha del ensayo															
		Analista															
VARIABLES		Especificaciones	Resultado	Cumple	Resultado	Cumple	Resultado	Cumple	Resultado	Cumple	Resultado	Cumple	Resultado	Cumple	Resultado	Cumple	
pH		(7.8-8.2)															
POTENCIA	POTENCIA	(No menos de 1,0 UI/dosis)															
	DL50	(12-50 DL50/0.03mL)															
	LIMITE SUPERIOR	(No mayor al 400%)															
	LIMITE INFERIOR	(No menor del 25%)															
	Desviacion de Linealidad	(No significativo)															
	Desvio de Paralelismo	(No significativo)															
	REGRESION	(Significativo)															
	SUPERVIVENCIA DE RATONES	Diluciones	VRN MUESTRA														
		1/5															
		1/25															
1/125																	

 NOMBRE Y FIRMA

ANEXO 02 DEFINICIÓN OPERACIONAL DE LAS VARIABLES

Variable	Tipo de Variable	Clasificación	Escala	Valores	Definición Conceptual
Potencia de vacuna antirrábica	Cuantitativa	Continua	Intervalo	UI/dosis	Resultado de la Potencia NIH en Unidades internacional por dosis.
Potencia de antígeno	Cuantitativa	Continua	Intervalo	UI/dosis	Resultado de la Potencia NIH en Unidades internacional por dosis.
pH de antígeno*	Cuantitativa	Continua	Razón	pH	Valores de pH medidos con un pHmetro.
pH de vacuna*	Cuantitativa	Continua	Razón	pH	Valores de pH medidos con un pHmetro.
Dosis letal media (DL50)*	Cuantitativa	Discreta	Razón	DL50/0,03mL	Valores de DL50 obtenido en el ensayo de potencia de la vacuna
Dosis letal media (DL50)*	Cuantitativa	Discreta	Razón	DL50/0,03mL	Valores de DL50 obtenido en el ensayo de potencia del antígeno
Evaluadores de la potencia	Cualitativa	Politómica	Nominal	N ° de identificación del evaluador	Número asignado al evaluador para su identificación.
Mes de seguimiento de la vacuna	Cualitativa	Politómica	Ordinal	0, 3, 6, 9, 12, 15 y 18	Momentos de evaluación de la vacuna desde el tiempo 0 al 18.

*Para evaluar el objetivo 1 y realizar el análisis de varianza de un factor, la variable pH y DL50 se consideraron como variables cualitativas al ser agrupadas en categorías.

ANEXO 03 CARTA DE AUTORIZACION

MINISTERIO DE SALUD INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

"Decenio de las Personas con Discapacidad en el Perú"
"Año de la Consolidación del Mar de Grau"

MEMORANDO N°207-DG-2016-CNPB/INS

Para : **Biga. Roxana Jiménez De La Cruz**
Analista del Laboratorio de Control de Calidad
Dirección Ejecutiva de Calidad
Centro Nacional de Productos Biológicos

Asunto : Solicitud de autorización para uso de data en desarrollo de tesis:
"Factores relacionados en la Determinación de la Potencia (dosis efectiva 50) de las Vacunas Antirrábicas en Cultivo Celular de Uso Veterinario Producidas en el Instituto Nacional de Salud en los años 2011-2015"

Ref. : Nota informativa N°13-2016-RJDLAC-LCC-DEC-CNPB/INS
Reg. 12811-16

Fecha : 15 de junio de 2016

Por el presente le saludo cordialmente y asimismo en atención a vuestro documento de la referencia por el cual manifiesta que está llevando una segunda especialización y para el desarrollo de vuestra tesis solicita autorización para usar la data referente a la producción y análisis de lotes de la Vacuna Antirrábica en Cultivo Celular de Uso Veterinario correspondiente al período 2011 – 2015.

Siendo la opinión de la Dirección Ejecutiva de Calidad que dicha investigación resultaría beneficioso en cuanto a la mejora de los procesos de análisis que se realizan en el Laboratorio de Control de Calidad por lo que se considera factible su utilización debiendo tener en cuenta los siguientes puntos:

- ✓ La información es propiedad del INS por lo que no podrá ser publicada
- ✓ Los datos revisados deben ser usados solo para fines de la investigación propuesta
- ✓ La interpretación de la data debe ser adecuadamente asesorada, por lo que se sugiere que la coordinadora del laboratorio de control de calidad sea su tutora
- ✓ El tiempo invertido en la revisión solicitada no debe afectar en forma crítica las labores de la analista, los documentos en custodia del área de Garantía de la Calidad no deben salir de la institución.

Sin otro particular, me despido de usted.

Atentamente,



c.c. DG OGITT

NRO/ga

ANEXO 04 RESULTADOS CON 78 DATOS

Resultados con 78 datos considerando 5 datos de pH atipicos:

1. pH de antígeno:

```
. csgof pHAG , expperc(20 20 20 20 20)
```

pHAG	expperc	expfreq	obsfreq
7.5	20	15.6	2
7.6	20	15.6	11
7.7	20	15.6	35
7.8	20	15.6	27
7.9	20	15.6	3

```
chisq(4) is 55.85, p = 0
```

2. pH de vacuna:

```
. csgof PHVACUNA , expperc(25 25 25 25)
```

PHVACUNA	expperc	expfreq	obsfreq
7.8	25	19.5	1
7.9	25	19.5	17
8.0	25	19.5	49
8.1	25	19.5	11

```
chisq(3) is 66.21, p = 0
```

3. DL50 de vacuna agrupada:

```
. csgof DL50VACgrupo , expperc(25 25 25 25)
```

DL50VA~o	expperc	expfreq	obsfreq
13	25	19.5	23
16 A 20	25	19.5	26
25 A 32	25	19.5	21
40 A 50	25	19.5	8

```
chisq(3) is 9.69, p = .0214
```

4. DL50 de antígeno agrupado:

```
. csgof DL50AGgrupo , expperc(25 25 25 25)
```

DL50AG~o	expperc	expfreq	obsfreq
13	25	19.5	30
16-20	25	19.5	24
25-32	25	19.5	12
40-50	25	19.5	12

```
chisq(3) is 12.46, p = .006
```

Los 4 resultados se mantienen, encontrándose diferencia significativa entre las frecuencias esperadas y las observadas $p < 0.05$.

5. Variables cuantitativas potencia de vacuna y potencia de antígeno:

```
. sum POTENCIAVACC
```

Variable	Obs	Mean	Std. Dev.	Min	Max
POTENCIAVACC	78	1.696154	.4078586	1	2.6

```
. swilk POTENCIAVACC
```

Shapiro-Wilk W test for normal data

Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
POTENCIAVACC	78	0.98265	1.167	0.337	0.36796

```
. swilk PotenciaAG
```

Shapiro-Wilk W test for normal data

Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
PotenciaAG	78	0.82707	11.626	5.368	0.00000

```
. sum PotenciaAG
```

Variable	Obs	Mean	Std. Dev.	Min	Max
PotenciaAG	78	1.979487	.7342031	1.1	4.7

Se mantiene la normalidad en la potencia de la vacuna, se mantiene la no normalidad en la potencia del antígeno, así como los valores de la media.

6. Anova de potencia de vacuna con pH de vacuna:

```
. oneway POTENCIAVACC PHVACUNA
```

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	.183786616	3	.061262205	0.36	0.7827
Within groups	12.6250584	74	.170608897		
Total	12.808845	77	.166348636		

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(2) = 0.8448$ Prob> $\chi^2 = 0.655$

7. Anova de potencia de vacuna con pH de antígeno:

```
. oneway POTENCIAVACC pHAG
```

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	.299995735	4	.074998934	0.44	0.7810
Within groups	12.5088493	73	.1713541		
Total	12.808845	77	.166348636		

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(3) = 0.8643$ Prob> $\chi^2 = 0.834$

8. Anova de potencia de vacuna con DL50 de vacuna:

```
. oneway POTENCIAVACC DL50VACgrupo
```

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	.264871006	3	.088290335	0.52	0.6693
Within groups	12.543974	74	.169513162		
Total	12.808845	77	.166348636		

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(3) = 0.8989$ Prob> $\chi^2 = 0.826$

9. Anova de potencia de antígeno con pH de antígeno:

```
. oneway PotenciaAG pHAG
```

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	16.0815331	4	4.02038328	11.54	0.0000
Within groups	25.4256445	73	.3482965		
Total	41.5071776	77	.539054255		

```
Bartlett's test for equal variances: chi2(3) = 22.6132 Prob>chi2 = 0.000
```

En el análisis de ANOVA también se encontró diferencia estadísticamente no significativa entre los grupos comparados, solo entre el pH del antígeno con la potencia del mismo, mismo resultado se repite con 73 datos.

ANEXO 05 GRAFICOS

Fig. N°01.- Grafico de sectores de la distribución del PH de vacuna.

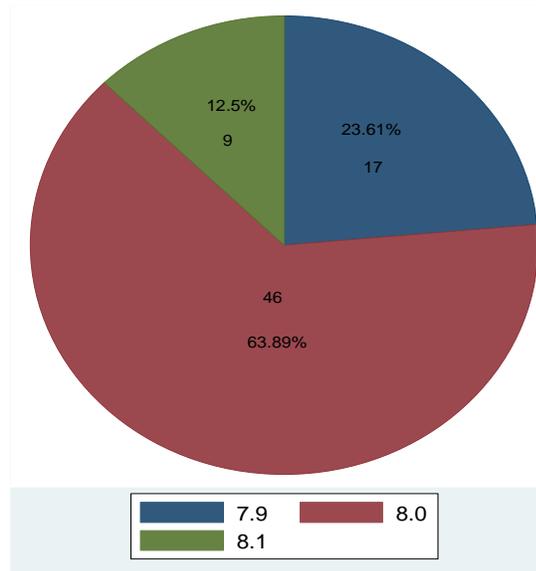


Fig. N°02.- Grafico de sectores de la distribución del PH de Antígeno.

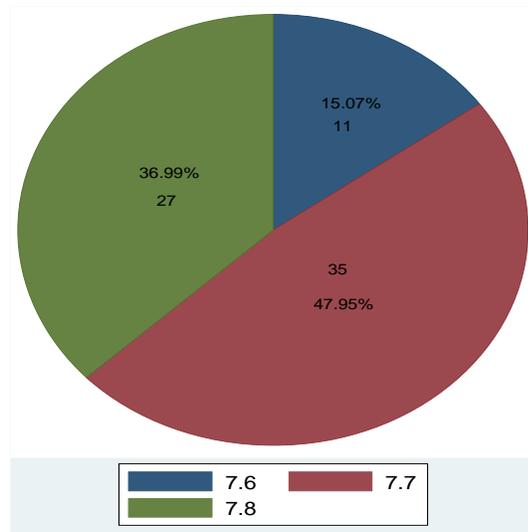


Fig. N°03.- Grafico de sectores de la distribución del DL50 de la vacuna

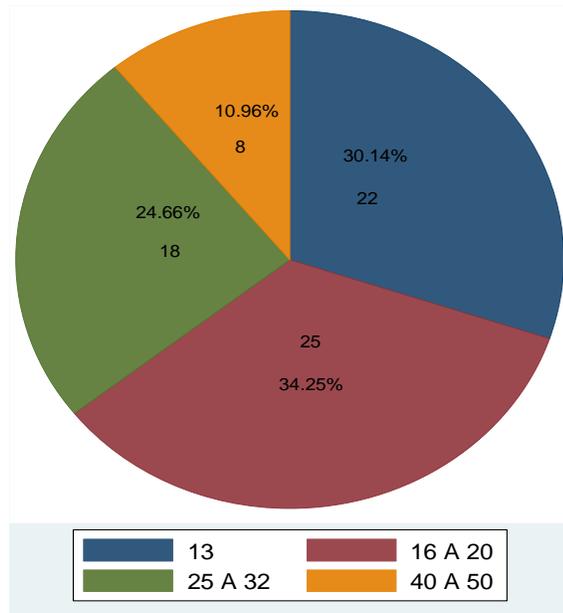


Fig. N°04.- Grafico de sectores de la distribución del DL50 del antígeno

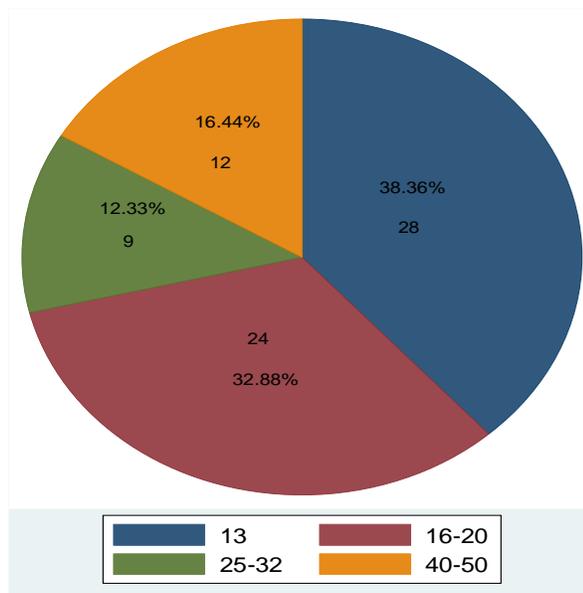


Fig N°05.- Grafico de histograma de la distribución de la Potencia de la vacuna

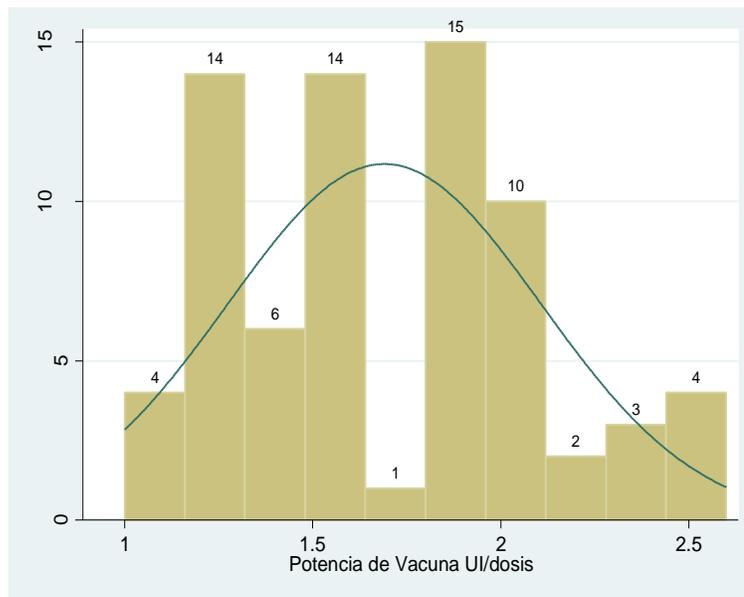


Fig. N°06.- Grafico de histograma de la distribución de la Potencia del Antígeno.

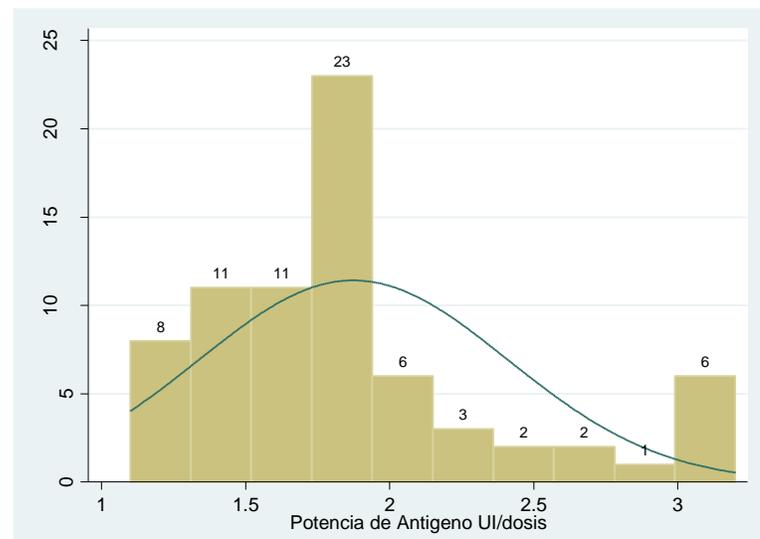


Fig. N°07.- Grafico de estimaciones de las medias de las potencias de vacunas según pH de vacuna

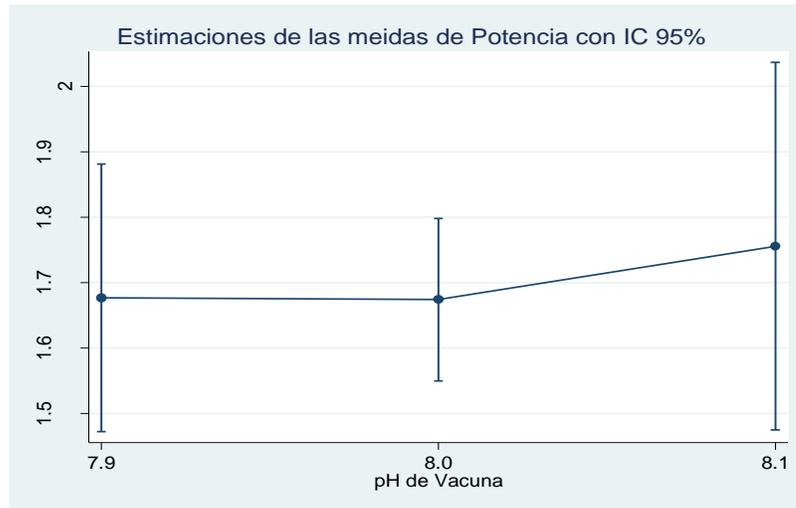


Fig. N°08.- Grafico de estimaciones de las medias de las potencias de vacunas según pH de Antígeno.

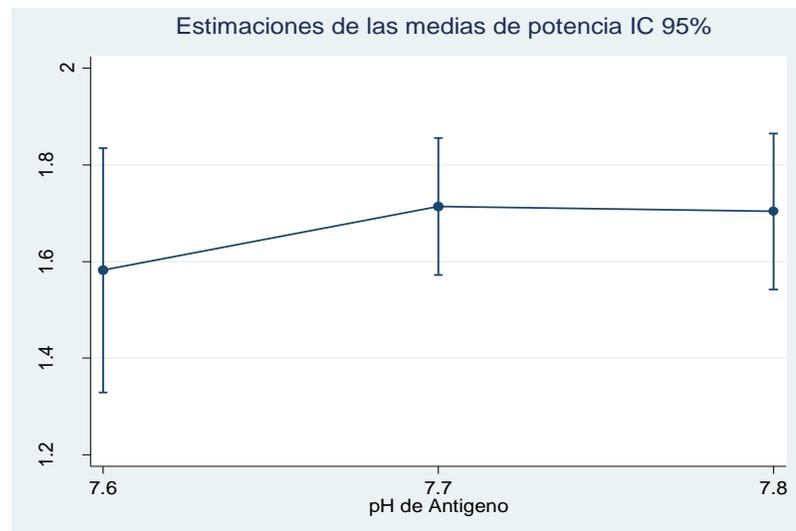


Fig. N°09.- Grafico de estimaciones de las medias de las potencias de vacunas según DL50.

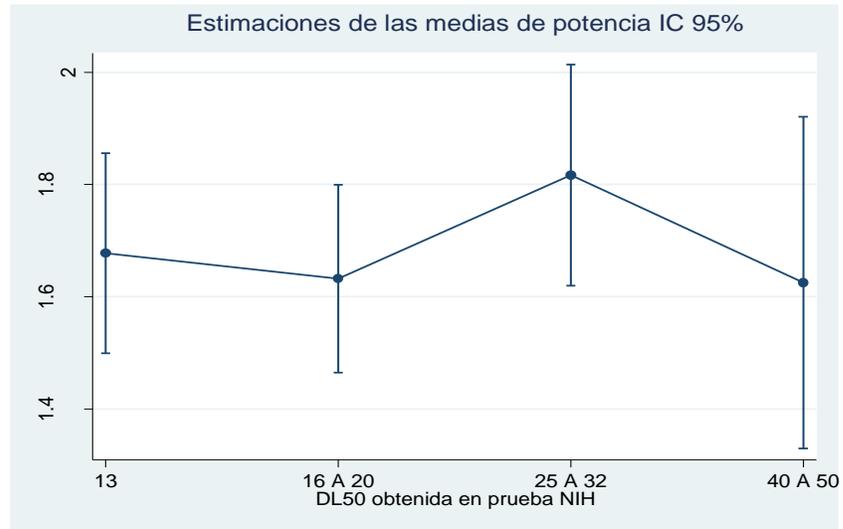


Fig. N°10.- Grafico de estimaciones de las medias de las potencias de vacunas según DL50

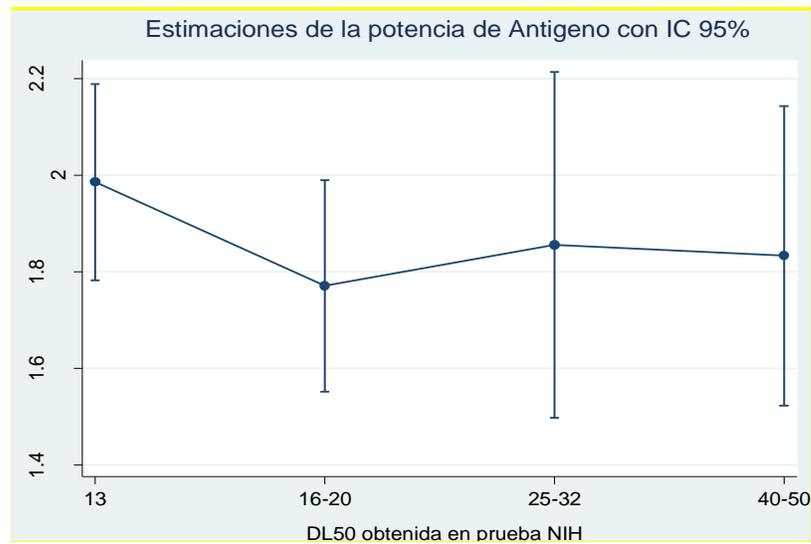


Fig. N°11.- Grafico de estimaciones de las medias de las potencias de antígenos según pH de Antígeno.

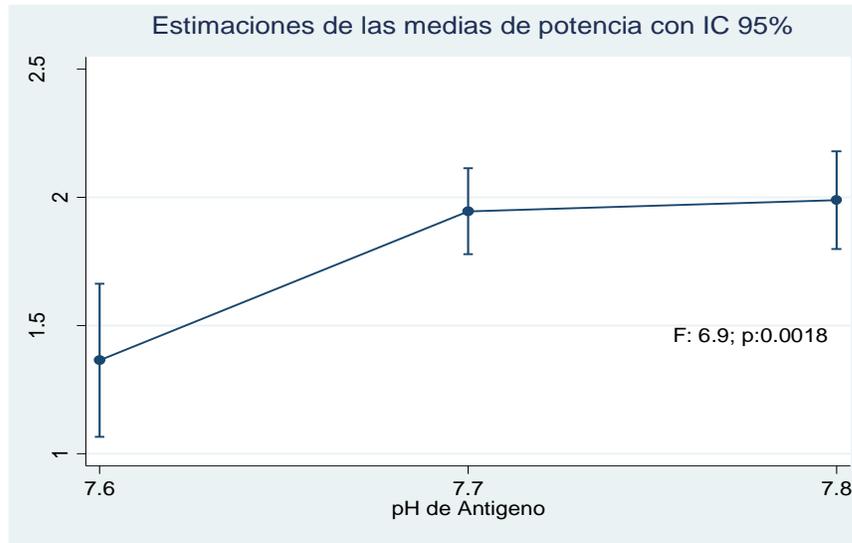


Fig. N°12- Grafico de linealidad de la variable potencia de vacuna y potencia de antígeno

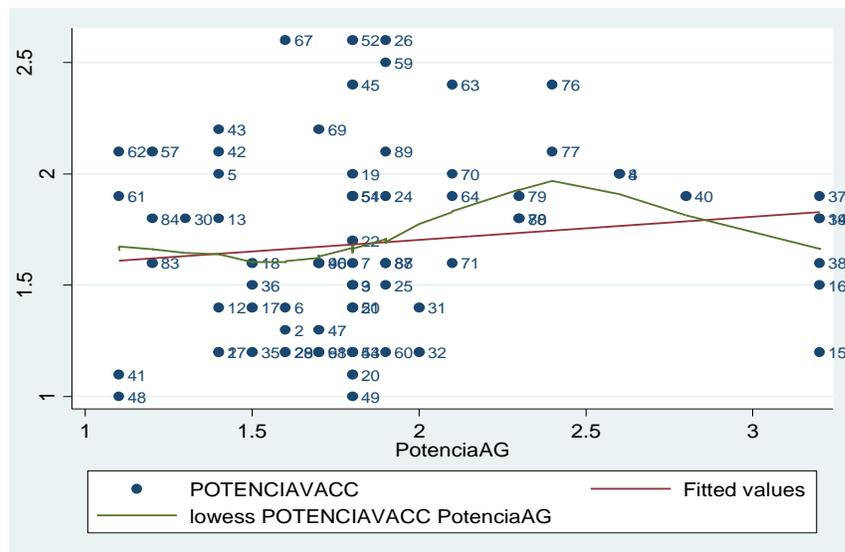


Fig. N°13- Grafico de comparación de los 3 modelos de regresión generados de la potencia de vacuna y potencia de antígeno. A: Modelo de regresión lineal, B: Modelo de splines con 2 nudos generados manualmente. C: modelo de splines con 2 nudos generados por defecto.

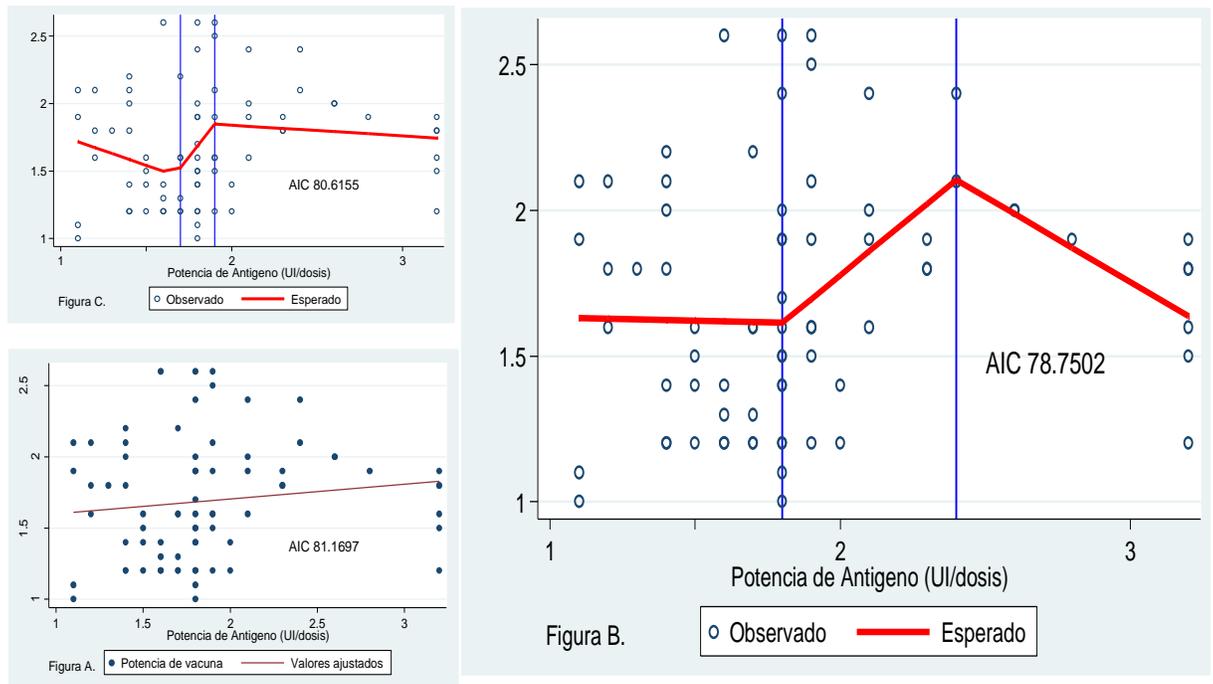


Fig. N ° 14.- Análisis de concordancia por el método de Bland y Altman entre las medias de potencias del evaluador 1 y 2 a 2 desviaciones estándar. N=10

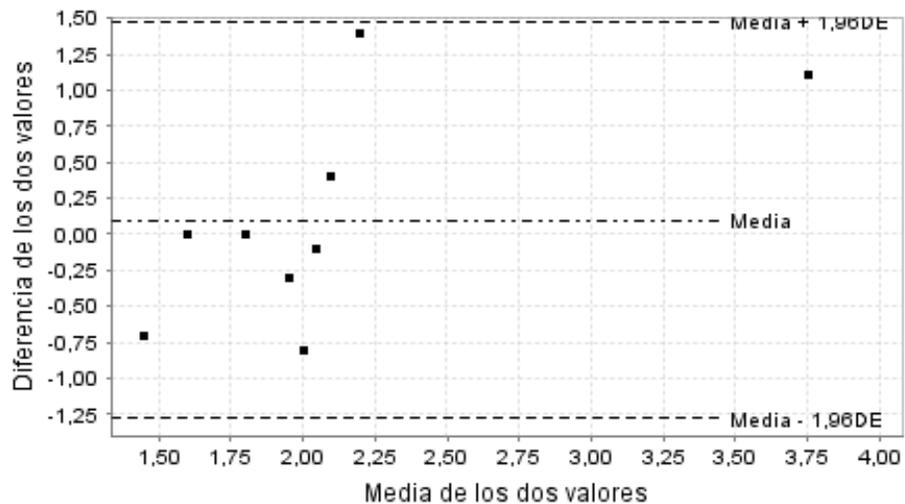


Fig. N ° 15.- Grafico de estimaciones de las medias de las potencias de vacunas por mes de evaluación

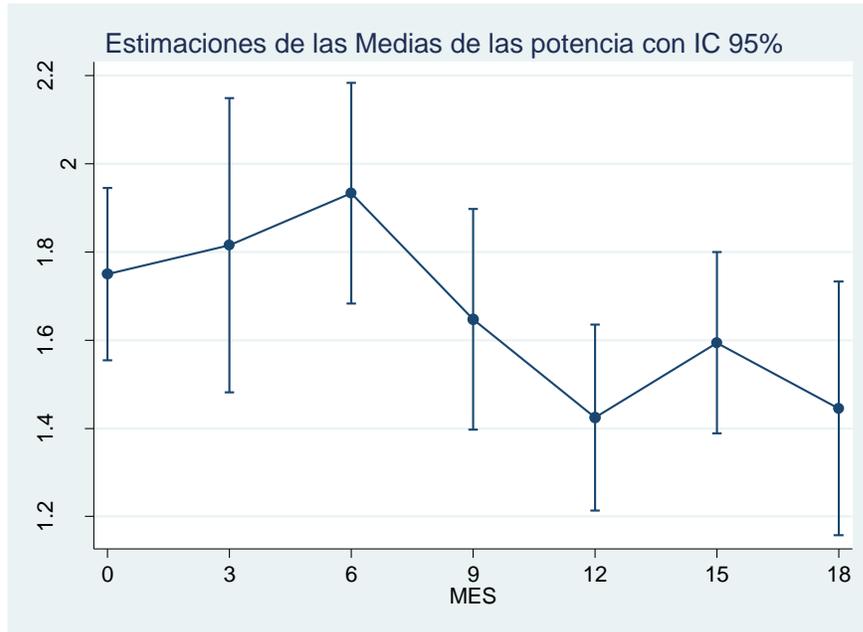
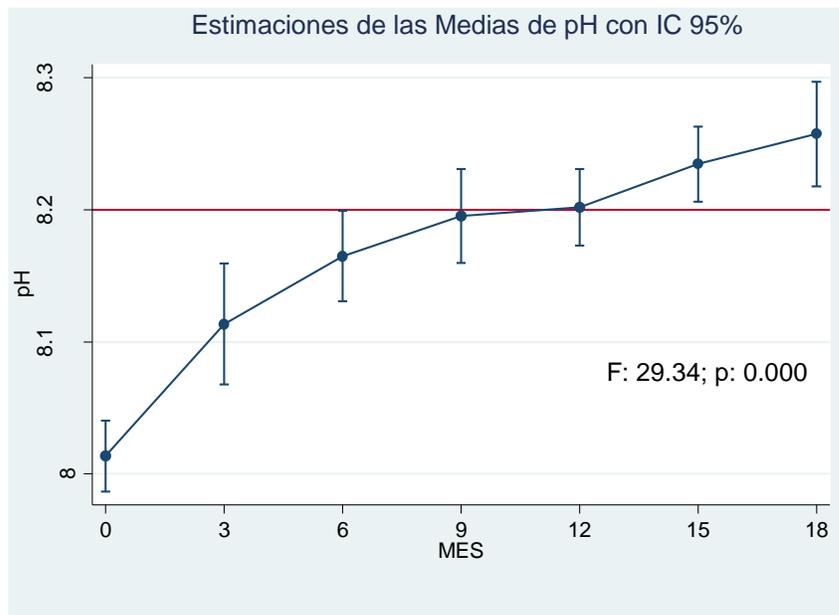


Fig. N ° 16.- Grafico de estimaciones de las medias de los pH por mes de evaluación.



ANEXO 06 LISTA DE COMANDOS EMPLEADOS (STATA)

<pre> tab1 TESTAG TESTVACC prtest TESTAG=0.5, level(95) prtest TESTVACC =0.5, level(95) gen ID= vacc two scatter POTENCIA VACC PHVACUNA , mlabel(VACC) lfit lfit POTENCIA VACC PHVACUNA lowess POTENCIA VACC PHVACUNA tab1 PHVACUNA if ID!=42 proportion PHVACUNA if vacc !=42 csgof PHVACUNA , expperc(33.3 33.3 33.3) graph pie, over(PHVACUNA) pl(_all per) pl(_all sum), tab1 pHAG two scatter POTENCIA VACC pHAG , mlabel(VACC) lfit POTENCIA VACC pHAG lowess POTENCIA VACC pHAG proportion pHAG csgof pHAG , expperc(33.3 33.3 33.3) graph pie, over(pHAG) pl(_all per) pl(_all sum), DL50 para vacuna y antigeno gen DL50VACgrupo= DL50VACC gen DL50AGgrupo= DL50AG csgof DL50VACgrupo , expperc(25 25 25 25) csgof DL50AGgrupo , expperc(25 25 25 25) proportion DL50VACgrupo proportion DL50AGgrupo graph pie, over(DL50VACgrupo) pl(_all per) pl(_all sum), graph pie, over(DL50AGgrupo) pl(_all per) pl(_all sum), sum POTENCIA VAC swilk POTENCIA VAC ci POTENCIA VAC inspect POTENCIA VACC histogram POTENCIA VACC, bin(10) frequency addlabel normal (bin=10, start=1, width=.15999999) sum PotenciaAG sum PotenciaAG,detail swilk PotenciaAG histogram PotenciaAG, bin(10) frequency addlabel normal (bin=10, start=1.1, width=.35999998) inspect PotenciaAG ci PotenciaAG predict restandariz,rstandard </pre>	<pre> two scatter POTENCIA VACC PotenciaAG , mlabel(VACC) lfit POTENCIA VACC PotenciaAG lowess POTENCIA VACC PotenciaAG oneway POTENCIA VACC PHVACUNA , noanova tabulate oneway POTENCIA VACC PHVACUNA anova POTENCIA VACC PHVACUNA margins PHVACUNA marginsplot oneway POTENCIA VACC pHAG , noanova tabulate oneway POTENCIA VACC pHAG anova POTENCIA VACC pHAG margins pHAG marginsplot oneway POTENCIA VACC DL50VACgrupo anova POTENCIA VACC DL50VACgrupo margins DL50VACgrupo marginsplot oneway PotenciaAG DL50AGgrupo oneway PotenciaAG DL50AGgrupo,noanova tabulate anova PotenciaAG DL50AGgrupo margins DL50AGgrupo marginsplot oneway PotenciaAG pHAG anova PotenciaAG pHAG margins pHAG marginsplot oneway PotenciaAG pHAG, noanova scheffe twoway (scatter POTENCIA VACC PotenciaAG) (lfit POTENCIA VACC PotenciaAG) two scatter POTENCIA VACC PotenciaAG , mlabel(ID) lfit POTENCIA VACC PotenciaAG lowess POTENCIA VACC PotenciaAG regress POTENCIA VACC PotenciaAG lincom 1.496145+ PotenciaAG*2 regress POTENCIA VACC PotenciaAG predict estimados, xb gen residuo= POTENCIA VACC - estimados histogram residuo, bin(8) qnorm residuo qui regress POTENCIA VACC PotenciaAG </pre>
---	---

<pre> sum restandariz histogram restandariz, bin(8) qnorm restandariz predict restudent, rstudent histogram restudent, bin(8) sum restudent qnorm restudent (normalidad) swilk restudent estat hettest (homocedasticidad) rvpplot PotenciaAG (linealidad) linealidad: lowess restudent potenciaVac, yline(-2 0 2) msymbol(Oh) rlopts(clcolor(green) clwidth(thick)) xlabel(1.1 (1.1) 3.5) xtick(1.5 (2) 3.5) sfrancia restudent residuo (independencia de residuos) lpoly POTENCIA VACC PotenciaAG predict rstudent, rstudent lowess rstudent POTENCIA VACC mkspline potenciaAG1 1.8 potenciaAG2 2.4 potenciaAG3 = potenciaAG regress POTENCIA VACC potenciaAG1 potenciaAG2 potenciaAG3 lincom potenciaAG1 lincom potenciaAG1+ potenciaAG2 lincom potenciaAG1+ potenciaAG2+ potenciaAG3 predict y_hat3, xb scatter POTENCIA VACC PotenciaAG, msymbol(Oh) line y_hat3 PotenciaAG, xlabel(1. (1.) 3.0) xtick(1.5 (2) 3.0) clcolor(red) clwidth(thick) xline(1.8 2.4, lcolor(blue)) ylabel('yloglabel', angle(0)) ytick('ylogtick') ytitle(" POTENCIA VACC (UI/dosis)") legend(order(1 "Observed" 2 "Expected")) name(knot2, replace) test potenciaAG2 potenciaAG3 mkspline s 3 = PotenciaAG, marginal pctl displayknots regress POTENCIA VACC s1 s2 s3 lincom s1 lincom s1+ s2 lincom s1+ s2+ s3 predict y_hatlineal2, xb scatter POTENCIA VACC PotenciaAG, msymbol(Oh) line y_hatlineal2 PotenciaAG, xlabel(1. (1.) 3.0) xtick(1.5 (2) 3.0) clcolor(red) clwidth(thick) xline(1.7 1.9, lcolor(blue)) ylabel('yloglabel', angle(0)) ytick('ylogtick') ytitle(" POTENCIA VACC (UI/dosis)") legend(order(1 "Observed" 2 "Expected")) name(knot2, replace) test s2 s3 </pre>	<pre> estimates store m_rcs1 qui regress POTENCIA VACC potenciaAG1 potenciaAG2 potenciaAG3 estimates store m_rcs2 qui regress POTENCIA VACC _ScubicoAG1 _ScubicoAG2 _ScubicoAG3 _ScubicoAG4 estimates store m_rcs3 qui regress POTENCIA VACC slineal1 slineal2 slineal3 slineal4 slineal5 estimates store m_rcs4 qui regress POTENCIA VACC s1 s2 s3 estimates store m_rcs5 estimates stats m_rcs1 m_rcs2 m_rcs3 m_rcs4 m_rcs5 list in 1/190, sepby (LOTES) icc resultado LOTES tab TESTVALIDEZ prtest TESTVALIDEZ =0.5, level(95) sum POTENCIA , detail swilk POTENCIA PH bysort MES :swilk(POTENCIA) bysort MES :swilk(PH) egen cell1 = group robvar PH , by(cell1) robvar POTENCIA , by(cell1) anova POTENCIA LOTEVACC MES , repeated(MES) tabdisp LOTEVACC MES , cellvar(POTENCIA) margins MES marginsplot anova PH LOTEVACC MES , repeated(MES) tabdisp LOTEVACC MES , cellvar(PH) margins MES marginsplot esizei 6 81 29.34 </pre>
---	--

ANEXO 07 CODIGOS Y UNIDADES EMPLEADAS EN STATA

Variable	Etiqueta de Variable	Codificación/unidad
POTENCIAVACUNA	Potencia de vacuna	UI/dosis
PHVACUNA	pH de vacuna	pH
DL50VACC	DL50 de vacuna	DL50/0.03 mL
PotenciaAG	Potencia de antígeno	UI/dosis
pHAG	pH de antígeno	pH
DL50AG	DL50 de antígeno	DL50/0.03 mL
ANTIGEN	Lote de Antígeno	números reales
TESTAG	Test de validez del antígeno	0=No cumple, 1=Si cumple
TESTVACC	Test de validez de la vacuna	0=No cumple, 1=Si cumple
vacc	Lote de Vacuna	Números reales
resultado	Resultado de potencia	UI/dosis
LOTES	Lotes de vacunas y antígenos	Números reales
ANALISTA	ANALISTA	0=KF, 1=NZ; 2=RJ
MES	Mes de evaluación	números reales
POTENCIA	Potencia de la vacuna	UI/dosis
PH	pH de la vacuna	pH
LOTEVACC	Lote de vacuna	Números reales
TESTVALIDEZ	Test de validez de la vacuna	0=No cumple, 1=Si cumple