



Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”
Centro de Investigación, Diagnóstico y Referencia
Departamento de Virología

Tesis en opción al Título de Máster en Virología

**Título: Evaluación de estuches diagnósticos
comerciales para la cuantificación del ADN del
Virus de la Hepatitis B.**

Autora: Lic. Dayesi López Hernández.

La Habana, 2021



Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"
Centro de Investigación, Diagnóstico y Referencia
Departamento de Virología

Tesis en opción al Título de Máster en Virología

**Título: Evaluación de estuches diagnósticos comerciales
para la cuantificación del ADN del Virus de la Hepatitis B.**

Autora: Lic. Dayesi López Hernández

Tutoras: Dra. Licel de los Ángeles Rodríguez Lay, DrC.

Dra. María Caridad Montalvo Villalba, DrC.

Asesora: Lic. Yudira Soto Brito, DrC.

La Habana, 2021

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar le doy gracias a Dios por permitirme llegar hasta aquí.

A mis padres y a mi abuela, pues sin su ayuda esta meta no hubiese sido posible de alcanzar, no solo la Maestría, sino todo mi trabajo como profesional.

A mi esposo, mi compañero de vida, por su comprensión y paciencia. Por darme ánimos cuando pensé que no podía continuar o el cansancio me derrumbaba, gracias mi amor por todo tu apoyo.

A mi hijo, por ser el principal motor impulsor de todas mis acciones y porque a pesar de sus cuatro añitos, me cedió parte de su tiempo con mamá para poder culminar esta importante misión.

A toda mi familia, porque de una forma u otra todos han contribuido a que este camino que escogí como profesional, sea más fácil de recorrer.

A Licel por acogerme en el Laboratorio de Hepatitis Virales como su estudiante y confiar en mí, a ella le agradezco mi trabajo en el IPK.

A Cary por ser más que mi tutora, mi amiga, como una madre que siempre está ahí cuando su hijo le pide un consejo o llama por ayuda. Gracias por ser tan especial como persona y una excelente profesional.

A Yudira, por sus valiosos consejos y su sabiduría, que sin dudas han contribuido a mi formación. Además, por toda la ayuda que me ha brindado en la culminación de este trabajo de tesis.

A todos los investigadores y profesionales del Departamento de Virología, todos estupendos profesores, gracias por sus enseñanzas, en especial a Mayra, Odalys, Elena, Yenisleydis, Magilé, Lissette, Yanet, Didye, Dailyn y Mayling.

A mis amigas y compañeras de la Maestría, Maria Karla, Melisa y Claudia, porque aprendimos a ser como una familia para lograr vencer todos los obstáculos y lograr esta meta.

A Javier San Juan por ser un hombre amigo siempre que lo necesito, y por su ayuda en el procesamiento estadístico de los datos de este trabajo.

A mis compañeras de guardia de COVID, Lirialys, Ana Elisa, Sairi y Yanaika por su comprensión cuando lo necesité y los momentos amenos a pesar de tanto trabajo.

A todos los que de una forma u otra me apoyaron....gracias.

***A mi familia,
por su apoyo y comprensión.***

RESUMEN

Introducción: Los ensayos de cuantificación de los niveles de ADN-VHB son esenciales en el diagnóstico y seguimiento de pacientes infectados con el VHB, así como un criterio indispensable para el inicio del tratamiento. **Objetivo:** Evaluar el desempeño analítico de dos estuches comerciales para la cuantificación del ADN-VHB y su aplicación a muestras clínicas. **Métodos:** Se emplearon dos paneles de muestras de suero constituidos por 80 y 76 muestras para la evaluación de los estuches SUMASIGNAL VHB (un paso) y Hepatitis B Viral DNA Quantitative Fluorescence Diagnostic Kit, respectivamente, así como estándares de referencia de la OMS. Se determinó para ambos estuches, la especificidad clínica y analítica, linealidad, precisión intraensayo y comparación con un ensayo de referencia. El estuche Hepatitis B Viral se aplicó a 50 muestras clínicas. **Resultados:** La especificidad analítica y clínica fue del 100 % para ambos ensayos. Al evaluar la linealidad y precisión intraensayo con los estándares de referencia, se obtuvieron excelentes resultados para ambos ensayos, $r^2 = 0,9954$ y $r^2 = 0.9992$ respectivamente, y bajos coeficientes de variación intraensayo ($CV < 3\%$). El estudio comparativo de los estuches SUMASIGNAL y Hepatitis B Viral con el ensayo comercial Artus HBV RG PCR kit mostró una correlación fuerte, $r = 0,8882$ ($p < 0.05$) y $r = 0.9120$ ($p < 0.05$), respectivamente, y buena concordancia por el método de Bland-Altman. La aplicación clínica del estuche SUMASIGNAL, reveló que el 50% de las muestras estudiadas presentan criterio virológico para iniciar tratamiento, así como su utilidad en el seguimiento de pacientes con hepatitis B crónica. **Conclusiones:** Los ensayos evaluados, comercializados en Cuba, mostraron altos estándares de calidad, lo que permitiría su uso con una cobertura nacional en una plataforma tecnológica disponible para todo el país.

LISTADO DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADN-VHB: Ácido desoxirribonucleico del Virus de la Hepatitis B

AntiHBc: Anticuerpos contra el antígeno de la cápside del Virus de la Hepatitis B

AntiHB_e: Anticuerpos contra el antígeno de temprano del Virus de la Hepatitis B

Anti-HBs: Anticuerpos contra el antígeno de superficie del Virus de la Hepatitis B

CHC: Carcinoma hepatocelular

CIE: Centro Nacional de Inmunoensayo

CV: carga viral y/o coeficiente de variación (según el contexto)

CIOMS: Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (del inglés, Council for International Organizations of Medical Sciences), entidad en la esfera de la Organización Mundial de la Salud.

Core: Cápside (terminología del inglés)

EI: Estándar Internacional

FDA: Agencia de Drogas y Alimentos (del inglés, food and drug administration agency)

HBC: Hepatitis B crónica

HBeAg: Antígeno temprano del Virus de la Hepatitis B (del inglés, Hepatitis B early antigen)

HBsAg: Antígeno de superficie del Virus de la Hepatitis B (del inglés, Hepatitis B surface antigen)

IgM anti-HBc: Inmunoglobulina M contra el antígeno de la cápside del Virus de la Hepatitis B.

IC: intervalo de confianza

IOB: Infección oculta por el Virus de la Hepatitis B.

LD: Límite de detección

NIBSC: Instituto Nacional de Controles y Estándares Biológicos (del inglés, National Institute for Biological Standards and Control)

OMS: Organización Mundial de la Salud

OPS: Organización Panamericana de la Salud

RCP: Reacción en Cadena de la Polimerasa

RCP-TR: Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real

SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida.

VHA: Virus de la Hepatitis A

VHB: Virus de la Hepatitis B

VHC: Virus de la Hepatitis C

VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana

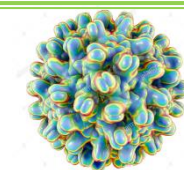
TABLA DE CONTENIDOS

I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.2. OBJETIVOS	4
I.2.1. <i>Objetivo general</i>	4
I.2.2. <i>Objetivos específicos</i>	4
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
II.1. HISTORIA Y CLASIFICACIÓN DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B	5
II.1.1. <i>Descubrimiento</i>	5
II.1.2. <i>Clasificación taxonómica y estructura del virión</i>	6
II.2. CARACTERÍSTICAS DEL GENOMA VIRAL	6
II.2.1. <i>Subtipos y genotipos</i>	8
II.3. CICLO REPLICATIVO	9
II.4. PATOGENIA, RESPUESTA INMUNE Y PERSISTENCIA VIRAL.....	11
II.4.1. <i>Inmunopatogénesis de la infección por VHB</i>	11
II.4.2. <i>Respuesta inmune</i>	11
II.4.3. <i>Persistencia viral: Mecanismos que inducen el desarrollo de Hepatitis crónica</i>	13
II.5. DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO	14
II.5.1. <i>Diagnóstico serológico</i>	14
II.5.2. <i>Diagnóstico molecular: Cuantificación del ADN del VHB</i>	15
II.5.3. <i>Nuevos marcadores en el diagnóstico del VHB</i>	17
II.6. MANIFESTACIONES CLÍNICAS E HISTORIA NATURAL DE LA ENFERMEDAD	18
II.6.1. <i>Hepatitis B aguda</i>	18
II.6.2. <i>Hepatitis B crónica</i>	19
II.6.3. <i>Infección oculta por VHB</i>	20
II.6.4. <i>Complicaciones de la hepatitis B crónica</i>	20
II.7. EPIDEMIOLOGÍA.....	21
II.7.1. <i>Prevalencia mundial</i>	21
II.7.2. <i>Epidemiología molecular</i>	22
II.7.3. <i>Transmisión</i>	22
II.7.4. <i>Grupos de riesgo</i>	23
II.8. TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN	23
II.8.1. <i>Terapia antiviral y criterio de tratamiento</i>	23
II.8.2. <i>Prevención y control de la infección por el VHB</i>	25
III. MATERIALES Y MÉTODOS	27
III.1. DISEÑO Y UNIVERSO DEL ESTUDIO	27
III.2. TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS	29
III.2.1. <i>Muestras clínicas</i>	29
III.2.2. <i>Estándares Internacionales de la OMS</i>	31
III.3. EVALUACIÓN DE LOS INDICADORES DEL DESEMPEÑO	31
III.3.1. <i>Linealidad, exactitud y precisión</i>	32
III.3.2. <i>Estudio de comparación entre los ensayos de RCP-TR evaluados y un ensayo de referencia (Artus HBV RG PCR Kit)</i>	32

III.3.4. Extracción y cuantificación del ADN-VHB para la evaluación de los estuches comerciales	33
III.3.4.1. Ensayo SUMASIGNAL VHB (un paso)	33
III.3.4.1.1 Procedimiento técnico	33
III.3.4.1.2. Control de calidad	35
III.3.4.1.3. Límite de detección	35
III.3.4.1.4. Interpretación de los resultados	35
III.3.4.2 Aplicación del ensayo SUMASIGNAL VHB (un paso) a muestras clínicas	36
III.3.4.3. Ensayo Hepatitis B Viral DNA Quantitative Fluorescence Diagnostic Kit (PCR-Fluorescence Probing)	36
III.3.4.3.1. Procedimiento técnico	36
III.3.4.3.2. Control de calidad	39
III.3.4.3.3. Límite de detección	39
III.3.4.3.4. Interpretación de los resultados	39
III.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	39
III.5. ASPECTOS ÉTICOS DE LA INVESTIGACIÓN	40
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
IV.1. INDICADORES DE DESEMPEÑO DE LOS ESTUCHES SUMASIGNAL VHB Y HEPATITIS B VIRAL DNA QUANTITATIVE FLUORESCENCE DIAGNOSTIC KIT (PCR- FLUORESCENCE PROBING)	41
IV.1.2. Estudio de la precisión y linealidad de los métodos evaluados frente a Estándares Internacionales (EI)	43
IV.1.3. Estudio de comparación entre los estuches SUMASIGNAL VHB (un paso) y Hepatitis B Viral DNA Quantitative Fluorescence Diagnostic Kit (PCR- Fluorescence Probing) con el sistema comercial de referencia cuantitativa Artus HBV RG PCR (Qiagen, Alemania)	48
IV.1.3.1. Análisis de la concordancia entre los métodos evaluados y el sistema de referencia cuantitativa Artus HBV RG PCR kit	53
IV.2. APLICACIÓN DEL ESTUCHE SUMASIGNAL VHB (UN PASO) EN MUESTRAS CLÍNICAS	57
IV.2.1. Comportamiento de las cargas virales del VHB por grupos de riesgo	59
V. CONCLUSIONES	64
VI. RECOMENDACIONES	65
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
VIII. ANEXOS	85

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN



I. INTRODUCCIÓN

La hepatitis B es una enfermedad de etiología viral, la cual representa un problema de salud mundial, aun cuando la vacuna profiláctica administrada durante la infancia para prevenir la infección por el Virus de la Hepatitis B (VHB), ha reducido considerablemente la incidencia de nuevas infecciones por esta etiología (1).

El panorama general de la infección por el VHB no es muy diferente al de hace 10 años, pues según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), hasta el año 2015, 257 millones de personas padecían infección crónica por el VHB, siendo esta la principal causa de cirrosis y carcinoma hepatocelular, cuyas secuelas son responsables de la muerte de unas 887 000 personas (2).

Mientras que la infección durante la adultez, transcurre entre el 90 y el 95% de los casos, como una hepatitis viral aguda con un comportamiento asintomático y que evoluciona hacia una resolución espontánea, cuando la infección ocurre en un escenario de inmunotolerancia del paciente, como son los recién nacidos y niños, la tasa de evolución a la cronicidad se eleva (cerca del 90% en la infección perinatal y 30% en la infancia) (3). Por esta razón, en el 2015 los estados miembros de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) aprobaron el primer plan de acción para la prevención y el control de las hepatitis virales a escala regional. En dicho plan se promueven políticas e intervenciones de salud pública encaminadas a eliminar las hepatitis virales en los estados miembros hacia el 2030, siendo el objetivo de primer orden, la eliminación de la transmisión materno-infantil de la hepatitis B (4).

La prevalencia de la hepatitis B, la cual se define como la positividad al antígeno de superficie del VHB (HBsAg), es más alta en la región del pacífico occidental y en África, donde el 6,2% y el 6,1% de la población adulta están infectadas, respectivamente. En la región del Mediterráneo oriental, Asia suroriental y en Europa, se estiman frecuencias de infección para la población general del 3,3%, el 2,0% y el 1,6%, respectivamente. Mientras que en la región de las Américas es de 0,7% (5), donde se describen entre los grupos de riesgo más frecuentes a los hijos de madres

positivas al HBsAg, los hemodializados, las personas con múltiples parejas sexuales, los hombres que tienen sexo con hombres, los pacientes inmunodeprimidos y los profesionales de la salud (6, 7).

Desde el punto de vista clínico, la hepatitis B es una enfermedad necro inflamatoria de severidad variable, imposible de diferenciar de otras hepatitis causadas por otros agentes, por lo que la confirmación del diagnóstico por pruebas de laboratorio es esencial (8).

El HBsAg es el marcador serológico clave de la infección (9), sin embargo, aun cuando su presencia indica infección por el VHB, no provee información del estado replicativo del virus. Por lo que se detectan otros marcadores serológicos de utilidad que permiten dilucidar el curso de la infección y propician la información necesaria para un correcto manejo de la enfermedad y el control de la terapia antiviral, en los casos correspondientes (10, 11).

Entre los marcadores más empleados en el diagnóstico de la infección por el VHB, se encuentran, además del HBsAg, los anticuerpos contra el HBsAg (anti-HBs), la inmunoglobulina M contra el antígeno del core (IgM anti-HBc), los anticuerpos totales contra el antígeno del core (anti-HBc), el antígeno e (HBeAg), los anticuerpos contra el antígeno e (anti-HBe) y el ADN viral. Estos tres últimos marcadores se emplean para determinar la infectividad y la replicación viral (12).

Debido a que la presencia de mutaciones puntuales en determinados genes del VHB, como son el gen S y el precore, pueden dar lugar a fenotipos negativos del HBsAg o HBeAg, respectivamente (13, 14), es necesario acudir a la detección del ADN viral para obtener información más confiable sobre el estadio clínico de la infección.

El ADN del VHB se detecta al comienzo de la infección y luego disminuye progresivamente en la infección crónica, o desaparece cuando se elimina la infección. En muchos pacientes crónicos, aun cuando ya se produjo la seroconversión del HBeAg, persisten bajos niveles de carga viral ($<10^4$ copias/ml) (15). Por tanto, los métodos de detección cuantitativos del ADN del VHB son útiles para diagnosticar la replicación del VHB en infecciones crónicas; evaluar el pronóstico de la enfermedad y seguir el riesgo de progresión a cirrosis y carcinoma

hepatocelular. Además, permiten definir el comienzo del tratamiento antiviral y controlar dicho tratamiento mediante la identificación de la resistencia a los fármacos análogos de nucleósidos y nucleótidos. Asimismo, facilitan la detección de hepatitis B oculta (HBO), pues en estos casos las cargas virales pueden ser muy bajas. Además, los métodos cuantitativos son fundamentales para estudiar a las embarazadas con HBsAg positivo, con el propósito de instaurar una terapia antiviral oportuna (9, 16), lo cual contribuiría a la eliminación de la transmisión materno-infantil de la hepatitis B.

El principio de los métodos para detectar y cuantificar el ADN del VHB es la amplificación de la señal, en este principio se basan las tecnologías de ADN ramificado (ADNr), la amplificación isotérmica y la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) (17).

Para el seguimiento terapéutico de la infección crónica por el VHB, se recomienda el empleo de ensayos sensibles para la detección temprana de la reactivación viral. Además, es imprescindible que el ensayo empleado permita cuantificar igualmente todos los genotipos del VHB. Las asociaciones internacionales para el estudio de las enfermedades hepáticas requieren el empleo de métodos para la cuantificación del ADN del VHB con una elevada sensibilidad. Un estuche de detección del VHB debe alcanzar el criterio de sensibilidad de 10-15 UI/ml; un amplio rango de linealidad (1-9 $\log_{10}$ UI/ml), elevada especificidad y buena repetitividad (18).

Con este fin, se comercializan actualmente en el mercado internacional, una gran variedad de sistemas automatizados para la detección de ADN-VHB (19). Sin embargo, aun cuando estas plataformas se encuentran disponibles en el mercado, su adquisición constituye un reto para países con bajos recursos como Cuba, debido a su elevado costo, lo que impide la sostenibilidad y cobertura nacional para su empleo en el sistema de salud.

Por tal razón en nuestro país se han desarrollado ensayos para la detección cualitativa y cuantitativa del VHB mediante el diseño de sistemas caseros, partiendo de reactivos y plataformas comerciales para los procesos de extracción y amplificación del ADN. Ejemplo de esto es el método de RCP en tiempo real (RCP-

TR) diseñado en el Laboratorio de Referencia Nacional en Hepatitis Virales del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí, en el cual se emplea la plataforma *LightCycler TaqMan Master* (Roche Diagnostics, EE.UU), el cual presenta un límite de detección de 16,41 UI/mL (20). Sin embargo, esta metodología no se ha extendido a otros laboratorios de la red nacional. De ahí la importancia de contar con estuches comercializados en nuestro país que cumplan con los estándares de calidad, que permitan garantizar, de manera homogénea, la cobertura del diagnóstico molecular del VHB con una plataforma tecnológica nacional.

El presente trabajo se propone la evaluación de dos sistemas de RCP-TR para la cuantificación del ADN-VHB comercializados por el Centro Nacional de Inmunoensayo (CIE, La Habana, Cuba), para determinar su desempeño analítico y verificar si cumplen con los estándares de calidad necesarios para ser empleados en el diagnóstico y seguimiento de la hepatitis B en Cuba.

I.2. Objetivos

I.2.1. Objetivo general

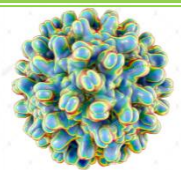
Evaluar el desempeño analítico de dos ensayos comercializados por el CIE para la cuantificación del ADN-VHB por RCP-TR: SUMASIGNAL VHB (un paso) y *Hepatitis B Viral DNA Quantitative Fluorescence Diagnostic Kit (PCR- Fluorescence Probing)*,

I.2.2. Objetivos específicos

1. Determinar los indicadores de desempeño de los ensayos SUMASIGNAL VHB (un paso) y *Hepatitis B Viral DNA Quantitative Fluorescence Diagnostic Kit (PCR- Fluorescence Probing)*.
2. Implementar el ensayo SUMASIGNAL VHB (un paso) en el diagnóstico y seguimiento de muestras clínicas.

CAPÍTULO II

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1. Historia y clasificación del Virus de la Hepatitis B

II.1.1. Descubrimiento

La hepatitis se describió inicialmente de manera inapropiada como ictericia catarral en 1865, una descripción que luego se corrigió redefiniéndose como inflamación hepática en la década de 1930 (21). Sin embargo, no fue hasta 1965 que el genetista Baruch Blumberg descubrió evidencias del virus de la hepatitis B (VHB) en muestras de suero de personas infectadas; descubrimiento por el cual fue galardonado en 1976 con el Premio Nobel de Medicina (22). El antígeno inicialmente llamado antígeno de Australia (por ser descubierto en una muestra de suero de un aborigen australiano), marcó el comienzo del viaje de descubrimiento del VHB. Otro investigador, Alfred M. Prince, relacionó el antígeno de Australia con la hepatitis sérica y publicó sus hallazgos 3 años después (23). Más tarde, el antígeno de Australia se encontró comúnmente en individuos que vivían en instituciones, lo que sugirió que las condiciones de hacinamiento facilitaban la adquisición del virus (24).

Los resultados de estudios posteriores sobre el antígeno de Australia en pacientes con aminotransferasas séricas anormales confirmaron el vínculo entre el antígeno y la hepatitis. Fue así, como en 1967, Krugman y sus colegas identificaron dos tipos de hepatitis, las cuales denominaron MS-1 y MS-2. La MS-1 se adquiría típicamente por vía oral después de un corto período de incubación, mientras que la MS-2 se transmitía aparentemente por vía parenteral con un largo período de incubación. Las hepatitis MS-1 y MS-2 se clasificaron posteriormente como hepatitis A y B, respectivamente (25). Los experimentos en chimpancés y humanos confirmaron que el antígeno de Australia era responsable de la hepatitis B; por lo que fue renombrado como Virus de la Hepatitis B (VHB). En el año 1970, mediante el empleo de la microscopía electrónica, Dane y sus colegas lograron visualizar los viriones completos del VHB (partículas infectivas) y diversas partículas subvirales (formas circulares y filamentosas), denominando los viriones como partículas de Dane (26).

Esta acción constituyó un hito científico ya que fue el primer estudio donde se describió la morfología del VHB utilizando esta técnica de microscopía.

II.1.2. Clasificación taxonómica y estructura del virión

El VHB es el prototipo de la familia *Hepadnaviridae*, género *Orthohepadnavirus* que infecta a mamíferos. Esta familia también agrupa a otros virus como el Virus de la Hepatitis B del pato, el Virus de la Hepatitis B de la marmota, el Virus de la Hepatitis B de la garza, el Virus de la Hepatitis B de la ardilla, con los cuales comparte características comunes: Todos estos virus comparten cierta similitud en cuanto a estructura y organización del genoma; producen exceso de partículas subvirales lipoproteicas; estrecho rango de hospederos y provocan infecciones persistentes con un marcado, aunque no absoluto, hepatotropismo (27).

Los viriones presentan morfología icosaédrica, con un diámetro de 40-42 nm y envoltura externa lipoprotéica que contiene tres glicoproteínas o antígenos de superficie (denominados S, M y L). Además de los viriones, las células infectadas por VHB producen dos partículas lipoproteicas subvirales: esferas de 20 nm y formas filamentosas de diámetro similar. Las partículas esféricas pueden encontrarse hasta 10^{12} partículas por mililitros (mL) en la sangre, siendo esta la más abundante. Las partículas no infectivas de forma filamentosa contienen aproximadamente iguales cantidades de las proteínas M y L. La superficie exhibe rasgos como si fuera una púa compuesta por homodímeros y heterodímeros de las proteínas L, M y S; y al igual que en el virus se observa una proporción de 1:1:4. Estas partículas con antígeno de superficie (HBsAg) contienen sólo glucoproteínas de superficie y lípidos del huésped (28, 29). Su función en el ciclo viral de la hepatitis B es desconocida. Se especula que estas partículas se unen a los anticuerpos (Ac) para su neutralización y así facilitar la penetración de partículas virales infectivas en células del hospedero (30).

II.2. Características del genoma viral

El VHB presenta un genoma de ADN con un tamaño de 3200 pares de bases de longitud y es parcialmente de doble cadena, organizado con un patrón circular. Consta de una cadena negativa completa, complementaria del ARNm, también

conocida como cadena L (large; de las siglas en inglés) y una cadena positiva de longitud incompleta conocida como S (small; de las siglas en inglés). El genoma contiene cuatro promotores, dos regiones potenciadoras o *enhancer*, del inglés (Enh 1, Enh 2) y dos repeticiones directas (DR1, DR2). Durante la replicación del virus, la cadena corta de ADN se completa y se forma un ADN circular covalentemente cerrado (ADNccc). El ADNccc sirve como molde para la transcripción viral, generando ARNm de 3.5, 2.4, 2.1 y 0.7 kb (31). El genoma de VHB tiene cuatro marcos abiertos de lectura (Figura II.1) (32).

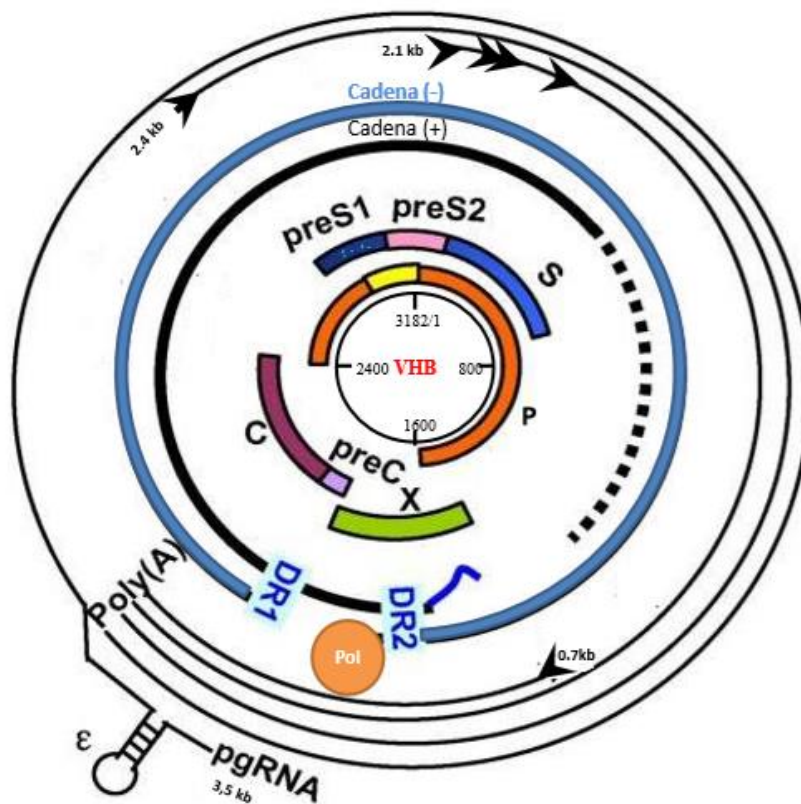


Figura II.1. Representación esquemática del genoma del VHB. Imagen modificada de Gish y col. 2015 y Tong y col. 2016 (31, 33).

- Región preS1/preS2/S que codifica los tres antígenos de superficie virales: proteína S, M y L. La proteína S o antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) se sintetiza en el citoplasma del hepatocito y pasa al suero en tres formas. diferentes (partículas esféricas, filamentosas y de Dane). Se presenta

muy precozmente en el suero, señal evidente de la infección, y desaparece o no, según la evolución del cuadro. Está codificado en el genoma viral por el gen S y existe en dos formas, glicosilada (GP27) y no glicosilada (P24). La proteína M (o preS2) está codificada por las regiones S y preS2; tiene dos formas glicosiladas (GP33 y GP36). La proteína L (o preS1) está codificada por las regiones pre-S1, pre-S2 y S. También presenta una forma glicosilada (GP42) y otra no glicosilada (P39). La proteína S constituye el grueso de las proteínas de la envoltura mientras la proteína L es necesaria para la unión del virus a la célula receptora y en el ensamblaje y liberación del virión (31).

- Región PC/CP codifica la proteína principal viral o polipéptido de la nucleocápside (HBcAg) y el antígeno e de la hepatitis B (HBeAg). La región PC codifica una secuencia señal que la dirige a su procesamiento en el Aparato de Golgi y a su liberación como HBeAg. El HBeAg juega un papel importante en la modulación de la respuesta inmune del huésped. El HBcAg es esencial para el ensamblaje de la cápsula y la regulación de la replicación (34)
- Región P codifica la ADN polimerasa viral, la cual es específica para dicha proteína. La polimerasa viral, con acción también de reverso transcriptasa, es la responsable de la síntesis de ADN en las células infectadas y de los transcritos de ARNm (35, 36)
- Región X codifica la proteína viral X (HBx) que modula la señal de traducción de la célula del hospedero y regula la expresión genética tanto del hospedero como del virus. La proteína X es necesaria para la replicación del virus y su dispersión (37, 38). Otra función de esta proteína es la de promover la infección crónica mediante diversos mecanismos como por ejemplo previniendo la apoptosis de los hepatocitos infectados (31) y estudios recientes han demostrado su participación en el desarrollo de CHC (39).

II.2.1. Subtipos y genotipos

El VHB se clasifica en nueve subtipos serológicos (adw2, adw4, adr, adrq-, ayw1, ayw2, ayw3, ayw4 y ayr) basándose en los determinantes antígenicos del antígeno

de superficie (40). Actualmente, basándose en una divergencia genética de >7,5% en el genoma completo hay descritos 10 genotipos distintos del VHB (A, B, C, D, E, F, G, H, I y J) (41, 42). Cuando la divergencia es mayor al 4% pero inferior al 7,5% de la secuencia nucleotídica del genoma completo, se describen los subgenotipos. Se han descrito numerosos subgenotipos dentro de los genotipos A-D y F (43). Divergencias menores al 4% en el genoma completo del VHB determinan la existencia de los distintos “clados” (44). Kramvis y otros autores han estudiado la relación entre los subtipos serológicos del VHB y los distintos genotipos y subgenotipos del virus (45, 46). Existe una correlación amplia y estadísticamente significativa entre los subtipos serológicos y los genotipos, y en algunos casos, los subtipos serológicos pueden usarse para diferenciar subgenotipos. Sin embargo, los datos analizados son escasos y son necesarios más estudios. Además, se ha visto que un mismo subtipo puede clasificarse en diferentes genotipos. El estudio de los genotipos adquiere importancia clínica debido a su influencia en la progresión de la enfermedad hacia una hepatitis crónica. Los genotipos tienen un impacto significativo en la evolución clínica, pronóstico de la enfermedad, en la respuesta al tratamiento antiviral y a la vacuna (47-49).

II.3. Ciclo replicativo

El VHB presenta marcado tropismo por los hepatocitos. La unión y entrada del VHB al hepatocito ocurre a través del receptor polipeptídico de cotransporte sodio-taurocolato (NTCP de las siglas en inglés Na-taurocolate cotransporting polypeptide) (50, 51), luego de este paso la envoltura viral se rompe y libera la nucleocápside al citoplasma, la cual se dirige al núcleo conducida por la señal de localización nuclear presente en la proteína del core. La nucleocápside se puede desintegrar en la membrana nuclear liberando el ADN viral para su posterior transporte al núcleo celular y, una vez en el núcleo de los hepatocitos, el genoma infectante se convierte en un ADN circular covalentemente cerrado (ADNccc) por acción de la polimerasa viral. La cadena negativa del ADNccc sirve de molde para la transcripción de los distintos ARN virales mediante la ARN polimerasa II del hepatocito. Se generan cinco transcritos de ARN, dos de ellos genómicos y tres subgenómicos (52, 53).

En el citoplasma, el ARN pregenómico (ARNpg) se traduce en la proteína del core y la polimerasa viral, el ARN subgenómico se traduce en las tres proteínas de la envoltura y la proteína X. Posteriormente, se ensamblan las nucleocápsides en el citosol, y durante este proceso una molécula de ARN genómico junto a la polimerasa viral se incorporan al core viral (31). Tras la encapsidación del ARN viral, la reverso transcriptasa empieza la síntesis de las dos cadenas de ADN de forma secuencial. La primera cadena en sintetizarse es la negativa y lo hace a partir del pgARN encapsidado que actúa como molde para la retrotranscripción y que es degradado por la función de ribonucleasa H (RNAasa H) que posee la polimerasa viral.

Posteriormente ocurre la síntesis de ADNccc y/o liberación de las partículas virales, durante este proceso la partícula del core que contiene el genoma de ADN ya formado puede entonces regresar al núcleo para la síntesis de nuevo ADNccc o bien las nucleocápsides maduras (con ADN parcialmente de doble cadena) se recubren en el retículo endoplasmático con una envoltura lípido-proteica característica, son transportadas al aparato de Golgi y desde allí son liberadas al espacio extracelular. Las proteínas de la envoltura tras ser sintetizadas en los ribosomas de los hepatocitos, inicialmente se insertan en la membrana del retículo endoplasmático para posteriormente formar en el lumen del retículo endoplasmático partículas S no infecciosas compuestas sólo por proteína S y lípidos (54).

La liberación de los viriones sucede por un mecanismo de excreción a través de las cisternas del retículo endoplásmico, lo que permite que se complete el proceso sin producir roturas en la membrana celular y sin originar la muerte de la célula.

Al mismo tiempo el genoma viral dirige la síntesis de HBsAg en cantidades muy superiores a las necesarias para generar envolturas. Este exceso de HBsAg es internalizado en el retículo endoplásmico en forma de agregados, que son excretados por el mismo mecanismo al exterior de la célula. Por su parte, la expresión de la región pre-C origina moléculas de HBeAg que presentan en su extremo aminoterminal un péptido señal para excreción y son vertidas al medio extracelular tras la separación del péptido por proteólisis. Así, la célula infectada

produce y libera, a un tiempo, viriones maduros, agregados de HBsAg y moléculas individuales de HBeAg (55).

II.4. Patogenia, respuesta inmune y persistencia viral

II.4.1. Inmunopatogénesis de la infección por VHB

La infección crónica por el VHB puede considerarse una enfermedad que se caracteriza por la incapacidad de inducir una respuesta inmune adaptativa eficaz y coordinada, lo que resulta en la persistencia viral, que puede ser una consecuencia de la capacidad del VHB para manipular respuestas inmunes innatas clave. Las respuestas inmunes innatas y adaptativas coordinadas son importantes para la eliminación del VHB del hígado. Es importante destacar que, en la mayoría de las circunstancias, el VHB es no citopático (no mata directamente a los hepatocitos); por lo tanto, la inflamación del hígado y la fibrosis que complican la infección crónica a largo plazo están predominantemente mediadas por la respuesta inmune del hospedero (56).

II.4.2. Respuesta inmune

La respuesta del hospedero al VHB tiene como base una compleja interacción de los sistemas celulares y humorales de la respuesta inmune innata y adaptativa. Después de la infección de los hepatocitos; comienza la respuesta inmune temprana no-específica que incluye el sistema de los interferones (IFN), células asesinas naturales (NK, por sus siglas del inglés *natural killer*) y la activación no específica de las células Kupffer. Una vez que la respuesta innata se pone en marcha, esta dirige cualitativa y cuantitativamente la respuesta inmune específica contra las proteínas virales, la que comienza a jugar un papel preponderante (57).

Las dos principales armas con que cuenta el sistema inmune son la respuesta inmune humoral, dada por la producción de Ac por los linfocitos B y la respuesta inmune celular compuesta por varias subpoblaciones celulares de linfocitos T.

Una respuesta de linfocitos T vigorosa y dirigida a múltiples epítomos virales contenidos en el HBsAg, HBcAg y la ADN polimerasa, garantizan una rápida

recuperación de la infección, comportándose como uno de los principales efectores antivirales. Los linfocitos T cooperadores (Th, por sus siglas del inglés, *helper T lymphocytes*), generalmente CD4, secretan IFN gamma (IFNg), IL2 y factor de necrosis tumoral, que inducen una respuesta celular (Th1) capaz de eliminar al virus. Los linfocitos T CD8 además de eliminar físicamente las células infectadas producen varias citocinas, que refuerzan la respuesta y dejan una resistencia al virus en las células adyacentes a la infección. Los virus que circulan en sangre son susceptibles a los mecanismos efectores de los Ac (58).

Las respuestas mediadas por células T CD4 + y CD8 + específicas de HBV periféricas se vuelven detectables con el aumento exponencial en la replicación de HBV. En el hígado, hay una falta de infiltración celular detectable de células inmunes, lo que sugiere un proceso de eliminación no citolítica (sin muerte directa de los hepatocitos infectados) del VHB, que implica principalmente la inhibición de la replicación del VHB mediada por citocinas a través de IFNg y TNF, que son secretadas por las células T CD8 + específicas de virus (59). La eliminación de los hepatocitos infectados y la prevención de la diseminación intrahepática probablemente requieran una combinación de mecanismos citolíticos y no citolíticos (60). Por lo tanto, durante la hepatitis B de resolución aguda, hay una respuesta inmune adaptativa robusta y coordinada con células T CD8 + específicas de virus que median el aclaramiento de las células infectadas, las células B secretan anticuerpos neutralizantes contra HBsAg (anti-HBs) que bloquean la infección de nuevas células y las células T CD4 + que apoyan la eliminación viral efectiva (61).

Es importante destacar que la hepatitis B aguda con recuperación clínica completa generalmente no ocurre cuando la infección se adquiere perinatalmente y en la primera infancia debido a la inmadurez del sistema inmune, que puede conducir a una infección crónica. En el curso crónico de la infección, la respuesta de células T CD4 resulta menos potente (62).

II.4.3. Persistencia viral: Mecanismos que inducen el desarrollo de Hepatitis crónica

La infección crónica por el VHB ha sido atribuida a múltiples causas dependientes del virus y el hospedero; tales como (58):

- Una presentación de antígenos deficiente por los hepatocitos, ya que no expresan moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) clase I y II, ni moléculas coestimuladoras, excepto durante la inflamación.
- La inducción de tolerancia neonatal al VHB en los pacientes infectados al nacimiento
- El VHB puede infectar células del sistema inmune (linfocitos, monocitos) y sitios inmunoprivilegiados
- Durante la infección se producen mutantes de escape que evaden la respuesta inmune celular y humoral

Además, se han demostrado respuestas supresoras impulsadas por virus, que incluyen: bloqueo del reclutamiento de células asesinas naturales (NK), células T NK y macrófagos, disminución de la secreción de citocinas (IFN γ), factor de necrosis tumoral (TNF), IL-6, IL-8 e IL-1 β) de las células de Kupffer³⁸; y bloqueo de la proteína del gen I inducible por ácido retinoico (RIG-I; también conocida como DDX58) y señalización de los receptores tipo Toll (TLR, de las siglas en inglés), dentro del hepatocito (63, 64).

Cantidades excesivas de partículas subvirales que contienen HBsAg pueden actuar como un señuelo para la inmunidad humoral específica de VHB y se ha demostrado que promueven un estado de anergia de células T específicas de virus (agotamiento desencadenado por la activación constante de vías de señalización de receptor de células T específicas de antígeno) y supresión. Las partículas subvirales también pueden modular negativamente las vías de señalización inmune innatas, incluido el factor nuclear κ B (NF- κ B) y la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), suprimiendo las citocinas inflamatorias y la transcripción de genes estimulada por interferón normalmente regulada por la señalización de los TLR (59). Además, la proteína HBx multifuncional puede inhibir la degradación de las proteínas virales

basada en el proteosoma, reduciendo así la presentación del antígeno del VHB y disminuyendo la respuesta antiviral del huésped. Este mecanismo posiblemente contribuyen al establecimiento y / o mantenimiento de la persistencia viral, mientras que la expresión de la proteína polimerasa del VHB suprime la producción de la proteína de respuesta primaria de diferenciación mieloide MYD88, que es crucial para la señalización de TLR (65, 66).

Las proteínas precore o HBeAg pueden generar tolerancia viral regulando negativamente la expresión de TLR2 en hepatocitos, células de Kupffer y monocitos periféricos de pacientes durante la enfermedad positiva para HBeAg (67) y regulando negativamente las moléculas coestimuladoras CD28 en linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos de HBV y CD86 en monocitos de sangre periférica y células de Kupffer en el hígado (68). En particular, en la infección crónica por el VHB, la frecuencia y la función de las células T específicas del VHB tanto periféricas como intrahepáticas son inversamente proporcionales al nivel de ADN circulante del VHB (69). Además, estas respuestas de células T reducidas se acoplan a la presencia sostenida de altos niveles de antígenos virales, por lo tanto, conducen al agotamiento progresivo y la disfunción de las células T específicas de VHB (70).

II.5. Diagnóstico virológico

Para poder detectar, diagnosticar y luego tratar con precisión a los pacientes infectados con el VHB, es necesario comprender las pruebas de diagnóstico actuales, las cuales pueden dividirse en pruebas que detectan marcadores serológicos de la infección y pruebas que detectan marcadores moleculares (71).

II.5.1. Diagnóstico serológico

Los diferentes antígenos y anticuerpos detectables en el suero de los individuos infectados por el VHB, constituyen los marcadores serológicos. Dado que la infección por este virus puede ser subclínica y existen portadores asintomáticos, la determinación de estos marcadores es la clave para el diagnóstico. El estudio de la presencia de los marcadores es necesario para determinar la etapa de la infección y evaluar la infectividad del paciente (72, 73).

Durante la infección por VHB se detectan cuatro sistemas de antígenos-anticuerpos: HBsAg / anti-HBsAg; antígenos pre-S y sus anticuerpos; HBcAg / anti-HBcAg y HBeAg / anti-HBeAg, sin embargo, en los sistemas comerciales disponibles, empleados rutinariamente para el diagnóstico, se evalúan HBsAg / anti-HBsAg; HBcAg / anti-HBcAg y HBeAg / anti-HBeAg. En el Anexo 1 se muestran los marcadores serológicos empleados en el diagnóstico de la infección por el VHB (74, 75).

II.5.2. Diagnóstico molecular: Cuantificación del ADN del VHB

La detección cualitativa o cuantitativa del ADN del VHB constituye el marcador molecular de diagnóstico del VHB por excelencia. Su positividad en suero indica replicación viral activa y se detecta con técnicas de hibridación, ADN ramificado, Reacción en cadena de la polimerasa (RCP) (15) y amplificación mediada por transcripción (TMA, de las siglas en inglés Transcription Mediated Amplification) (76).

Los métodos precisos para detectar y cuantificar el ADN del VHB son esenciales para diagnosticar infecciones agudas y crónicas, guiar decisiones de tratamiento, evaluar la respuesta al tratamiento y determinar el riesgo de complicaciones relacionadas con el VHB. Históricamente, se utilizaban ensayos de hibridación para estimar los niveles de ADN del VHB en muestras de sangre, pero su nivel de sensibilidad era subóptimo. Los ensayos basados en amplificación, como la RCP, detectan el ADN del VHB con mayor especificidad (99%) y sensibilidad (95%) y límites de cuantificación de hasta 10 UI/mL (18).

La OMS estableció el empleo de estándares internacionales para el ADN del VHB (EI) para la calibración de reactivos y equipos de referencia utilizados en técnicas de amplificación de ácidos nucleicos del VHB. El empleo de estos EI permitió la comparación del ADN del VHB entre diferentes laboratorios y ensayos. Gracias a lo cual, en la actualidad existen varios ensayos comerciales aprobados para la cuantificación del ADN del VHB (Tabla II.2). Sin embargo, el alto costo y la necesidad de equipos especializados limitan la accesibilidad de estos ensayos en entornos con recursos limitados (72).

Tabla II.1. Ensayos comerciales para la cuantificación del ADN del VHB.

Ensayo	Técnica de amplificación y detección	Límite inferior de cuantificación.
Cobas AmpliPrep/ Cobas TaqMan HBV test, versión 2.0	RCP tiempo real	20 UI/mL
Abbott Real-Time HBV Assay	RCP tiempo real	10 UI/mL
VERSANT HBV DNA 1.0 Assay (kPCR)	RCP tiempo real	64 UI/mL
Artus HBV QS-RG Kit	RCP tiempo real	10 UI/mL
Aptima HBV Quant Assay	TMA	10 UI/mL

* TMA; de las siglas en inglés Transcription Mediated Amplification. RCP: reacción en cadena de la polimerasa.

Durante la infección aguda por VHB, el ADN del VHB es el único marcador durante el período de ventana de la infección, lo cual es de elevada importancia para el cribado de sangre y órganos de donantes (77, 78). El uso de pruebas de ácido nucleico sensibles permite el diagnóstico temprano de la infección, reduciendo el tiempo de la infección por VHB después de la exposición de un promedio de aproximadamente 32 días (tiempo para la detección del HBsAg) a 15 días (ADN-VHB detectado) (79).

Además, las pruebas de ADN del VHB pueden confirmar la viremia en pacientes con infección crónica pero con mutaciones del gen S (que codifica el HBsAg), lo cual afecta la precisión diagnóstica de los ensayos serológicos estándares (es decir, mutantes de escape de diagnóstico) (80).

La cuantificación del ADN del VHB constituye un criterio imprescindible para instaurar y monitorear el tratamiento de los pacientes con infección crónica por VHB. Las pautas actuales sugieren la terapia antiviral para pacientes con niveles elevados de ALT y niveles de ADN del VHB de 2000 a 20,000 UI / ml, así como en aquellos con ADN del VHB en cualquier nivel detectable en presencia de cirrosis, ya que el ADN del VHB puede ser un marcador de replicación y es el principal objetivo de la terapia

antiviral (81, 82). Esta táctica se basa en datos que demuestran una fuerte relación entre los niveles altos de ADN del VHB y el desarrollo futuro de cirrosis y CHC (83).

La supresión del ADN del VHB a un nivel indetectable en las pruebas se asocia con un riesgo reducido de cirrosis, CHC y descompensación (84). Los pacientes que reciben tratamiento con análogos de nucleósidos (ANs) deben someterse a pruebas de ADN del VHB para evaluar la respuesta al tratamiento y guiar el tratamiento. La imposibilidad de suprimir el ADN del VHB para alcanzar niveles indetectables al sexto mes de tratamiento con telbivudina y lamivudina o al cabo de 12 meses de tratamiento con adefovir (todos estos fármacos tienen una barrera de resistencia baja) se asocia con un mayor riesgo de resistencia terapéutica. Por lo tanto, generalmente se recomienda el uso de un agente más potente al que el virus no es resistente (81, 82). El nivel de ADN del VHB inicial o durante el tratamiento también predice la respuesta a la terapia con peginterferón (85, 86).

II.5.3. Nuevos marcadores en el diagnóstico del VHB

El ADN circular covalentemente cerrado (ADNccc) constituye un molde transcripcional para el VHB. Durante la infección por el VHB, este se acumula en el núcleo celular de los hepatocitos, actuando como molde para la transcripción de los genes virales. Considerando la larga vida media de los hepatocitos, el aclaramiento de los reservorios de ADNccc de las células infectadas parece ser precisamente el factor limitante de la eliminación del VHB, ya que éstos persisten a pesar de las reducciones experimentadas en los niveles séricos de ADN viral, como la provocada por el tratamiento, y parecen ser los responsables de la replicación viral tras el final del mismo (87, 88).

Dado que el ADN del VHB se suprime a niveles bajos en la mayoría de los pacientes en terapia con ANs, el nivel de ADN del VHB no refleja con precisión los niveles de producción de ADNccc, ARN o antígeno viral en el hígado de los pacientes tratados. Otros grupos han estudiado el papel del ARN del VHB como posible biomarcador (89). Dado que el ARNm existe en un estado inestable en el suero, se cree que la mayor parte del ARN del VHB que se encuentra en el suero es ARN pregenómico. Estudios anteriores han sugerido que la medición del ARN del VHB puede ser útil

para predecir la seroconversión de HBeAg en pacientes en terapia con NA y merece una evaluación adicional (90).

Por otra parte, el antígeno relacionado con el núcleo de la hepatitis B (HBcrAg) es un nuevo indicador que mide una secuencia de aminoácidos común al HBeAg y al antígeno del núcleo de la hepatitis B (HBcAg), así como una supuesta proteína precorre de 22 kDa. Dado que la positividad de HBcrAg se correlaciona con los niveles de ADN del VHB intrahepático y ARN pregenómico (ARNpg) entre los pacientes en tratamiento con ANs, el HBcrAg puede ser un buen marcador sérico de la actividad transcripcional activa del ADNccc del hígado (91), cuanto más alto sea el nivel de HBcrAg antes de interrumpir el tratamiento con ANs, mayor será el riesgo de reactivación de la hepatitis, lo que refleja un posible papel del HBcrAg en la replicación viral residual durante la terapia con ANs (92, 93).

II.6. Manifestaciones clínicas e historia natural de la enfermedad

Las manifestaciones clínicas del VHB tienen un amplio rango de presentaciones, dependiendo de factores virales y del hospedero: subtipo del virus, características genéticas del huésped, estado inmunológico en el momento de la infección, carga viral, vía de entrada del inóculo entre otros (94). El espectro de manifestaciones clínicas, va desde el estado de portador asintomático hasta la hepatitis crónica, cirrosis y CHC. Cerca de un 90-95% de los adultos infectados se recuperan de la infección, pero existen individuos que se mantienen infectados persistentemente (95).

II.6.1. Hepatitis B aguda

El período de incubación de la hepatitis B aguda es de 1 a 4 meses tras la infección. La presentación clínica varía, pudiendo manifestarse como una infección asintomática en dos tercios de los pacientes, una hepatitis icterica y muy raramente ocurre un fallo hepático fulminante (96). La presentación de los síntomas y el progreso de la enfermedad dependen de la edad a la que se adquiere la infección (97). El cuadro clínico de la enfermedad se caracteriza por presencia de fiebre, artralgias y erupciones que pueden ocurrir en el período prodrómico, seguido de

síntomas inespecíficos, anorexia, náuseas, ictericia y malestar en el cuadrante superior derecho. Los síntomas clínicos coinciden con las alteraciones bioquímicas. El diagnóstico bioquímico de la hepatitis B aguda se caracteriza por elevación de la concentración de alanina aminotransferasa (ALT) y bilirrubina en suero. Los valores de ALT en la hepatitis B aguda son normalmente superiores a 500 UI/ml, y mayores que los niveles de AST (aspartato aminotransferasa). El fallo hepático fulminante es la complicación más grave de la hepatitis B aguda y ocurre en <0,5% de los pacientes (96, 98).

II.6.2. Hepatitis B crónica

La hepatitis B aguda puede evolucionar a hepatitis crónica (HC) con tasas muy variables dependiendo de la edad en el momento de la infección y de la vía de transmisión (99). La mayoría de los casos de hepatitis B crónica (HBC) ocurre en poblaciones endémicas como resultado de la transmisión perinatal y horizontal en etapas tempranas de la vida (96).

El HBsAg aparece en el suero a las 2-10 semanas tras la exposición a VHB y normalmente desaparece a los 4-6 meses. La persistencia del HBsAg tras 6 meses se usa para definir la transición a hepatitis crónica. No todos los pacientes con infección crónica por VHB tienen hepatitis crónica (97).

La nueva nomenclatura para los estados crónicos de VHB se basa en dos características claves de la cronicidad: infección y hepatitis. Los términos previamente utilizados para las fases de la infección crónica por el VHB eran; fase de inmunotolerancia, fase de aclaramiento inmune o inmunoreactiva, fase de portador inactivo y fase de escape inmune o hepatitis crónica. Estos han sido reemplazados por los términos Infección crónica por VHB HBeAg positivo, Hepatitis B crónica con HBeAg positivo, Infección crónica con HBeAg negativo y Hepatitis B crónica con HBeAg negativo, respectivamente. Cada una de las fases de la hepatitis B crónica se asocia con unos patrones característicos de ALT, niveles de ADN del VHB, estado del HBsAg, histología hepática y respuesta a la terapia antiviral (Tabla II.1). Las distintas fases de la infección no son esenciales ni estáticas y la transición entre las distintas fases es dinámica (81).

Tabla II.2. Características serológicas y clínicas de las distintas fases de la hepatitis B crónica. Adaptada de EASL 2017 (81).

	HBeAg positivo		HBeAg negativo	
	IC	HC	IC	HC
Nomenclatura antigua	Inmunotolerancia	Inmunoreactiva	Portador inactivo	Hepatitis Crónica
HBsAg	alto	alto/ intermedio	bajo	intermedio
HBeAg	positivo	positivo	negativo	negativo
Carga viral	$>10^7$ UI/mL	10^4 - 10^6 UI/mL	<2000 UI/mL	>2000 UI/mL
ALT	normal	elevada	normal	elevada
Daño hepático	no / escaso	leve / severo	no	leve / severo

*IC: Infección crónica, HC: Hepatitis crónica.

En aquellas fases donde puede ocurrir daño hepático, existe una probabilidad elevada de progresión a cirrosis y CHC (100).

II.6.3. Infección oculta por VHB

La infección oculta se caracteriza por la ausencia de antígeno de superficie en suero (HBsAg negativo) y la presencia de anti-HBc, con o sin anticuerpos detectables frente al HBsAg. La fase se define como la presencia de ADN detectable en un paciente con HBsAg no cuantificable. En algunos casos esto se debe a la presencia de un antígeno de superficie modificado que no se detecta con los métodos comerciales. Sin embargo, en la mayoría de los casos se debe a la fuerte supresión de la expresión viral. La mayoría de estos pacientes tienen una cantidad muy pequeña de ADN de VHB en suero. El aclaramiento del HBsAg previo a la aparición de cirrosis se asocia a un mínimo riesgo de progresión de la enfermedad (cirrosis, descompensación hepática o CHC) y a una mejor supervivencia. Sin embargo, si la cirrosis se desarrolla antes de desaparecer el HBsAg del suero, el riesgo de CHC persiste (81, 101).

II.6.4. Complicaciones de la hepatitis B crónica

La progresión de la hepatitis B crónica a enfermedades hepáticas graves, como el carcinoma hepatocelular, está determinada por las características genéticas del huésped, así como factores virales y ambientales (102). Las principales

complicaciones de la hepatitis B crónica (HBC) son la cirrosis, la descompensación hepática y el hepatocarcinoma (103) Las manifestaciones extrahepáticas también pueden ocurrir. Entre el 15% y el 40% de los individuos con HBC van a desarrollar secuelas hepáticas a lo largo de su vida, con un mayor riesgo en hombres. Se ha visto que niveles de ADN de VHB de >2000 UI/ml suponen un riesgo para la progresión clínica de la enfermedad a cirrosis y a carcinoma hepatocelular (CHC) (104, 105).

II.7. Epidemiología

II.7.1. Prevalencia mundial

La distribución de la infección crónica por el VHB varía sustancialmente en el mundo. La prevalencia de la infección crónica por el VHB es más alta en el Pacífico occidental (6,2% o 115 millones de personas tienen una infección crónica por el VHB) y en las regiones africanas (6,1% o 60 millones de personas). La región del Mediterráneo Oriental tiene una prevalencia bastante alta (3,3% o 21 millones de individuos); La prevalencia es menor en las regiones de Asia sudoriental (2,0% o 39 millones de personas) y europeas (1,6% o 15 millones de personas) y es más baja en las regiones de América del Norte y del Sur (0,7% o 7 millones de personas) (106). Estos datos de prevalencia son fundamentales para estimar la carga de enfermedad del VHB y para orientar las políticas regionales de salud (107).

La epidemiología de la infección por el VHB ha evolucionado sustancialmente desde la década de 1980 debido a la vacuna contra la hepatitis B ampliamente utilizada y los cambios demográficos como resultado de la migración de la población (108). Sin embargo, a pesar del advenimiento de vacunas eficaces, así como de otras medidas de control de enfermedades, incluida la terapia antiviral, la infección por VHB sigue siendo un grave problema de salud global. La OMS estimó en 2015 que 257 millones de personas (3,5% de la población mundial) están infectadas crónicamente con HBV (106), la mayoría de las cuales nacieron antes del uso generalizado de la vacuna. El número de niños infectados ha disminuido desde la introducción del programa ampliado de vacunación promovido por la OMS; en 2015, solo aproximadamente el 1,3% de los niños <5 años desarrollaron infección crónica en todo el mundo. La

región africana de la OMS todavía tiene una alta prevalencia de infección crónica por hepatitis B en niños, debido a la baja cobertura de la vacunación contra el VHB y la alta carga viral (y, por lo tanto, el aumento de la infectividad) en mujeres embarazadas (106, 109, 110).

II.7.2. Epidemiología molecular

Los genotipos del VHB presentan una distribución geográfica característica. Algunos de ellos son ubicuos, como el genotipo A, que está presente en el noroeste de Europa, Norte América y África Central, y el genotipo D, que pese a estar presente en todo el mundo es más prevalente en el área Mediterránea, Este Medio y sur de Asia (111). Los genotipos B y C se encuentran solo en Asia, el genotipo E en África subsahariana y el F en América del Sur y América Central. El genotipo G se ha encontrado en Francia y Estados Unidos, mientras que el genotipo H parece encontrarse solamente en América Latina, principalmente en México (112, 113). Además, recientemente, fueron reportados dos nuevos genotipos, I y J, encontrados en pacientes de China, India, Vietnam y Japón (114). La caracterización de diferentes genotipos de VHB en poblaciones determinadas puede tener importancia epidemiológica, ya que el genotipo de VHB generalmente refleja su país de origen y, por lo tanto, puede usarse para rastrear patrones de transmisión; como tal, el genotipo del VHB de un inmigrante generalmente es consistente con su país de origen (115).

En Cuba, la variante genotípica que predomina es la A, a diferencia de otros países de la región (116).

II.7.3. Transmisión

Se han descrito varias vías de transmisión del VHB, las cuales incluyen el contacto con fluidos corporales contaminados, siendo la de mayor importancia el contacto con la sangre y otros hemoderivados. La transmisión del VHB puede ocurrir tanto por vía vertical (117), es decir de madres a hijos durante el parto, como de forma horizontal. La vía parenteral también está involucrada, por compartir agujas u otros objetos punzantes como en los drogadictos, el uso de piercing y tatuajes (118). Además,

existen grupos poblacionales que tienen riesgo laboral de exposición al VHB. En estos casos la transmisión puede ocurrir por una inoculación accidental con pequeñas cantidades de sangre u otros fluidos contaminados, durante los procedimientos médicos o paramédicos (119). Hoy en día, los contagios por transfusiones sanguíneas o trasplantes de órganos son extremadamente raros, ya que ambos donantes siempre son sometidos a los análisis serológicos pertinentes antes de realizar estos procedimientos (120). Por otro lado, actualmente la mayoría de los contagios con el VHB son por vía sexual (121, 122).

II.7.4. Grupos de riesgo

A pesar de que el VHB puede afectar a todas las poblaciones existen personas que debido a su entorno o modo de vida tienen mayores probabilidades de ponerse en contacto con el mismo, estos son los conocidos como los grupos de riesgo. Este grupo está conformado por las personas que no están vacunadas, los hombres que tiene sexo con otros hombres, los heterosexuales que practican la poligamia(123). Se ha observado que los hombres que tienen sexo con hombres tienen una elevada prevalencia de los marcadores del VHB, con respecto al resto de la población (124). Aunque la transmisión entre personas heterosexuales es también importante, ya que la proporción de transmisión entre personas no inmunizadas alcanza un 40%. Otro grupo de riesgo importante son los trabajadores de la salud, esto se debe fundamentalmente a que se encuentran expuestos a los fluidos corporales de los pacientes infectados. Otros grupos, sumamente importante, son los pacientes hemodializados y hemofílicos (125, 126). Por último pero no menos importante, los hijos de madres positivas al HBsAg, los cuales tienen una elevada probabilidad no solo de ser infectados con el virus, sino de desarrollar hepatitis crónica y CHC (119, 127).

II.8. Tratamiento y prevención

II.8.1. Terapia antiviral y criterio de tratamiento

El objetivo final del tratamiento a largo plazo de la hepatitis B crónica es mejorar la supervivencia evitando la progresión a cirrosis e impidiendo el desarrollo de

descompensación hepática, CHC y muerte. Este objetivo se consigue suprimiendo la replicación viral de forma mantenida. La infección por el VHB no puede ser erradicada por la persistencia de ADN circular covalentemente cerrado (ADNccc) en el núcleo de los hepatocitos. Otros objetivos adicionales de la terapia antiviral son prevenir la transmisión madre-hijo, la reactivación de la hepatitis B y prevenir y tratar las manifestaciones extrahepáticas asociadas a VHB (56).

Actualmente, existen dos opciones principales de tratamiento para los pacientes con hepatitis B: tratamiento con ANs o con interferón alfa (IFN α), actualmente pegilado (Peg IFN α). Los ANs aprobados incluyen principalmente la lamivudina (LAM), adefovir dipivoxil (ADV), entecavir (ETV), telbivudine (TBV), tenofovir disoproxil fumarato (TDF) y tenofovir alafenamida (TAF). Pueden clasificarse en los que tienen una baja barrera a la resistencia al VHB (LAM, ADV, TBV) y los que presentan una alta barrera a la resistencia (ETV, TDF, TAF). La principal ventaja de los tratamientos con ANs de alta barrera a la resistencia, es su alta eficacia antiviral a largo plazo que lleva a una carga viral indetectable en la mayoría de pacientes y su buen perfil de seguridad. Los ANs se pueden usar de forma segura en todos los pacientes y son la única alternativa de tratamiento en pacientes con enfermedad hepática descompensada, trasplantados de hígado, pacientes con manifestaciones extrahepáticas, hepatitis B aguda o exacerbación severa de la hepatitis crónica. También son la única opción para prevenir la reactivación del virus en pacientes inmunodeprimidos y para prevenir la transmisión en pacientes con alta viremia. La alta barrera a la resistencia junto a otros factores ya mencionados previamente, hace que el Entecavir y el Tenofovir sean las mejores opciones para tratar la hepatitis B crónica (81). Concretamente, la resistencia primaria al Entecavir se detecta solamente en el 1% de los pacientes (128).

La indicación de tratamiento es la misma para los pacientes HBeAg positivo y HBeAg negativo, y debe basarse en la combinación de 3 criterios:

- Valores de ALT.
- Niveles de ADN-VHB.
- Lesión hepática valorada por biopsia hepática y/o elastometría.

Las indicaciones de tratamiento también deben tener en cuenta la edad del paciente, el estado de salud, el riesgo de transmisión y la historia familiar de CHC, cirrosis y manifestaciones extrahepáticas (81, 82).

II.8.2. Prevención y control de la infección por el VHB

La prevención y control de la infección crónica del VHB se ha convertido en una alta prioridad internacionalmente. Depende de una adecuada educación a la población sobre los patrones y vías de transmisión, fundamentalmente en los grupos de mayor riesgo (129).

Desde principios de 1980 se desarrolló eficientemente una vacuna contra el VHB, la cual puede prevenir la infección con una respuesta adecuada en el 95% de las personas vacunadas (130). Los objetivos de eliminación de la OMS incluyen una cobertura completa del 90% de la vacunación contra el VHB, una reducción de la prevalencia de HBsAg en niños menores de 5 años al 0,1% y, finalmente, una mejora en las tasas de tratamiento al 80% para 2030 (131).

Actualmente las vacunas empleadas en la inmunoprofilaxis del VHB son vacunas obtenidas mediante tecnología del ADN recombinante. Entre las más destacadas se encuentran ENGERIX®-B, producida por la GlaxoSmithKline que es una farmacéutica británica (132) y Twinrix que es producida por una farmacéutica de EE.UU (133).

En nuestro país se produce la vacuna Heberbiovac HB, vacuna de subunidades virales no infecciosas, a partir del HBsAg (134), la cual se emplea en el protocolo de inmunización nacional. El esquema de vacunación recomendado con la vacuna Heberbiovac HB es de tres dosis, pero se ha observado que se puede lograr una protección eficiente al administrar dos dosis de esta vacuna (135).

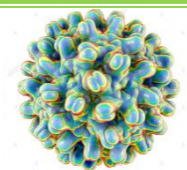
Para reducir la transmisión de madres a hijos la OMS recomienda la administración tanto de la vacuna como de la inmunoglobulina contra el VHB (IgHB), en las primeras 24 horas del nacimiento; lo cual reduce la transmisión del virus a los niños entre un 90% y un 98%. Los niños que sus madres son positivas al HBeAg, tienen un riesgo elevado de desarrollar hepatitis crónica, incluso después de ser vacunados, y aunque

la administración de la IgHB a los recién nacidos de madres HBeAg negativas no le reduce la probabilidad de desarrollar una hepatitis crónica, puede prevenir el fallo hepático infantil (136).

La hepatitis B se considera una infección de transmisión sexual (ITS) por lo que otro método para su prevención y control es el uso de preservativos durante las relaciones sexuales, así como el mantenimiento de relaciones estables, seguras y duraderas o la abstinencia sexual (122). Además, dado que el VHB también se transmite por vía parenteral la OMS recomienda la correcta esterilización de agujas, en los sitios donde se realizan tatuajes o se colocan piercing; así como evitar el consumo de drogas intravenosas (137).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS



III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Diseño y universo del estudio

Se realizó un estudio observacional con componente analítico, para evaluar los indicadores de desempeño de dos sistemas de RCP-TR comercializados por el CIE. Tanto el estuche SUMASIGNAL VHB (un paso) como el estuche *Hepatitis B Viral DNA Quantitative Fluorescence Diagnostic Kit (PCR- Fluorescence Probing)* permiten la detección y cuantificación del ADN-VHB para el diagnóstico *in vitro*.

Para la evaluación de ambos estuches se emplearon 156 muestras de suero, caracterizadas previamente y conservadas a -80°C, en el Laboratorio Nacional de Referencia de Hepatitis Virales del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (LNRHV-IPK) y en el Instituto de Gastroenterología. Las muestras se recibieron en dichos laboratorios desde diferentes hospitales y regiones del país durante el periodo de 2016-2018, para el diagnóstico del VHB y otras infecciones de etiología viral.

Para la aplicación clínica del ensayo SUMASIGNAL VHB (un paso), se estudiaron 50 muestras de suero recibidas en el LNRHV-IPK entre enero y octubre de 2020, y que fueron enviadas al laboratorio desde diferentes hospitales y regiones del país para la determinación de la carga viral del VHB. Estas 50 muestras correspondieron a pacientes con hepatitis B crónica en estudio (25 muestras), mujeres embarazadas (4 muestras), hijos de madres positivas al HBsAg (5 muestras), pacientes hemodializados (12 muestras) y coinfectados con el Virus de la Hepatitis C (VHC) y/o el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) (4 muestras).

Las muestras de suero y las variables de estudio se clasificaron siguiendo un procedimiento de operacionalización estándar que se describe en la Tabla III.1.

Tabla III.1. Operacionalización de las variables.

Variables	Tipo	Escala	Descripción
Especificidad clínica	Cuantitativa continua	1-100	Proporción de muestras negativas (no reactivas) correctamente identificadas por la prueba empleada. Se expresa como el porcentaje de negatividad real.
Especificidad analítica (reactividad cruzada)	Cuantitativa continua	1-100	Capacidad de un método analítico para medir exacta y específicamente el analito sin interferencias. Capacidad de la prueba para detectar solamente la presencia del VHB, para lo cual está diseñada. Se expresa como porcentaje de especificidad.
Carga viral de VHB por el estuche Hepatitis B Viral DNA Quantitative Fluorescence Diagnostic Kit (PCR-Fluorescence Probing) del CIE	Cuantitativa continua	Valor numérico en UI/mL	Valor de la carga viral determinado por el estuche estuche Hepatitis B Viral DNA Quantitative Fluorescence Diagnostic Kit (PCR-Fluorescence Probing) del CIE , según la referencia de estándares de concentración conocida.
Carga viral de VHB por el estuche SUMASIGNAL VHB (un paso) del CIE	Cuantitativa continua	Valor numérico en UI/mL	Valor de la carga viral determinado por el estuche SUMASIGNAL VHB (un paso) del CIE , según la referencia de estándares de concentración conocida.
Coefficiente de correlación de Pearson (r)	Cuantitativa continua	No hay asociación = 0 Negativa, entre 0 y - 1 Positiva, entre 0 y 1	Es una prueba que mide la relación estadística entre dos variables continuas. Se expresa como un valor numérico absoluto entre -1 y +1.
Carga viral de VHB por el estuche comercial Artus HBV RG PCR kit de Qiagen, Alemania.	Cuantitativa continua	Valor numérico en UI/mL	Valor de la carga viral determinado por el estuche Artus HBV RG PCR kit de Qiagen, Alemania , según la referencia de estándares de concentración conocida.
Coefficiente de correlación y concordancia de Lin (CCC)	Cuantitativa continua	Casi perfecta > 0.99 Sustancial 0.95 - 0.99 Moderada 0.90 – 0.95 Pobre < 0.90	Es una prueba que mide la concordancia estadística entre dos métodos o instrumentos que miden variables continuas. Se expresa como un valor numérico absoluto entre -1 y +1.

III.2. Técnicas y procedimientos

III.2.1. Muestras clínicas

Para la evaluación se conformaron dos paneles de sueros bien caracterizados por sistemas comerciales, que se conservaron en condiciones adecuadas (-80°C) hasta su utilización. Un panel estuvo constituido por 80 muestras para la evaluación del estuche SUMASIGNAL VHB (un paso) (Tabla III.2) y otro por 76 muestras para evaluar el estuche *Hepatitis B Viral DNA Quantitative Fluorescence Diagnostic Kit (PCR- Fluorescence Probing)* (Tabla III.3).

Tabla III.2. Panel de sueros empleados en la evaluación del estuche SUMASIGNAL VHB (un paso).

Clasificación de las muestras		Número de muestras	Observaciones
Positivas	• ADN-VHB cuantificable • HBsAg positivo	50	Carga viral > 377.47 UI/mL*
Negativas	• No detección del ADN-VHB • HBsAg negativo	20	-
	• No detección del ADN-VHB • HBsAg negativo • Positivas a otros agentes patógenos	10	Virus de la Hepatitis A (2) Virus de la Hepatitis C (2) Virus de las Hepatitis E (1) Virus de la Inmunodeficiencia Humana (2) Citomegalovirus (2) Virus Dengue (1)
Subtotal de negativas		30	
Total		80	

Fuente: Bases de datos del LNRHV-IPK y Laboratorio del IGE. *Límite inferior de detección del estuche SUMASIGNAL VHB (un paso). **Agentes patógenos que pueden provocar cuadros clínicos similares al del VHB, coinfecciones o comparten las vías de transmisión.

Tabla III.3. Panel de sueros empleado en la evaluación del estuche *Hepatitis B Viral DNA Quantitative Fluorescence Diagnostic Kit (PCR- Fluorescence Probing)*.

Clasificación de las muestras		Número de muestras	Observaciones
Positivas	• ADN-VHB cuantificable • HBsAg positivo	40	Carga viral > 10 UI/mL*
Negativas	• No detección del ADN-VHB • HBsAg negativo	20	-
	• No detección del ADN-VHB • HBsAg negativo • Positivas a otros agentes patógenos	16	** Virus de la Hepatitis C (4) Virus de Epstein-Barr (1) Virus de la Inmunodeficiencia Humana (2) Citomegalovirus (4) Virus del Herpes Simple (4) <i>Trypanosoma cruzi</i> (1)
Subtotal de negativas		36	
Total		76	

Fuente: Bases de datos del LNRHV-IPK y Laboratorio del IGE.*Límite inferior de detección del estuche *Hepatitis B Viral DNA Quantitative Fluorescence Diagnostic Kit (PCR-Fluorescence Probing)*. **Agentes patógenos que pueden provocar cuadros clínicos similares al del VHB, coinfecciones o comparten las vías de transmisión.

Las 90 muestras positivas al ADN-VHB, seleccionadas para la evaluación de los estuches SUMASIGNAL VHB (un paso) y *Hepatitis B Viral DNA Quantitative Fluorescence Diagnostic Kit (PCR- Fluorescence Probing)*, se analizaron previamente por los estuches COBAS® TaqMan® HBV Test v2.0 (Roche Diagnostics, EE.UU), Artus RG HBV PCR kit (Qiagen, Alemania) y una RCP-TR normalizada y evaluada con anterioridad en el LNRHV-IPK (20). Dichas muestras abarcaron todo el rango lineal de cuantificación de los ensayos, desde 5.0E+02 a 5.0E+09 UI/mL y desde 20 UI / mL y 2.0E+09 UI / mL, respectivamente para cada uno de los ensayos evaluados.

III.2.2. Estándares Internacionales de la OMS

Para determinar la exactitud y linealidad de los ensayos evaluados, se emplearon dos estándares internacionales (EI), de la OMS para las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos del VHB. Dichos EI son producidos por el Instituto Nacional de Estándares Biológicos y Controles (NIBSC, del Inglés: *National Institute for Biological Standards and Controls*, Reino Unido), y fueron suministrados por el CIE para el proceso de evaluación externa.

Para evaluar la exactitud y linealidad del estuche SUMASIGNAL VHB (un paso) se utilizó el tercer EI de la OMS, NIBSC código 10/264. Este estándar es genotipo A2 serotipo adw2 y posee una concentración de 850 000 UI/mL ($\sim 5,93 \log_{10}$ UI/mL), cuando se reconstituye en 0.5 mL de agua libre de nucleasas (138). Por otra parte, para evaluar la exactitud y linealidad del estuche *HBV-PCR Probing*, se utilizó el cuarto EI de la OMS, NIBSC código 10/266. Este EI es genotipo A2 serotipo adw2, al igual que el anterior, y posee una concentración de 955 000 UI/mL cuando se diluye en 0,5 mL de agua libre de nucleasas (139).

III.3. Evaluación de los indicadores del desempeño

Se determinaron los indicadores del ensayo tales como especificidad clínica, especificidad analítica (reactividad cruzada), rango lineal o linealidad y exactitud, precisión intra-ensayo y comparación y concordancia con un ensayo de referencia (140).

Especificidad clínica o diagnóstica

Se determinó con el análisis de muestras negativas al AgHBs y al ADN-VHB. Se definió como la proporción de muestras negativas (ADN no detectable) correctamente identificadas por la prueba empleada. Se expresó como el porcentaje de negatividad en muestras donde el analito a determinar estuvo ausente.

Especificidad analítica o reactividad cruzada

Se determinó con el análisis de las muestras negativas al AgHBs y positivas a otros agentes infecciosos que pueden co-infectar junto al VHB o que poseen cuadros clínicos similares. Este análisis permitió evaluar la capacidad de la prueba para

detectar solamente el analito deseado, en este caso el ADN-VHB, sin que interfiriera, en su correcto desempeño, la presencia de otros agentes infecciosos en la muestra clínica.

Para evaluar la concordancia entre los resultados observados y los esperados se utilizaron tablas de contingencia.

III.3.1. Linealidad, exactitud y precisión

Se determinó utilizando el tercer y cuarto EI, para los ensayos SUMASIGNAL VHB (un paso) y *HBV-PCR Probing*, respectivamente de acuerdo a los siguientes procedimientos:

Para evaluar los indicadores de linealidad y exactitud del ensayo SUMASIGNAL VHB (un paso), se utilizó el tercer EI diluido en 0,250 mL de agua libre de nucleasas, para obtener una concentración de $1,70\text{E}+06$ UI/mL. Se realizaron diluciones seriadas en base 10 hasta 1:1000 con suero negativo, con 5 réplicas de cada una y se incluyó además el estándar puro. La precisión intra-ensayo se calculó con el EI en cuatro diluciones, desde $1,70\text{E}+06$ UI/mL hasta $1,70\text{E}+03$ UI/mL, para asegurar diferentes concentraciones de ADN, con 5 réplicas de cada una. Este experimento se realizó el mismo día.

Para determinar los indicadores de linealidad y exactitud del ensayo HBV-PCR Probing se utilizó el cuarto EI diluido en 0,5 mL de agua libre de ARNasas, para obtener una concentración de $9,55\text{E}+05$ UI/mL. Se realizaron diluciones seriadas, en base 10 hasta 1:1000 con suero negativo, con 5 réplicas de cada una. No se incluyó el estándar puro. La precisión se calculó con el EI en cuatro diluciones, UI/mL, con 5 réplicas de cada una. Al igual que con el ensayo SUMASIGNAL VHB (un paso), estos indicadores se evaluaron en un mismo día.

III.3.2. Estudio de comparación entre los ensayos de RCP-TR evaluados y un ensayo de referencia (*Artus HBV RG PCR Kit*)

Para validar los ensayos evaluados fue necesaria la comparación de los resultados con los obtenidos por un ensayo de referencia. En este caso se empleó el estuche comercial *Artus HBV RG PCR Kit* (Qiagen, Alemania), el cual es una prueba de RCP-

TR para la detección cuantitativa de ADN-VHB que cuenta con licencia y validación de la FDA (del Inglés, *Food and Drugs Administration Agency*) y la OMS para el diagnóstico *in vitro*.

Para el estudio de comparación se analizaron paralelamente, por el método evaluado y el de referencia, muestras positivas al ADN-VHB que abarcaron todo el rango lineal de cuantificación de los ensayos evaluados. Para ello se determinó la carga viral de 50 muestras positivas con el estuche SUMASIGNAL VHB (un paso) y 40 muestras positivas para *HBV-PCR Probing*. Los resultados obtenidos para las muestras analizadas por cada método se compararon con los del estuche de referencia *Artus HBV RG PCR Kit* (Qiagen, Alemania).

Para la comparación con el ensayo de referencia, la extracción del ADN-VHB se realizó utilizando el estuche *QIAamp DNA Blood Mini Kit* (Qiagen, Alemania) de forma manual, según instrucciones del fabricante. Para la cuantificación del ADN se utilizó el estuche *Artus HBV RG PCR Kit* (Qiagen, Alemania) según instrucciones del fabricante. El programa de la RCP-TR se configuró en el equipo Rotor Gene Q (Qiagen, Alemania) según la descripción del manual del estuche.

III.3.4. Extracción y cuantificación del ADN-VHB para la evaluación de los estuches comerciales

III.3.4.1. Ensayo SUMASIGNAL VHB (un paso)

III.3.4.1.1 Procedimiento técnico

El procedimiento técnico se realizó según las indicaciones de los fabricantes. Se trabajó en áreas separadas para la preparación de los reactivos, el procesamiento de las muestras y la amplificación y análisis de los resultados.

Preparación de los reactivos

En el área de preparación de los reactivos se colocaron los componentes del ensayo a temperatura ambiente (20 - 25 °C), para su uso posterior en la mezcla de RCP, lista para el uso. La misma se preparó a partir de la solución maestra de RCP a razón de 40 µL (38 µL/prueba) + la mezcla de enzimas polimerasas (2 µL/prueba) +

control interno (0,25 μ L/prueba). Se incluyeron en los cálculos los controles (negativo y positivo) y las referencias cuantitativas en UI/mL ($A=4.0E+07$, $B=4.0E+06$, $C=4.0E+05$, $D=4.0E+04$).

Procesamiento de las muestras clínicas

Los controles negativo y positivo, las referencias cuantitativas y las muestras se centrifugaron y procesaron en ese orden. Se aplicaron 5 μ L de la solución de lisis en cada tubo de RCP y posteriormente se añadieron 5 μ L del control negativo, el control positivo, las referencias cuantitativas (A-D) y el resto de las muestras, respectivamente. Luego se incubaron los tubos durante 10 minutos a temperatura ambiente (20 - 25 °C). Finalmente se adicionaron 40 μ L de la mezcla de RCP lista para el uso en cada tubo, se centrifugaron 30 segundos a 2000 rpm a temperatura ambiente, para eliminar burbujas y se transfirieron los tubos al área de amplificación y análisis.

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

Para la reacción de amplificación se empleó el programa que se describe en la Tabla III.4.

Se colocaron los tubos en el equipo de RCP (SLAN-96P, Shanghai Hongshi Medical Technology Co., Ltd, Shanghai, China) y se realizaron los pasos para su manipulación, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los controles, las referencias cuantitativas y las muestras se ubicaron en la posición correcta. Luego se seleccionaron los controles del ensayo (negativo y positivo) y se introdujeron los valores de concentración de las referencias cuantitativas en UI/mL ($A=4.0E+07$, $B=4.0E+06$, $C=4.0E+05$, $D=4.0E+04$).

Tabla III.4. Programa de la RCP-TR para realizar la amplificación de ADN-VHB mediante el ensayo SUMASIGNAL VHB (un paso).

Parámetros	Tiempo (hh:mm:ss)	Temperatura (°C)
Reacción de la enzima UNG	00: 02:00	50
Activación Taq polimerasa	00:02:00	94
Amplificación (45 ciclos)		
Desnaturalización	00:00:05	94
Hibridación, extensión y lectura de fluorescencia*	00:00:30	57
Enfriamiento	00:00: 10	25

Fuente: Instructivo del estuche SUMASIGNAL VHB (un paso) para equipo de RCP SLAN 96P.* Canal FAM para evaluar el ADN-VHB. Canal HEX o VIC para evaluar el control interno y la referencia pasiva ROX.

III.3.3.1.2. Control de calidad

Para determinar que los resultados de la prueba fueron válidos, se comprobó el cumplimiento de los requerimientos del control de calidad descritos por el fabricante:

- Control negativo: No se muestra un valor de Ct (valor de corte del umbral de fluorescencia, del Inglés: *Cut off threshold*); pero su control interno debe ser positivo ($Ct \leq 40$).
- Control positivo-VHB: Su concentración debe estar en el rango de 1,26E+05 a 1,26E+06 UI/mL.
- Referencias cuantitativas-VHB (A, B, C y D): Todas deben resultar positivas y el coeficiente de correlación de la curva estándar r debe ser $\geq 0,98$.

III.3.4.1.3. Límite de detección

El límite inferior de detección de la prueba es 377,47 UI/mL. El Ct de referencia para el control interno es 40.

III.3.4.1.4. Interpretación de los resultados

Para las muestras que son detectadas con valores entre 5,0E+02 y 5,0 E+09 UI/mL y la curva de amplificación tiene forma de “S”, los resultados de la prueba son confiables y pueden ser informados. Las muestras detectadas con valores $>5,0E+09$

UI/mL y la curva de amplificación tiene forma de “S”, se informa como “ $>5,0E+09$ UI/mL” (si se necesita una cuantificación precisa, se recomienda diluir la muestra y volver a evaluarla). Las muestras detectadas con valores $\geq 377,47$ UI/mL y < 500 UI/mL (entre el límite inferior de detección y el límite inferior de cuantificación), la curva de amplificación tiene forma de “S” y el control interno es positivo ($Ct \leq 40$), significa que la muestra tiene una carga viral muy baja. En este caso el resultado de la prueba se informa como “muestra positiva, no cuantificable”. Para las muestras detectadas con valores $< 377,47$ UI/mL, con control interno positivo ($Ct \leq 40$), se informa que el ADN-VHB está por debajo del límite inferior de detección de la prueba. Si el control interno es negativo ($Ct > 40$) o no se muestra un valor de Ct, el resultado es no válido y se debe repetir la prueba.

III.3.4.2 Aplicación del ensayo SUMASIGNAL VHB (un paso) a muestras clínicas

Para la aplicación del estuche diagnóstico SUMASIGNAL VHB (un paso) a muestras clínicas, se incluyeron 50 muestras de suero frescos para su diagnóstico virológico. Para estas muestras se realizaron todos los procedimientos de transporte, conservación, almacenamiento y extracción de ADN descritos anteriormente para la ejecución del ensayo de evaluación del estuche SUMASIGNAL VHB (un paso). Su aplicación se evaluó a ciegas y a la inversa, ya que los resultados obtenidos se confirmaron posteriormente contra la RCP-TR evaluada y normalizada del LNRHV-IPK, que emplea la plataforma LightCycler 1.5 de Roche (Roche Diagnostics, EE.UU).

III.3.4.3. Ensayo Hepatitis B Viral DNA Quantitative Fluorescence Diagnostic Kit (PCR- Fluorescence Probing)

III.3.4.3.1. Procedimiento técnico

El procedimiento técnico se realizó según las indicaciones de los fabricantes. Se trabajó en áreas separadas para la preparación de los reactivos, el procesamiento de las muestras y la amplificación y análisis de los resultados, al igual que para el ensayo SUMASIGNAL VHB (un paso).

Preparación de los reactivos

En el área de preparación de los reactivos se colocaron los componentes del ensayo a temperatura ambiente (20 - 25 °C), para su uso posterior. Todos los componentes del ensayo, soluciones de extracción y mezcla de RCP se prepararon teniendo en cuenta la cantidad de muestras a evaluar, los controles (negativo y positivo) y las referencias cuantitativas (A=5.0E+06, B=5.0E+05, C=5.0E+04, D=5.0E+03).

La Solución 2 de extracción de ADN se preparó a razón de 100 µL/prueba + (0,4 µL/prueba) de control interno. Los componentes se mezclaron por inversión, evitando la formación de burbujas. En esta área también se preparó la mezcla de RCP, este paso se realizó durante los 15 minutos de secado en el procesamiento de las muestras. La mezcla se preparó a partir del reactivo Mezcla de RCP (49 µL/prueba) + enzima (1 µL /prueba).

Procesamiento de las muestras clínicas

Los controles negativo y positivo, las referencias cuantitativas y las muestras se centrifugaron y procesaron en ese orden.

Se prepararon e identificaron correctamente los tubos de 1,5 mL estériles y se adicionaron 300 µL de Solución 1 de extracción de ADN en cada tubo. Luego se adicionaron, a los tubos identificados anteriormente, 200 µL de: control negativo, control positivo, referencias cuantitativas (A-D) y muestras respectivamente, se agitaron por 10 segundos (vórtex) y centrifugaron a 2000 rpm por no más de 10 segundos. Posteriormente se adicionaron 100 µL de la mezcla de la Solución 2 de extracción de ADN previamente preparada (en el área de preparación de los reactivos) a cada tubo. Se agitó por 10 segundos en vórtex y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos, luego se centrifugaron los tubos a 2000 rpm por no más de 10 segundos.

Se colocaron los tubos en un separador magnético por tres minutos y pasado este tiempo, se aspiró cuidadosamente la solución. Luego se adicionaron 600 µL de Solución 3 de extracción de ADN-VHB y 200 µL de Solución 4 de extracción de ADN en cada tubo, se agitaron los tubos durante 5 segundos (vórtex). Se centrifugaron 10 segundos a 2000 rpm y se colocaron nuevamente en el separador magnético por tres

minutos. Una vez aspirada y desechada la Solución 4, se centrifugaron los tubos durante 5 segundos a 2000 rpm y se aspiró nuevamente la solución residual, con cuidado de no arrastrar el material oscuro adherido a la pared del tubo.

Luego se adicionaron 50 µL de la mezcla de RCP en cada tubo y se diluyó el material oscuro del fondo con la mezcla, el cual se aspiró y descargó en un tubo de RCP de 0,2 mL. Luego se transfirieron al área de amplificación y análisis.

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

Para la reacción de amplificación se empleó el programa que se describe en la Tabla III.4.

Tabla III.4. Programa de la RCP-TR para realizar la amplificación del ADN-VHB del ensayo *Hepatitis B Viral DNA Quantitative Fluorescence Diagnostic Kit (PCR-Fluorescence Probing)*.

Parámetros	Tiempo (hh:mm:ss)	Temperatura (°C)
Reacción de la enzima UNG	00: 02:00	50
Activación Taq polimerasa	00:02:00	95
Amplificación (45 ciclos)		
Desnaturalización	00:00:15	95
Hibridación, extensión y lectura de fluorescencia*	00:00:30	58
Enfriamiento	00:00: 10	25

Fuente: Instructivo del estuche SUMASIGNAL VHB (un paso) para equipo de RCP SLAN 96P.* Canal FAM para evaluar el ADN-VHB. Canal HEX o VIC para evaluar el control interno y la referencia pasiva ROX.

Se colocaron los tubos en el equipo de RCP (SLAN-96P, Shanghai Hongshi Medical Technology Co., Ltd, Shanghai, China) y se realizaron los pasos para su manipulación siguiendo las instrucciones del fabricante. Los controles, las referencias cuantitativas y las muestras se ubicaron en la posición correcta. Luego se seleccionaron los controles del ensayo (negativo y positivo) y se introdujeron los valores de concentración de las referencias cuantitativas en copias/mL (A=5.0E+06, B=5.0E+05, C=5.0E+04, D=5.0E+03).

III.3.4.3.2. Control de calidad

Para determinar que los resultados de la prueba fueron válidos, se comprobó el cumplimiento de los requerimientos del control de calidad descritos por el fabricante:

- Control negativo: No se muestra un valor de Ct; pero su control interno debe ser positivo ($Ct \leq 40$).
- Control positivo-VHB: Su concentración debe estar en el rango de $1.58E+02 \sim 1.58E+03$ UI/mL.
- Referencias cuantitativas-VHB (A, B, C y D): Todas deben resultar positivas y el coeficiente de correlación de la curva estándar r debe ser $\geq 0,98$.

III.3.4.3.3. Límite de detección

El límite inferior de detección de la prueba es 10 UI/mL. El Ct de referencia para el control interno es 40.

III.3.4.3.4. Interpretación de los resultados

Para las muestras que son detectadas entre 20 UI / mL y $2.0E + 09$ UI / mL, los resultados de la prueba son confiables y se pueden informar. Las muestras que se detectan con carga viral $> 2.0E + 09$ UI / mL, se informa que es $> 2.0E + 09$ UI / mL. Si se requiere la cuantificación precisa, se debe diluir la muestra 1000 veces y volver a evaluarla. Para las muestras que se detectan ≥ 10 UI / mL y < 20 UI / mL y el control interno es positivo (valor de $Ct \leq 40$), significa que el virus tiene muy baja carga, y se informa que "el resultado de la prueba es solo de referencia". Para las muestras que se detectan < 10 UI / mL, y el control interno es positivo (valor de $Ct \leq 40$), se debe informar que el ADN-VHB está por debajo del límite inferior de detección del ensayo. Si el control interno no es normal (valor de $Ct > 40$ o no aparece valor de Ct), entonces el resultado de la detección de la muestra no es válido.

III.4. Análisis estadístico

Para el análisis de los resultados se confeccionó una base de datos en Microsoft Excel y se realizaron los cálculos con los valores de las concentraciones de ADN-VHB transformados en $\log_{10}$. Se calcularon medidas de estadística descriptiva a

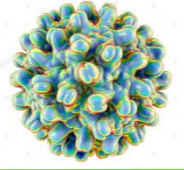
partir de la distribución de frecuencias absolutas y relativas expresadas en tablas de contingencia. Para el cálculo de la especificidad clínica y analítica de los estuches diagnósticos se empleó la aplicación LabCalc 1.0.1. Se calculó el coeficiente de correlación de Pearson (r) y el análisis de regresión lineal para los ensayos de exactitud y linealidad con el EI. Para evaluar la precisión intra-ensayo se determinó el promedio, la desviación estándar (DE) y el coeficiente de variación ($CV = (DE/Promedio) \times 100$) para cada concentración evaluada del EI dentro de un mismo ensayo. Para comparar el método a evaluar con el ensayo de referencia *Artus HBV RG PCR Kit* (Qiagen, Alemania), se determinó el coeficiente de correlación de Pearson y la concordancia inter-ensayo, mediante el empleo del método gráfico de Bland-Altman y el cálculo del coeficiente de correlación de concordancia de Lin. El análisis de los resultados cuantitativos se realizó empleando el paquete estadístico GraphPad Prism 5.0.1, utilizando un intervalo de confianza (IC) del 95% y tomando como estadísticamente significativos aquellos resultados donde se obtuvieron valores de $p < 0.05$.

III.5. Aspectos éticos de la investigación

El presente estudio se desarrolló según las normas de la Declaración de Helsinki (141) y las Guías Éticas Internacionales para estudios biomédicos en sujetos humanos (CIOMS, del inglés, *Council for International Organizations of Medical Sciences*) (142). En el presente estudio se utilizaron muestras de suero enviadas al LNRHV-IPK y del Instituto de Gastroenterología, para el diagnóstico molecular del VHB, por lo que los pacientes ya fueron tratados por los especialistas que solicitaron dicho diagnóstico en su momento. Por tal razón la información obtenida del estudio no es relevante para su atención y seguimiento, que ya está en curso. Se utilizaron las muestras enumeradas, respetando la identidad de las mismas. Sin embargo, los pacientes incluidos en el ensayo de aplicación clínica de la prueba SUMASIGNAL VHB, recibieron el diagnóstico molecular de la infección, permitiendo su correcta evaluación clínica y seguimiento por parte de especialistas en gastroenterología.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la historia natural de la hepatitis B y su evolución hacia la cronicidad, la progresión de la enfermedad hepática se encuentra estrechamente relacionada con factores de origen viral y del huésped (143); de todos ellos, quizás el factor más importante sea sin duda, el mantenimiento de una replicación viral activa en el paciente infectado. Por tanto, la utilización de marcadores moleculares, que como la carga viral son indicadores directos de la replicación viral y permiten su cuantificación, es primordial para el manejo de los pacientes infectados por el virus (15, 144).

La cuantificación de la carga viral constituye un elemento esencial para caracterizar el estado en que se encuentra la infección, así como para evaluar el riesgo de desarrollo de cirrosis y CHC. Se plantea que puede existir una relación directa entre este riesgo y el nivel de carga viral al momento del inicio del seguimiento clínico de los pacientes, o con el mantenimiento de niveles altos de replicación durante este estadio clínico. Por esta razón, la carga viral constituye el mejor predictor de la progresión a cirrosis y CHC, y esta progresión es además, proporcional a los niveles de carga viral (145-147). Esta relación hace imprescindible la determinación de la carga viral durante el seguimiento de los pacientes infectados, empleando métodos de cuantificación del ADN-VHB específicos, precisos y confiables, como son los ensayos de RCP-TR.

IV.1. Indicadores de desempeño de los estuches SUMASIGNAL VHB y Hepatitis B Viral DNA Quantitative Fluorescence Diagnostic Kit (PCR- Fluorescence Probing)

Al determinar la especificidad clínica y analítica (o reactividad cruzada) de los estuches SUMASIGNAL VHB (un paso) y *Hepatitis B Viral DNA Quantitative Fluorescence Diagnostic Kit (PCR- Fluorescence Probing)* estas mostraron excelentes resultados, como se muestra en la Tabla IV.1.

Tabla IV.1. Especificidad clínica y analítica de los estuches SUMASIGNAL VHB (un paso) y *Hepatitis B Viral DNA Quantitative Fluorescence Diagnostic Kit (PCR-Fluorescence Probing)*.

Parámetros	SUMASIGNAL VHB N=80	HBV Probing N=76
Especificidad clínica (%) [IC 95%]	100% [79,95% - 99,54%]	100% [79,95% - 99,54%]
Especificidad analítica [IC 95%]	100% [65,55% - 99,08%]	100% [75,93% - 99,43%]
Especificidad total [IC 95%]	100% [85,87% - 99,70%]	100% [87,99% - 99,75%]

Fuente:* Resultados de la investigación.

Los resultados de la Tabla IV.1 muestran, que en todos los casos se obtuvieron los resultados esperados, es decir, que todas las muestras evaluadas para la especificidad de los ensayos, resultaron negativas al VHB (no mostraron valor de Ct) y el control interno se detectó como positivo ($Ct \leq 40$) en todos los casos.

En cuanto a la especificidad analítica o reactividad cruzada, los estuches evaluados revelaron la capacidad de discernir entre otros patógenos distintos al VHB presentes en la muestra, que comparten las vías de transmisión o pueden causar coinfecciones con el VHB, evitando así el diagnóstico de falsos positivos.

Los resultados obtenidos en esta investigación concuerdan con los estudios publicados por otros autores, que avalan que la cuantificación del ADN-VHB es crucial en el manejo de la enfermedad. Particularmente, cuando se trata de la evaluación de la respuesta al tratamiento y la detección de mutantes virales desarrolladas durante la terapia antiviral. Dichas variantes pueden dar lugar a fenotipos negativos del HBsAg y del HBeAg (marcador de replicación viral activa) (148), provocando de forma indirecta un incremento de los casos de hepatitis B oculta (149, 150).

En el presente estudio no se determinó la sensibilidad analítica para definir el límite inferior de detección de los ensayos, pues se tuvo en cuenta la referencia de este

valor indicada por los fabricantes. Estudios realizados en 2019 por Armas-Cayarga y cols., durante la evaluación interna del estuche SUMASIGNAL VHB (un paso) definieron el límite de detección de ADN-VHB de este ensayo en un intervalo de confianza del 95%. Para ello, emplearon el tercer EI para el VHB con código 10/264, (NIBSC, Reino Unido) y el método de análisis PROBIT (www.probit.com). El ensayo de sensibilidad mostró que el límite inferior de detección fue de 377,47 IU/mL (IC 95%; 267,03 – 689,95 IU/mL) (151).

El límite inferior de detección de SUMASIGNAL VHB (un paso), es elevado (2,58 Log₁₀ IU/mL), esto puede deberse a varias cuestiones, principalmente al volumen de muestra clínica de partida. Este aspecto influye en la sensibilidad de la técnica, ya que según lo informado en la literatura, la sensibilidad de las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos del VHB no dependen solamente de la eficiencia de los métodos de detección y amplificación utilizados. También dependen en gran medida del volumen de muestra y la eficiencia del proceso de extracción (79, 152). En el estuche SUMASIGNAL VHB (un paso), el volumen de muestra empleado es muy pequeño, solamente 5 µL, además de que no incluye un proceso de purificación del ADN. Estos aspectos hacen que el sistema tenga un elevado límite de detección, lo cual constituye una limitación del estuche.

IV.1.2. Estudio de la precisión y linealidad de los métodos evaluados frente a Estándares Internacionales (EI)

En los ensayos realizados para determinar la exactitud y precisión, llevados a cabo con el tercer y cuarto EI de la OMS para la evaluación de los estuches SUMASIGNAL VHB (un paso) y *Hepatitis B Viral DNA Quantitative Fluorescence Diagnostic Kit (PCR- Fluorescence Probing)* respectivamente, se lograron resultados satisfactorios. Como se observa en la Tabla IV.2, se obtuvo una diferencia entre los Log₁₀, esperado y observado, de menos de 0,5 en todas las diluciones, con un coeficiente de correlación, para ambos ensayos, mayor de 0,99.

Tabla IV.2. Comparación entre los títulos esperados de las diluciones del EI y los títulos obtenidos con los estuches SUMASIGNAL VHB (un paso) y *Hepatitis B Viral DNA Quantitative Fluorescence Diagnostic Kit (PCR- Fluorescence Probing)*.

Estuche (EI evaluado)	Título esperado (UI/mL)	Log ₁₀ esperado	Media log ₁₀ observado (5 réplicas)	Diferencia log ₁₀ esperado vs observado (exactitud)	Coefficiente de correlación (r) p<0,001
SS- VHB (Tercer EI)	1,70E+06	6,23	5,94	0,29	r=0,9977
	1,70E+05	5,23	5,06	0,17	
	1,70E+04	4,23	4,12	0,11	
	1,70E+03	3,23	2,95	0,28	
HBV- Probing (Cuarto EI)	3,50E+05	5,54	5,59	0,05	r=0,9999
	3,5E+04	4,54	4,55	0,01	
	3,5E+03	3,54	3,58	0,04	
	3,5E+02	2,54	2,66	0,12	

Fuente: Resultados de la investigación. Estudio de exactitud de los estuches evaluados frente a los EI. EI: Estándar Internacional. SS-VHB: SUMASIGNAL VHB (un paso); HBV- Probing: *Hepatitis B Viral DNA Quantitative Fluorescence Diagnostic Kit (PCR- Fluorescence Probing)*

En la evaluación de los indicadores de linealidad y precisión se emplearon el tercer y cuarto EI, debido a que estos estándares son obtenidos a partir del ADN-VHB de un plasma positivo al subgenotipo A2. Este es altamente frecuente en la población cubana (84,9%), de acuerdo a lo informado en un estudio filogenético y genotípico del VHB en Cuba, realizado en 2015 por Rodríguez y cols. (153).

Para evaluar la precisión intraensayo se determinó la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación, para las concentraciones del EI incluidas dentro de un mismo ensayo. Estos parámetros se evaluaron para el Log₁₀ de los títulos de ADN-VHB. Para el estuche SUMASIGNAL VHB (un paso), el rango de concentraciones analizadas estuvo entre 1,70E+03 y 1,70E+06 UI/mL. Mientras que para el ensayo *Hepatitis B Viral DNA Quantitative Fluorescence Diagnostic Kit (PCR- Fluorescence Probing)*, el rango fue desde 3,50E+02 hasta 3,50E+05 UI/mL. El CV fue menor del 3% para ambos ensayos (Tabla IV.3).

Tabla IV.3. Resultados de la determinación de la precisión intraensayo de los estuches evaluados con los EI para cuantificar el ADN-VHB.

Estuche (EI)	Concentración de ADN-VHB (UI/mL)/Log ₁₀ (esperado)	Log ₁₀ de la concentración de ADN-VHB (observado)		
		Promedio	DE	CV (%)
SS- VHB (Tercer EI)	1,70E+06/6,23	5,94	0,058	0,99
	1,70E+05/5,23	5,06	0,064	1,27
	1,70E+04/4,23	4,12	0,032	0,79
	1,70E+03/3,23	2,95	0,081	2,75
HBV- Probing (Cuarto EI)	3,50E+05/5,54	5,59	0,013	0,24
	3,5E+04/4,54	4,55	0,082	1,81
	3,5E+03/3,54	3,58	0,050	1,40
	3,5E+02/2,54	2,66	0,032	1,19

Fuente: Resultados de la investigación. Estudio de precisión intraensayo de los estuches evaluados frente a los EI. EI: Estándar Internacional. DE: Desviación estándar, CV Coeficiente de Variación SS-VHB: SUMASIGNAL VHB (un paso); HBV- Probing: Hepatitis B Viral DNA Quantitative Fluorescence Diagnostic Kit (PCR- Fluorescence Probing)

La utilización de los EI de ADN-VHB de la OMS, son reconocidos como los reactivos de referencia para las técnicas de detección de ácidos nucleicos. Estos EI permiten la obtención de resultados más precisos y robustos, y su uso ha resuelto el problema en la normalización de los ensayos cuantitativos, al unificar los resultados en UI/mL (139, 154, 155). Además, ha permitido comparar y armonizar resultados entre diferentes laboratorios y diferentes ensayos para el establecimiento de límites regulatorios y guías de tratamiento (155).

En el presente estudio no se obtuvieron diferencias significativas entre los Log₁₀ esperados, con relación a los observados, sin superar diferencias de más de 0,5 Log₁₀ (valor de corte empleado para evaluar una diferencia clínicamente significativa). Este resultado brinda seguridad en el diagnóstico, al apuntar que la variabilidad de los resultados de la prueba no pueda ser confundida como un cambio de la carga viral del paciente (156).

Lograr una buena precisión es esencial en los ensayos de cuantificación de ácidos nucleicos. Se plantea que en los ensayos de RCP-TR se puede lograr un CV de 1-3 % (157).

Los CV intraensayo, obtenidos al evaluar los estuches SUMASIGNAL VHB (un paso) y *Hepatitis B Viral DNA Quantitative Fluorescence Diagnostic Kit (PCR- Fluorescence Probing)*, oscilaron entre 0,79 y 2,75% y entre 0,24 y 1,81%, respectivamente. Estos indicadores demuestran que ambos ensayos son precisos y con mínima dispersión de los resultados, al realizar réplicas (n=5) del tercer y cuarto EI de la OMS, en diferentes concentraciones. Estos valores de CV obtenidos en la evaluación de la precisión de los ensayos son muy similares a los informados por Rodríguez-Lay y cols. Estos autores evaluaron la precisión intra e interensayo de una metodología de RCP-TR casera, para cuantificar el ADN-VHB, utilizando la plataforma *Light Cycler 1.5* (Roche Diagnostics, EE.UU). En el estudio obtuvieron CV de 0,16 a 1,45% y de 0,9 a 2,62%, respectivamente (20). Los valores fueron similares a los informados por otros investigadores nacionales e internacionales (18, 151, 158).

Por otra parte, el análisis de la regresión lineal en el rango de concentraciones evaluadas para los EI, mostró excelente linealidad con coeficientes de determinación (R^2), mayores de 0,99 para ambos estuches (Figura IV.1).

En la Figura IV.1A y IV.1B, se observa que todos los puntos evaluados indicaron una línea recta, lo cual revela que conociendo al menos un par de valores (resultado esperado) se puede predecir el resultado (observado) perfectamente. Este aspecto es crucial en el caso de métodos cuantitativos, ya que al aplicar el ensayo para la cuantificación del ADN-VHB en muestras clínicas, el cálculo de las cargas virales se realizará automáticamente a partir de una recta de regresión. Dicho cálculo se realiza en función de los estándares conocidos, razón por la cual es sumamente importante que el ensayo presente buena linealidad en el rango dinámico de cuantificación que exhibe.

Los resultados obtenidos con respecto a este parámetro son comparables con los de varios autores (159-161), que han obtenido valores para el coeficiente de regresión lineal por encima de 0,99 en los ensayos de linealidad de métodos para la

cuantificación del ADN-VHB, definiendo este criterio como imprescindible en su evaluación.

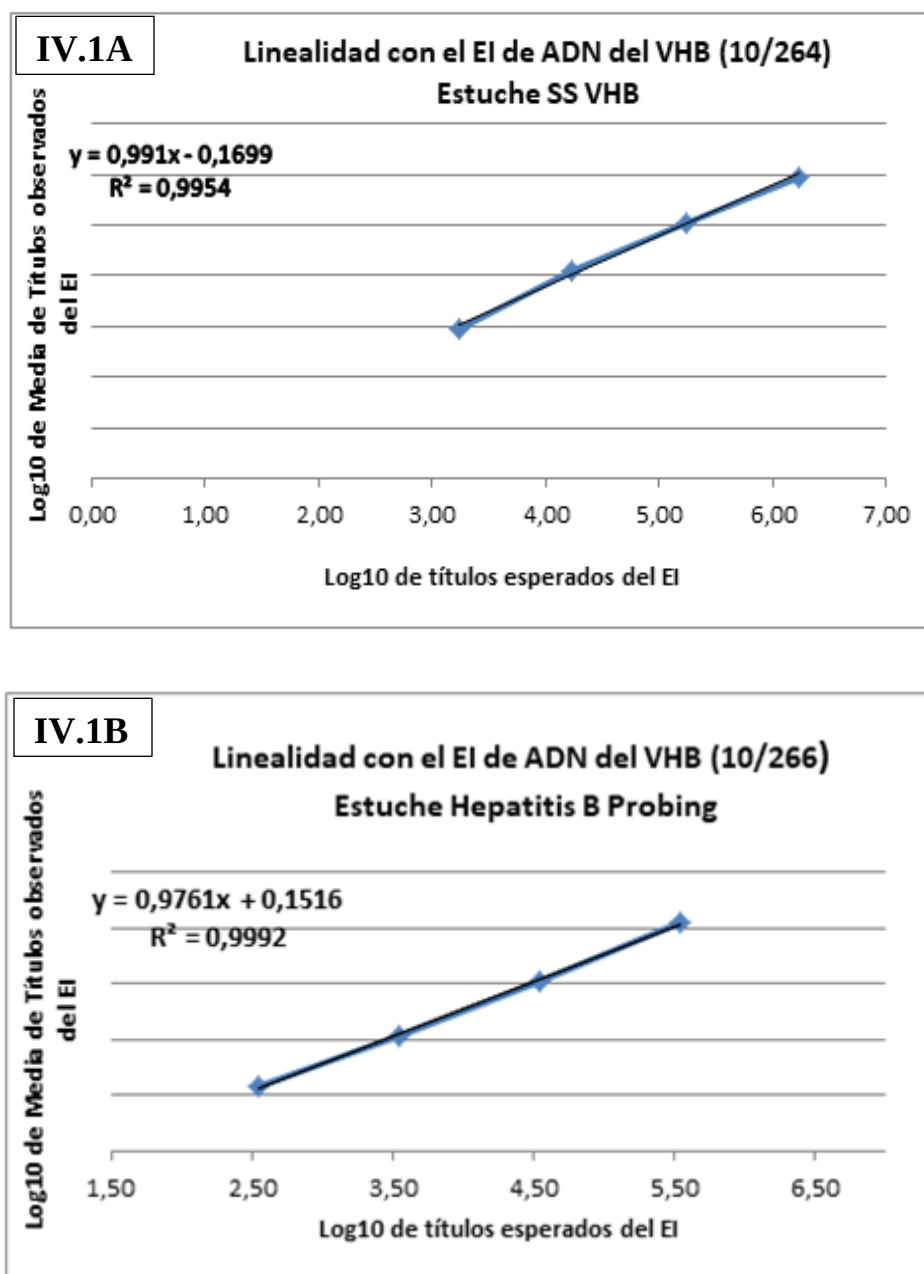


Figura IV.1. Estudio de linealidad entre los resultados esperados del EI y la media de los resultados obtenidos con el estuche; **A.** SUMASIGNAL VHB (un paso); **B.** Hepatitis B Viral DNA Quantitative Fluorescence Diagnostic Kit (PCR- Fluorescence Probing).

IV.1.3. Estudio de comparación entre los estuches SUMASIGNAL VHB (un paso) y *Hepatitis B Viral DNA Quantitative Fluorescence Diagnostic Kit (PCR-Fluorescence Probing)* con el sistema comercial de referencia cuantitativa *Artus HBV RG PCR* (Qiagen, Alemania)

Para el estudio de comparación con un sistema de referencia, en este caso el estuche comercial de cuantificación de carga viral del *VHB Artus HBV RG PCR* (Qiagen, Alemania), se seleccionaron 50 muestras positivas y cuantificables para el estuche SUMASIGNAL VHB (un paso) y 40 muestras con iguales características para el estuche *Hepatitis B Viral DNA Quantitative Fluorescence Diagnostic Kit (PCR-Fluorescence Probing)*.

Los resultados obtenidos para ambas comparaciones fueron satisfactorios. En el caso de las muestras cuantificadas por el primer estuche SUMASIGNAL VHB (un paso) con respecto al sistema Artus; el 50% (25/50) de las muestras tuvieron diferencias de $\text{Log}_{10} \leq 0,5$. El 26 % (13/50) mostraron una diferencia de logaritmo entre 0,51 y 1. En el 14 % (7/50) la diferencia estuvo entre >1 y 1,5; mientras que solo en el 10% (5/50) de las muestras analizadas se obtuvieron diferencias de $\text{Log}_{10} > 1,5$.

Para las muestras empleadas en la comparación entre el estuche *HBV-Probing* y el estuche comercial *Artus*; en el 40% (16/40) se obtuvieron diferencias de $\text{Log}_{10} \leq 0,5$. El 47,5% (19/40) tuvo una diferencia de logaritmo de entre 0,5 y 1. En el 2,5% (1/40) las diferencias de Log_{10} estuvieron entre 1 y 1,5; mientras que en el 10% (4/40) de las muestras se detectaron diferencias de logaritmo mayores de 1,5 (Figura IV.2).

Desde el punto de vista clínico y para la toma de decisiones sobre el manejo de la enfermedad en los pacientes, las diferencias mayores de 0,5 Log_{10} entre cuantificaciones de carga viral en un mismo sujeto, son consideradas significativas y serían indicativas de un cambio de conducta terapéutica. Es por ello que al ensayar metodologías diferentes de cuantificación, aplicadas a una misma muestra clínica, las diferencias mayores de 0,5 Log_{10} , se consideran negativas en el proceso de evaluación de una técnica.

Al comparar los resultados obtenidos por los estuches SUMASIGNAL VHB (un paso) y *Hepatitis B Viral DNA Quantitative Fluorescence Diagnostic Kit (PCR- Fluorescence Probing)*, con el ensayo de referencia, el 76% y el 87,5% de las muestras clínicas mostraron resultados con diferencias $\text{Log}_{10} \leq 1$, respectivamente.

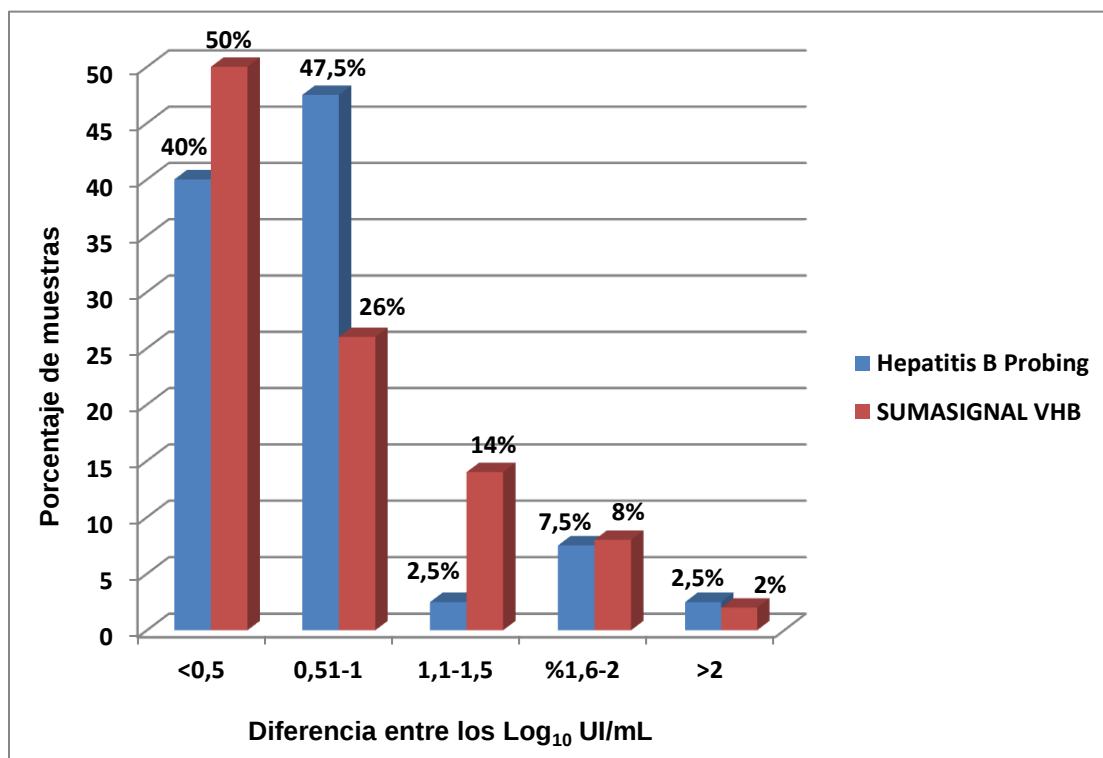


Figura IV.2. Comportamiento de las diferencias entre los logaritmos de las cargas virales obtenidas entre los ensayos evaluados SUMASIGNAL VHB (un paso) y *Hepatitis B Viral DNA Quantitative Fluorescence Diagnostic Kit (PCR- Fluorescence Probing)*, y el sistema de referencia cuantitativa *Artus HBV RG PCR* (Qiagen, Alemania).

Si bien las diferencias logarítmicas de 0,5 Log_{10} son las calificadas dentro del intervalo de tolerancia clínica, ya que según Pawlotsky y cols. las diferencias en este rango se deben a la variabilidad intrínseca de la muestras o entre los pacientes (162) las diferencias que se encuentran en el rango de 0,5 a 1 continúan siendo aceptables, ya que los cambios en los niveles de ADN-VHB para predecir la respuesta virológica temprana o el desarrollo de cepas resistentes a los fármacos, se basan generalmente en diferencias de carga viral dentro de 1 Log_{10} (163).

Braun y cols. informaron resultados similares en un estudio multicéntrico realizado en el 2017. Los investigadores compararon los resultados obtenidos por el sistema *Hepatitis B assay-DxN VERIS Molecular Diagnostics System (Beckman Coulter, Brea, CA, EE.UU)* con el mismo ensayo de referencia empleado en el presente estudio, el sistema *Artus HBV RG PCR (Qiagen, Alemania)*. Obtuvieron que más del 85% de los valores mostraban diferencias de $\text{Log}_{10} \leq 1$ (19). A diferencia de lo obtenido en el presente estudio, Braun y cols. encontraron que más del 50% de los resultados con diferencias de $\text{Log}_{10} > 1$, tenían valores menores de 3 Log_{10} , lo cual los autores explican que pudiera estar relacionado con la diferencia entre los límites de detección entre los ensayos (164). En la presente investigación, los resultados con diferencias de $\text{Log}_{10} > 1$, mostraron valores mayores de 5 Log_{10} , para ambos estuches. Esto pudiera estar relacionado de manera más directa con una mayor variabilidad de los resultados para las cargas virales por encima de $E+05$ UI/mL, que con las diferencias entre los límites de detección de los ensayos, ya que en los resultados obtenidos en el presente estudio se observó un comportamiento similar al cuantificar muestras con cargas virales por encima de $E+05$ UI/mL para ambos estuches evaluados, aun cuando el límite de detección para el sistema *Hepatitis B Viral DNA Quantitative Fluorescence Diagnostic Kit (PCR- Fluorescence Probing)* es de 10 UI/mL (semejante al del Artus, utilizado como referencia), y para el estuche SUMASIGNAL VHB es de 377,47 UI/mL, el cual difiere en más de 1 Log_{10} , con respecto al ensayo de referencia.

Al evaluar la correlación de los métodos con el sistema de referencia Artus, el coeficiente de correlación de Pearson fue de 0,8882 para el ensayo SUMASIGNAL VHB (un paso) y de 0,9120 para *Hepatitis B Viral DNA Quantitative Fluorescence Diagnostic Kit (PCR- Fluorescence Probing)*, con una $p < 0,001$ para ambos. Estos valores permitieron llegar a la conclusión que entre los métodos evaluados y el de referencia existe una fuerte correlación positiva.

En los diagramas de dispersión representados en las Figura IV.3, se muestran los resultados de la correlación entre los logaritmos de las cargas virales obtenidas por

los métodos evaluados y el de referencia, mediante el cálculo del coeficiente de correlación de Pearson.

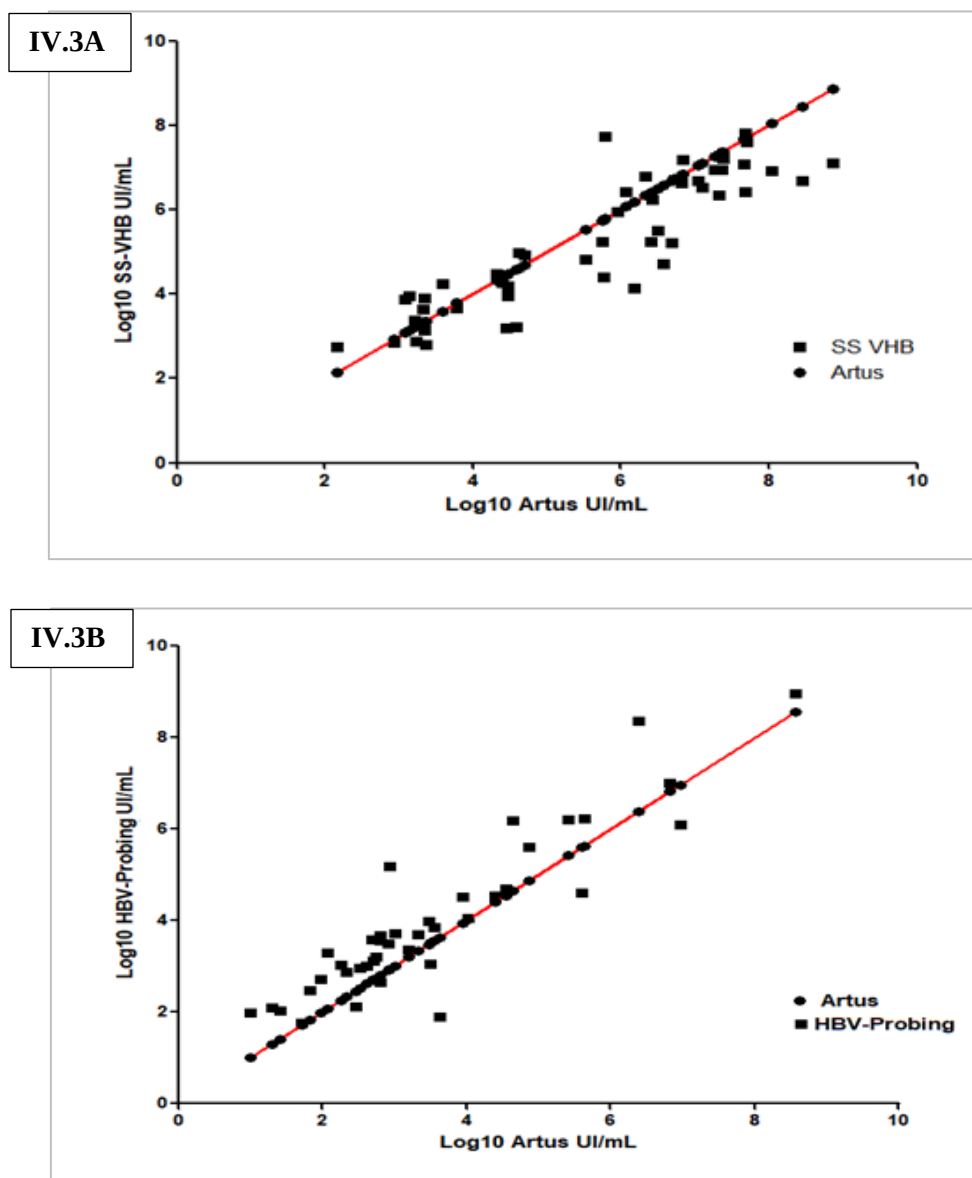


Figura IV.3. Diagramas de dispersión obtenidos en el análisis de correlación entre el sistema de referencia cuantitativa *Artus HBV RG PCR* (Qiagen, Alemania) vs. **A:** SUMASIGNAL VHB (un paso) ($r = 0,8883$; $p < 0,05$); **B:** *Hepatitis B Viral DNA Quantitative Fluorescence Diagnostic Kit (PCR- Fluorescence Probing)* ($r = 0,9120$; $p < 0,05$).

Como se puede observar en las Figuras IV.3, el sentido de la recta evidenció la correlación positiva entre ambos métodos evaluados con el método de referencia, comentada con anterioridad, además se obtuvo una dispersión moderada de los datos, por lo que ambas variables revelaron una tendencia a aumentar de forma directamente proporcional. El coeficiente r de Pearson puede tomar valores entre 0 y 1, por lo que un valor de r igual o cercano a 0,9; como los obtenidos en este estudio, representaría una asociación casi perfecta entre las cargas virales detectadas por ambos métodos.

En un análisis de correlación, mediante la ecuación de la recta, solo se estudia la magnitud, el sentido y la significación de la asociación lineal entre al menos dos variables, a diferencia de lo que se estudia en un análisis de regresión, en el que se modela la relación entre una variable dependiente y una o varias independientes. En la correlación no se asume ningún tipo de direccionalidad entre las variables que se vinculan, propiedad que es conocida como simetría. En consecuencia, un análisis de este tipo solo se basa en el cálculo del coeficiente de Pearson, para interpretar correctamente su magnitud y sentido (165). La medida de una misma variable (como la carga viral) en una misma muestra, por diferentes métodos, debe presentar un comportamiento igual o similar.

Así, el coeficiente de Pearson mide la intensidad de la asociación lineal entre dos mediciones (correlación) pero no proporciona información acerca del acuerdo observado, ni sobre la presencia de diferencias entre las mediciones.

Yeh y cols. en el 2014, informaron valores similares para el coeficiente de correlación de Pearson en un estudio en el que compararon el estuche Abbott RealTime HBV assay (Abbott Molecular Inc., Illinois, EE.UU.) con el COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV (Roche Diagnostics, EE.UU) para la cuantificación de las cargas virales del VHB (159). Asimismo, Lall y cols. en el 2019 obtuvieron una buena correlación ($r=0,964$), al evaluar el desempeño del estuche TRUPCR(®) (3B Black Bio Biotech, India Ltd.) de RCP-TR para la cuantificación de ADN-VHB, disponible comercialmente, frente al ensayo de referencia Artus HBV Real-time PCR (Qiagen, Alemania) (166).

Los resultados obtenidos en este trabajo también coinciden con los notificados por Lall y cols en el 2019, quienes obtuvieron un coeficiente de correlación de 0.946 al comparar el ensayo de RCP TRUPCR HBV Real-time (3B Black Bio Biotech, India Ltd) para la cuantificación del ADN-VHB en muestras clínicas con el estuche comercial Artus HBV Realtime PCR (Qiagen, Germany) (167).

IV.1.3.1. Análisis de la concordancia entre los métodos evaluados y el sistema de referencia cuantitativa *Artus HBV RG PCR kit*.

En la evaluación de la utilidad de una prueba diagnóstica, se requiere valorar la reproducibilidad de los resultados o la concordancia de los mismos al compararla con otra prueba, que sea usada o no como patrón de oro de la entidad (140). Aun cuando el coeficiente de correlación de Pearson mide la probabilidad de establecer una ecuación lineal entre dos variables, en la que por cada cambio de unidad en una de ellas se espera un cambio de unidad (correlativo) en la otra, su uso no es adecuado para estimar la concordancia entre dos variables. Esto es debido a que se pueden obtener coeficientes de correlación de Pearson muy cercanos a la unidad, sin que exista concordancia alguna entre ellas, por lo que no aporta el criterio suficiente para determinar si un método es sustituible o intercambiable por otro (168).

En el caso de métodos que determinan valores cuantitativos, el estadístico Kappa es insuficiente para evaluar la concordancia entre métodos, en estos casos la concordancia se determina empleando en coeficiente de correlación intraclase (CCI) o el coeficiente de correlación y concordancia de Lin (CCC). El CCI puede adquirir valores entre 0 y 1 y puede emplearse si hay más de una medida por el método o instrumento que se esté evaluando. Por su parte, el CCC adquiere valores entre -1 (perfecta discordancia) a 1 (concordancia perfecta), y se puede determinar empleando observaciones simples de un fenómeno (168, 169).

En el presente estudio, el análisis de concordancia entre los estuches evaluados y el sistema de referencia se llevó a cabo mediante la determinación del coeficiente de correlación y concordancia de Lin. Este arrojó valores de 0,76 y 0,88 al evaluar los estuches SUMASIGNAL VHB (un paso) y *Hepatitis B Viral DNA Quantitative*

Fluorescence Diagnostic Kit (PCR- Fluorescence Probing), respectivamente, frente al sistema de referencia Artus, indicando una concordancia pobre entre los métodos evaluados y la prueba de referencia.

Torres-Santos y cols. en el 2016 realizaron un estudio de normalización de una técnica de RCP-TR casera y compararon los resultados obtenidos con los métodos de referencia *Cobas Amplicor HBV* y *Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HBV*, empleando como indicadores los coeficientes de correlación de Pearson y los CCI. Para este último, los autores obtuvieron valores por encima de 0,98 (163).

En el presente trabajo no se empleó el CCI debido a que para utilizar este indicador de concordancia es necesario, como se explicó anteriormente, trabajar con datos pareados de los valores analizados. En este caso, dos determinaciones de carga viral del VHB por cada muestra, determinados por cada uno de los métodos. No se contaba con dos determinaciones de la carga viral para cada muestra, razón por la cual se empleó el coeficiente de Lin.

En esta investigación se evaluó además la concordancia de forma gráfica, empleando el método de Bland-Altman (170). Este análisis mostró una diferencia entre las medias de los métodos SUMASIGNAL VHB (un paso) y Artus de $0,34 \text{ Log}_{10} \text{ UI/mL}$. Se obtuvo que el 96% de las diferencias logarítmicas entre las muestras empleadas en la comparación, se encontraron entre $-1,2 \text{ Log}_{10}$ y $1,9 \text{ Log}_{10}$, límites de concordancia estimados del análisis para un IC del 95% (Figura IV.4A).

Por otra parte, el análisis de la concordancia entre los métodos *HBV Probing* y Artus, mostró una diferencia de $0,45 \text{ Log}_{10} \text{ UI/mL}$, con el 90% de las muestras evaluadas entre los límites de concordancia ($-0,9 \text{ Log}_{10} - 1,9 \text{ Log}_{10}$), para un IC del 95% (Figura IV.4B).

Desde el punto de vista clínico, la concordancia adquiere importancia cuando se desea conocer si con un método o instrumento nuevo, se obtienen resultados equivalentes. De esta forma, eventualmente uno y otro puedan ser remplazados o intercambiados, ya sea porque uno de ellos es más sencillo o menos costoso, o

porque uno de ellos resulta más seguro para el paciente, entre otras razones que se determinan desde el punto de vista clínico (171).

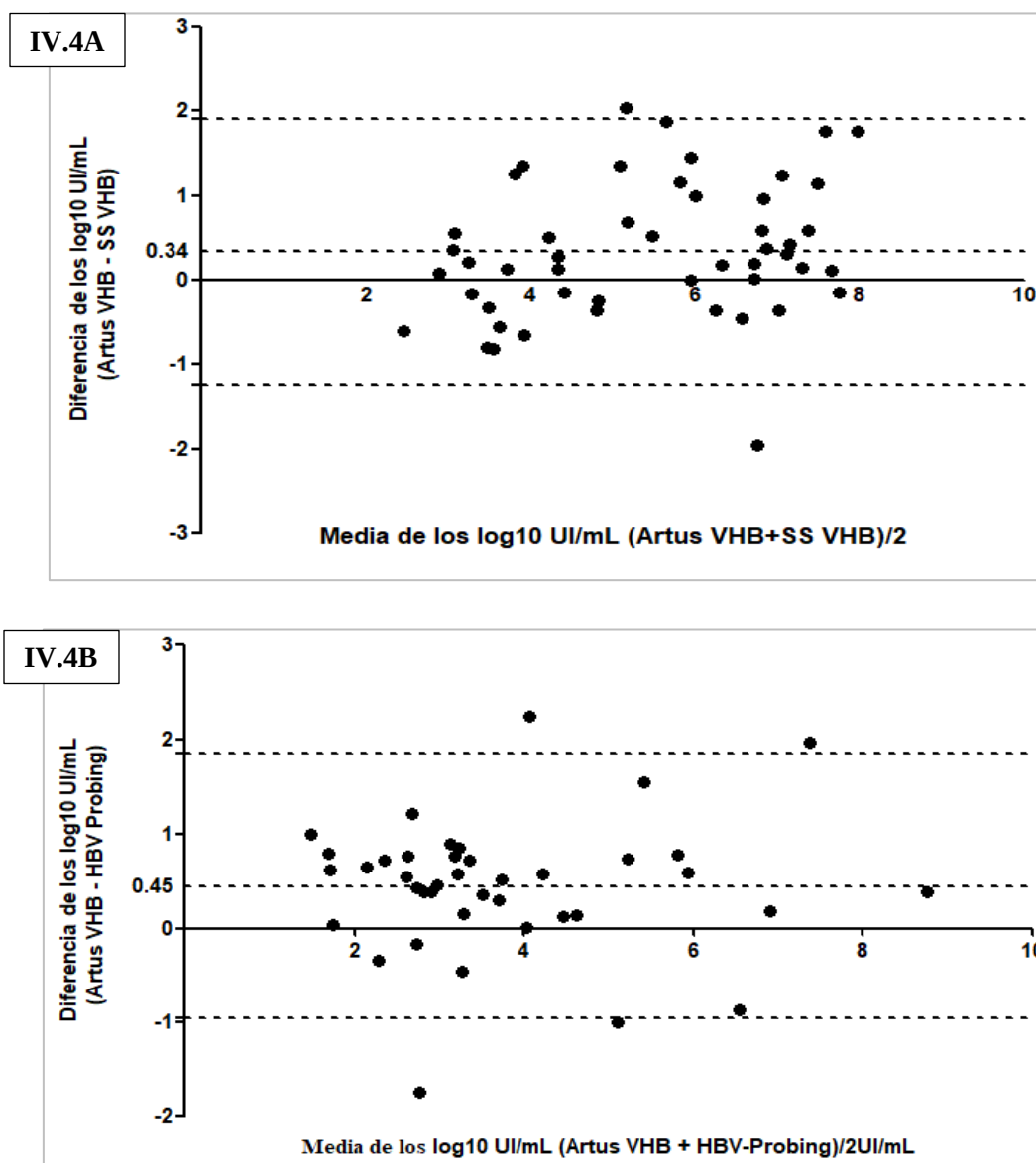


Figura IV.4. Comparación entre el sistema de referencia cuantitativa *Artus HBV RG PCR* (Qiagen, Alemania) vs. **A:** SUMASIGNAL VHB (un paso); **B:** *Hepatitis B Viral DNA Quantitative Fluorescence Diagnostic Kit (PCR- Fluorescence Probing)*, empleando el método gráfico Bland-Altman para el análisis de la concordancia entre los ensayos.

Concluyendo, existe concordancia entre los valores de carga viral obtenidos por los estuches evaluados y el sistema de referencia, ya que las medias de las diferencias logarítmicas de las cargas virales obtenidas, por los ensayos evaluados y el ensayo de referencia resultaron menores de 0,5 y más del 90% de las muestras evaluadas con cada método se encontraron dentro de los límites de concordancia de la prueba estadística. Por tanto, es posible emplear los estuches SUMASIGNAL VHB (un paso) y HBV Probing en el diagnóstico y seguimiento de pacientes con hepatitis B.

En estudios realizados por Li y cols. en 2017, donde evaluaron un método automático para la cuantificación de la carga viral del VHB, frente al sistema *CAP/CTM v.2.0* de Roche (Roche Diagnostics, EE.UU), se informó que la diferencia entre las medias fue 0,06 Log₁₀.

Por otra parte, Madihi y cols. en 2020 al evaluar la concordancia por el método de Bland-Altman del ensayo Artus HBV QS-RGQ frente al ensayo comercial *CAP/CTM HBV v2.0*, informaron una diferencia muy similar en magnitud y sentido a la obtenida en el presente estudio (*CAP/CTM v2.0* - Artus HBV QS - RGQ) = 0.5717 log₁₀ IU/mL (172). Sin embargo, en otra investigación realizada por Weber y cols. en el 2019, los autores informaron una diferencia negativa de -0,054 Log₁₀, entre las medias del ensayo *Aptima HBV Quant Dx assay* (Hologic, Inc., CA, EE.UU) evaluado frente al mismo sistema comercial (*CAP/CTM v.2.0 de Roche*) (158). Las diferencias negativas por el método de Bland-Altman, indican una subestimación de las cargas virales por el método evaluado, lo cual es más riesgoso desde el punto de vista clínico, ya que pueden influir en la toma temprana de decisiones con respecto al inicio o cambio de la terapia antiviral.

El empleo de métodos cuantitativos inadecuados, que no cumplan con los estándares de calidad requeridos para la cuantificación del ADN-VHB, podría afectar las decisiones terapéuticas durante el seguimiento clínico de pacientes infectados con el VHB. Esto se debe a que las directrices actuales para el tratamiento de la enfermedad crónica por el VHB, recomiendan el inicio de la terapia antiviral en los pacientes con VHB HBeAg negativos, con cargas virales superiores a 2,0 E+03 UI/mL y para los pacientes con VHB HBeAg positivos, con cargas virales superiores

a $2,0 \text{ E}+04 \text{ UI / mL}$, según las guías de tratamiento de la AASLD (82), por lo tanto, la carga viral es un criterio decisivo para el inicio del tratamiento antiviral. Cabe destacar que las decisiones de tratamiento se basan en múltiples factores. Además de la carga viral, se tienen en cuenta los niveles de algunas enzimas hepáticas como la ALT, la enfermedad hepática histológica, la edad, los antecedentes familiares y los antecedentes de tratamiento previo (71).

IV.2. Aplicación del estuche SUMASIGNAL VHB (un paso) en muestras clínicas

El estuche SUMASIGNAL VHB (un paso) se seleccionó para la aplicación en muestras clínicas. A diferencia del estuche *Hepatitis B Viral DNA Quantitative Fluorescence Diagnostic Kit (PCR- Fluorescence Probing)*, SUMASIGNAL VHB (un paso) ya posee la aprobación del Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CECMED) para su comercialización y distribución en todo el país. Además, es un sistema rápido y de menor manipulación, que no requiere de equipamiento ni personal altamente calificado para el proceso de extracción del ADN viral. El sistema incluye un control interno para evaluar la reacción de amplificación de las muestras e informar sobre la presencia de inhibidores de la RCP, evitando resultados falsos negativos. Además, emplea la enzima Uracilo-N-Glicosilasa (UNG) + dUTP, lo cual permite degradar los productos amplificados, evitando resultados falsos positivos debido a contaminaciones por reacciones previas.

Con el objetivo de evaluar la aplicabilidad del estuche SUMASIGNAL VHB (un paso) para el diagnóstico *in vitro*, se estudiaron 50 muestras de sueros recibidas en el LNRHV-IPK, para detectar y cuantificar por este método molecular el ADN-VHB.

En la figura IV.5 se muestran los resultados del estudio, donde se observa que no se detectó el genoma viral en el 76% de los casos. El 14% tuvieron cargas virales cuantificables por debajo de $2,0 \text{ E}+05 \text{ UI/mL}$ y el 10% mostró niveles de ADN por encima de $2,0 \text{ E}+05 \text{ UI/mL}$. A pesar del bajo número de casos estudiados ($N=50$), en la aplicación clínica del estuche SUMASIGNAL VHB (un paso), los resultados obtenidos coinciden con las estadísticas anuales reportadas por el LNRHV-IPK, en

cuanto a la detección y cuantificación del ADN-VHB en muestras de suero, mediante el empleo de la técnica de RCP-TR (dato no publicado).

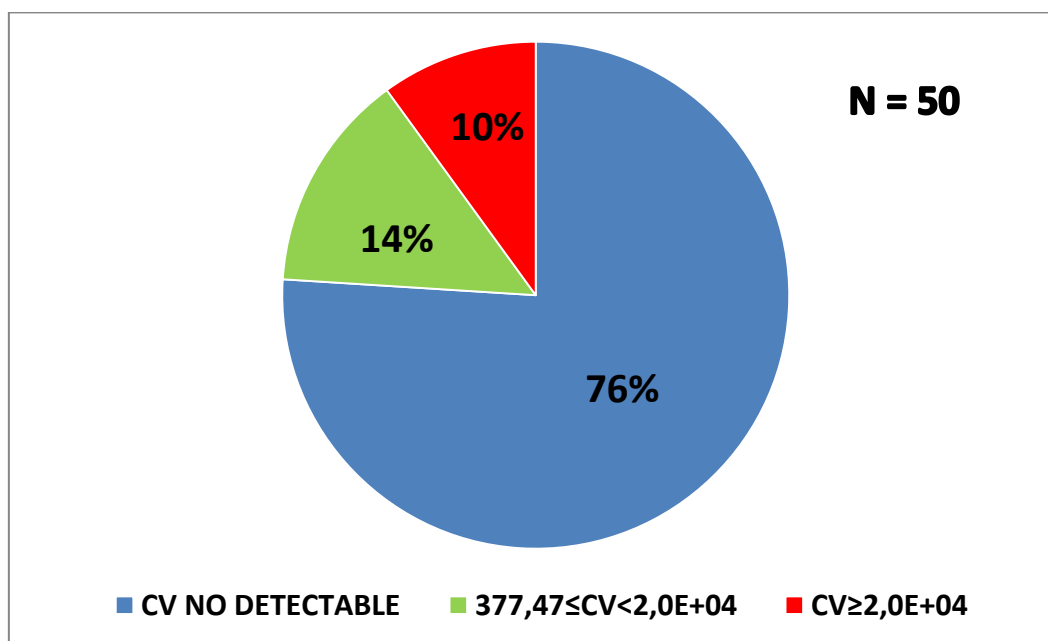


Figura IV.5. Distribución de las cargas virales cuantificadas del VHB en las 50 muestras estudiadas, empleando el estuche SUMASIGNAL VHB (un paso). CV: carga viral del VHB. CV no detectable: $CV < 377,47$ UI/mL (LD del estuche).

Como bien se ha mencionado anteriormente, la carga viral constituye un criterio importante para el inicio de la terapia antiviral. Las guías internacionales más recientes para el manejo terapéutico de la infección por el VHB, establecen que el inicio del tratamiento antiviral es recomendado en personas con hepatitis B crónica cuando existe evidencia de ADN-VHB cuantificable, mayor que $2,0 \text{ E}+03$ UI/mL (si el HBeAg es negativo) o mayor que $2,0 \text{ E}+04$ UI/mL (si el HBeAg es positivo) (81, 82).

En Cuba, las pautas para el inicio del tratamiento están definidas en el Plan Estratégico Nacional para la prevención y control de las ITS, el VIH y las hepatitis 2019-2023 (173). En este documento se establece que los pacientes se tratarán cuando los niveles de ADN-VHB son mayores de $2,0 \text{ E}+04$ UI/mL. Además, se evalúan los niveles de transaminasa, el daño hepático mediante pruebas histológicas y otros factores característicos del hospedero como la edad, duración de la infección, estadio de la enfermedad, entre otros. Como se puede apreciar en los resultados de

la figura IV.5, y teniendo en cuenta la norma cubana del 2019; 5 (10%) de los casos estudiados presentaron criterio virológico para que los pacientes inicien terapia antiviral.

IV.2.1. Comportamiento de las cargas virales del VHB por grupos de riesgo

En la figura IV.6 se muestran los resultados del diagnóstico de VHB aplicando el estuche SUMASIGNAL VHB (un paso), según los grupos de riesgo a los que pertenecen las muestras analizadas. Como se evidencia, la mayor parte de las muestras incluidas en el estudio corresponden a casos de hepatitis B crónica en estudio o seguimiento, mientras que la mayor frecuencia de cargas virales cuantificables utilizando el estuche SUMASIGNAL VHB (un paso), correspondió a nefrópatas en tratamiento de hemodiálisis.

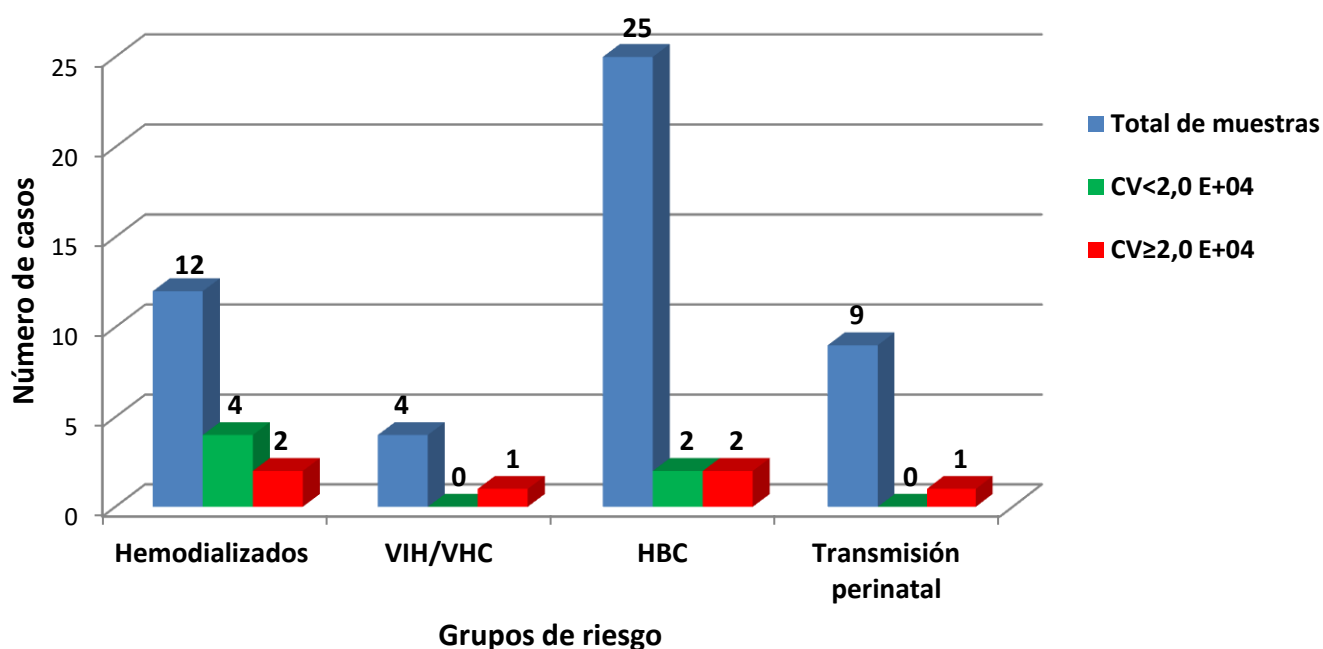


Figura IV.6. Comportamiento de las cargas virales del VHB en los grupos de riesgo estudiados, empleando el estuche SUMASIGNAL VHB (un paso). Transmisión perinatal: Este grupo incluye embarazadas e hijos de madres positivas al VHB. CV: carga viral del VHB.

La literatura describe ampliamente el comportamiento observado en pacientes hemodializados, en la cual se informa que la prevalencia de infección con el VHB es

mayor en este grupo de riesgo que en población general (174), ya que presentan un mayor riesgo de adquirir la infección por el VHB, así como de otros virus que se transmiten por vía parenteral. Este riesgo incrementado es debido al proceder dialítico *per se*, a las transfusiones, a la corta duración de la inmunidad protectora (anti-HBs) post-vacunal y al estado de inmunodepresión general, quedando expuesto directamente al VHB por la vía parenteral (175, 176). Aun cuando la hepatitis B ha disminuido considerablemente en este grupo de riesgo, gracias en gran medida, al seguimiento de las buenas prácticas en las unidades de hemodiálisis (177).

En el presente estudio el 50% de los pacientes hemodializados mostraron valores de carga viral cuantificables por el estuche SUMASIGNAL VHB (un paso), donde el 33,3% (2/6) se encontraron por encima de $2,0 \text{ E}+04 \text{ UI/mL}$, por lo que presentan criterio virológico de tratamiento.

De forma general, los resultados obtenidos en este grupo de riesgo concuerdan con los informados por Montalvo y cols., en el 2007. En la investigación realizada, los autores identificaron la presencia del ADN-VHB en el 66,7% (10/15) de los casos al estudiar la seroprevalencia de marcadores del VHB y los factores de riesgo asociados en pacientes hemodializados de La Habana (178).

Por otra parte, Duong y cols, en el 2019 realizaron un estudio de revisión y metanálisis, sobre la prevalencia de la infección por los VHB y VHC en pacientes hemodializados en Vietnam. Estos autores evidenciaron que la frecuencia de la infección por el VHB se encontró en el rango de 4,9% a 14,3%, más baja que la obtenida en la presente investigación (179).

En la presente investigación el 100% de los pacientes hemodializados estudiados fueron previamente positivos al HBsAg y desde el punto de vista de las cargas virales obtenidas, estas oscilaron de 377,47 a $3,57 \text{ E}+06 \text{ UI/mL}$. Los resultados de la presente investigación son similares a los notificados por Musa y Ateya en el 2020, en un estudio realizado a 135 pacientes hemodializados, correspondientes a una unidad de hemodiálisis de un hospital en Iraq. Aquí los autores evidencian una vez más la elevada actividad replicativa del VHB en este grupo de riesgo, donde el 100% de los pacientes seropositivos al HBsAg, presentaron niveles cuantificables del

ADN-VHB, los cuales oscilaron entre 20 y $7.37 \text{ E}+06 \text{ UI/mL}$ (180). Las diferencias entre el estudio en comparación y el presente trabajo pueden deberse, en parte, a la diferencia entre los límites de detección de los ensayos empleados (181).

En la figura IV.6 se observan además, los resultados de la cuantificación del ADN-VHB en otros grupos de riesgo, tal es el caso de una gestante con una carga viral de $8,86 \text{ E}+07 \text{ UI/mL}$ ($\text{CV} \geq 2,0 \text{ E}+04 \text{ UI/mL}$), dentro del grupo de riesgo estudiado por transmisión perinatal (4 embarazadas y 5 hijos de madres positivas al VHB). Así como un paciente coinfectado con VIH/VHB en estado SIDA, el cual mostró una carga viral de $2,88 \text{ E}+08 \text{ UI/mL}$. Por su parte, el 16% de los individuos con hepatitis B crónica en estudio o seguimiento resultaron positivos. A dichos pacientes se les indica la cuantificación de la carga viral para evaluar el estado replicativo del virus y de ser necesario indicar tratamiento (182).

Debido al bajo número de muestras estudiadas para cada grupo de riesgo, es imposible establecer comparaciones con los datos publicados en la literatura nacional e internacional, aspecto que constituye una limitante de la presente investigación.

Los estudios moleculares para la detección y cuantificación del ADN-VHB, en embarazadas que resultan positivas al HBsAg y de sus hijos (si resultan igualmente seropositivos al HBsAg), son indispensables en países donde el VHB es endémico, con el objetivo de prevenir y tratar a tiempo la transmisión perinatal. Siendo esta la principal causa de infecciones crónicas por el VHB, ya que el 90% de los niños infectados por esta vía se convierten en portadores crónicos al llegar a la adultez (183-185). Para evitar esto y lograr la eliminación de la transmisión materno-infantil en Cuba se sigue un algoritmo para el manejo de las embarazadas. Dicho algoritmo consta del tamizaje serológico para la detección del HBsAg en los tres trimestres del embarazo, intervención terapéutica durante el embarazo (186), si la embarazada cumple con los criterios de tratamiento ($\text{ADN-VHB} \geq 2,0 \text{ E}+05 \text{ UI/mL}$) durante las semanas 28-32 del embarazo), inmunoprofilaxis activa y pasiva del recién nacido y pruebas serológicas post-vacunación (185, 187-189).

La aplicación clínica del estuche SUMASIGNAL VHB (un paso) para el diagnóstico *in vitro* se vio afectada por una limitante del ensayo; su elevado límite de detección (377,47 UI/mL) (151), lo cual le resta utilidad práctica. Esto se debe a que para el estudio de determinados casos, donde los niveles del ADN-VHB son bajos, se requiere de ensayos con mayor sensibilidad analítica. Estos casos incluyen la detección de la infección por el VHB durante el período de ventana, la detección de infecciones ocultas por el VHB (IOB) y el tamizaje de donantes de sangre que permita cumplir con los principios de sangre segura (79, 190).

La mayoría de los casos de IOB se caracterizan por presentar bajas cargas virales (ADN-VHB <200 UI/ mL) y su estudio adquiere gran importancia en determinados grupos poblacionales como los donantes de sangre e individuos inmunocomprometidos, como los pacientes con VIH/SIDA, trasplantados, politransfundidos y hemodializados (191, 192). En este último grupo, el cual constituye uno de los grupos de riesgo analizados en la presente investigación, la IOB presenta una elevada prevalencia debido al comportamiento de la cinética de la cargas virales posterior al procedimiento de diálisis (193).

Otros estudios donde se requieren ensayos con bajos límites de detección (10 UI/mL) y en los que el estuche SUMASIGNAL VHB (un paso) no sería de utilidad, son aquellos que definen la respuesta virológica en los pacientes tratados con análogos de nucleósidos (AN), ya que esta define su eficacia justamente con la no detección del ADN-VHB (82).

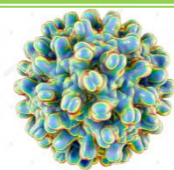
Comúnmente se estima la indicación de terapia antiviral contra la hepatitis B crónica cuando los niveles de ADN-VHB son mayores de $2,0 \times 10^4$ UI/mL. También se tienen en cuenta otros marcadores bioquímicos, histológicos y factores del hospedero, como ya se mencionó previamente. Cuba adopta igualmente este criterio para la indicación de tratamiento, proponiendo, como procedimiento preferencial, las monoterapias con AN de alta barrera de resistencia a largo plazo. En este grupo de fármacos se encuentran el Entecavir (ETV), Tenofovir Alafenamida (TAF) y Fumarato de Disoproxilo de Tenofovir (TDF) (81, 173). No obstante, en la práctica clínica, se ha visto que algunos pacientes con hepatitis B crónica tienen niveles fluctuantes de

ADN-VHB, que pueden variar desde valores indetectables hasta $>2,0 \times 10^6$ UI/mL (194, 195), como bien se pudo constatar en los resultados obtenidos en este estudio. De ahí que el monitoreo seriado de la carga viral es más importante que un único valor de corte arbitrario para prescribir el tratamiento (82).

De acuerdo con estos planteamientos, el estuche comercial SUMASIGNAL VHB (un paso) podría emplearse en la red diagnóstica para identificar a los pacientes con infección crónica tributarios de tratamiento antiviral y a las embarazadas en cuya pesquisa se confirme la presencia del HBsAg, estudios en los que el elevado límite de detección del ensayo no causaría perjuicio sobre la valoración clínica de los especialistas.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

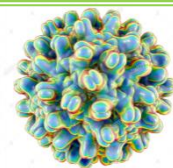


V. CONCLUSIONES

- La evaluación de los ensayos SUMASIGNAL VHB (un paso) y Hepatitis B Viral DNA Quantitative Fluorescence Diagnostic Kit (PCR- Fluorescence Probing) muestran indicadores de desempeño excelentes, lo que valida su uso para la cuantificación del ADN-VHB *in vitro*.
- El estuche SUMASIGNAL VHB (un paso) puede ser recomendado para su introducción en el diagnóstico, la vigilancia y la indicación del tratamiento en los pacientes con hepatitis B crónica.
- EL ensayo SUMASIGNAL VHB (un paso) no debe emplearse para el estudio de casos en periodo de ventana, tamizaje de bancos de sangre, ni en el estudio de infecciones ocultas, debido a su elevado límite de detección.
- Los ensayos evaluados poseen estándares elevados de calidad, lo que valida su uso como una plataforma tecnológica nacional.

CAPÍTULO VI

RECOMENDACIONES

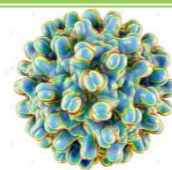


VI. RECOMENDACIONES

- Informar a las autoridades del Centro de Inmunoensayo y del MINSAP, los resultados obtenidos, que respaldan el uso de los ensayos evaluados para el diagnóstico *in vitro* y seguimiento de pacientes con hepatitis B crónica.
- Evaluar un mayor número de pacientes, representativo de los diferentes grupos de riesgo estudiados con el estuche SUMASIGNAL VHB (un paso).
- Realizar un estudio de aplicación en muestras clínicas del ensayo Hepatitis B Viral DNA Quantitative Fluorescence Diagnostic Kit (PCR- Fluorescence Probing) donde se incluyan casos de infección oculta en hemodializados, inmunocomprometidos y donantes de sangre.
- Evaluar de forma independiente los métodos de extracción empleados por los estuches SUMASIGNAL VHB (un paso) y Hepatitis B Viral DNA Quantitative Fluorescence Diagnostic Kit (PCR- Fluorescence Probing), frente al sistema comercial de referencia QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania).

CAPÍTULO VII

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wong GL, Wong VW. Eliminating hepatitis B virus as a global health threat. *The Lancet Infectious diseases*. 2016;16(12):1313-4.
2. Global hepatitis report, 2017. 2017 978-92-4-156545-5.
3. Razavi-Shearer D, Razavi H. Global prevalence of hepatitis B virus infection and prevention of mother-to-child transmission - Authors' reply. *The lancet Gastroenterology & hepatology*. 2018;3(9):599.
4. Smith S, Harmanci H, Hutin Y, Hess S, Bulterys M, Peck R, et al. Global progress on the elimination of viral hepatitis as a major public health threat: An analysis of WHO Member State responses 2017. *JHEP reports : innovation in hepatology*. 2019;1(2):81-9.
5. Ott JJ, Horn J, Krause G, Mikolajczyk RT. Time trends of chronic HBV infection over prior decades - A global analysis. *Journal of hepatology*. 2017;66(1):48-54.
6. World Health Organization. Hepatitis B. On line 2020 [Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>].
7. Mirambo MM, Mkumbo E, Selega H, Msemwa B, Mushi MF, Silago V, et al. Hepatitis B virus infections among health professional students in Mwanza city, Tanzania in 2016. *Archives of public health = Archives belges de sante publique*. 2020;78:76.
8. Michitaka K, Hiraoka A, Tokumoto Y, Ninomiya K, Ninomiya T, Horiike N, et al. Clinical features of adult patients with acute hepatitis B virus infection progressing to chronic infection. *International journal of hepatology*. 2014;2014:358206.
9. Liu YP, Yao CY. Rapid and quantitative detection of hepatitis B virus. *World journal of gastroenterology*. 2015;21(42):11954-63.
10. Ascione A, Forte GB, Amitrano L, De Bellis G, Pandolfi C, Iaccarino L, et al. Serological markers of hepatitis B virus infection in healthy volunteer blood donors in Campania (Southern Italy). *Vox sanguinis*. 1981;41(3):146-50.
11. Balaeva T, Grijbovski AM, Samodova O, Sannikov A, Klouman E. Seroprevalence of Markers of Hepatitis B Virus Infection, Associated Factors, and Vaccination Status in Young Adults in Arkhangelsk, Northwest Russia: A Population-Based Cross-Sectional Study. *International journal of environmental research and public health*. 2018;15(9).

12. Ghosh M, Nandi S, Dutta S, Saha MK. Detection of hepatitis B virus infection: A systematic review. *World journal of hepatology*. 2015;7(23):2482-91.
13. Blum HE. Hepatitis B virus: significance of naturally occurring mutants. *Intervirolgy*. 1993;35(1-4):40-50.
14. Mak D, Kramvis A. Molecular characterization of hepatitis B virus isolated from Black South African cancer patients, with and without hepatocellular carcinoma. *Archives of virology*. 2020;165(8):1815-25.
15. Valsamakis A. Molecular testing in the diagnosis and management of chronic hepatitis B. *Clinical microbiology reviews*. 2007;20(3):426-39, table of contents.
16. Idilman R. The summarized of EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *The Turkish journal of gastroenterology : the official journal of Turkish Society of Gastroenterology*. 2017;28(5):412-6.
17. Akram A, Islam SMR, Munshi SU, Tabassum S. Detection of Hepatitis B Virus DNA among Chronic and potential Occult HBV patients in resource-limited settings by Loop-Mediated Isothermal Amplification assay. *Journal of viral hepatitis*. 2018;25(11):1306-11.
18. Li M, Chen L, Liu LM, Li YL, Li BA, Li B, et al. Performance verification and comparison of TianLong automatic hypersensitive hepatitis B virus DNA quantification system with Roche CAP/CTM system. *World journal of gastroenterology*. 2017;23(37):6845-53.
19. Braun P, Delgado R, Drago M, Fanti D, Fleury H, Izopet J, et al. A European multicentre study on the comparison of HBV viral loads between VERIS HBV assay and Roche COBAS(®) TAQMAN(®) HBV test, Abbott RealTime HBV assay, Siemens VERSANT HBV assay, and Qiagen artus HBV RG kit. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2017;95:76-83.
20. Rodríguez Lay Lde L, Montalvo Villalba MC, Sariego Frómeta S, Bello Corredor M, Mora Laguna E, Kourí Cardellá V, et al. [Real-time polymerase chain reaction assay for hepatitis B virus DNA quantification]. *Revista cubana de medicina tropical*. 2012;64(3):290-303.
21. Roholm KI, P. . Changes in the liver in acute epidemic hepatitis (catarrhal jaundice) based on 38 aspiration biopsies. . *Acta Pathol Microbiol Scand* 2010;16:427-42
22. Blumberg BS. A 'new' antigen in leukemia sera. *Jama*. 1965(191):541.
23. Prince AM. An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1968;60:814-21.

24. Sutnick AI. Anicteric hepatitis associated with Australia antigen. . Jama. 1968;205:670.
25. Krugman S. Infectious hepatitis. Evidence for two distinctive clinical, epidemiological, and immunological types of infection. Jama. 1967;200:365-73.
26. Dane DS, Cameron CH, Briggs M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. Lancet (London, England). 1970;1(7649):695-8.
27. Seeger C ZF, Mason WS. Hepadnaviruses. 2013. In: Fields Virology [Internet]. Philadelphia. Lippincott Williams and Wilkins. 6ta edición. [2186-221].
28. Robinson WS, Lutwick LI. The virus of hepatitis, type B (first of two parts). The New England journal of medicine. 1976;295(21):1168-75.
29. Robinson WS, Lutwick LI. The virus of hepatitis, type B. (Second of two parts). The New England journal of medicine. 1976;295(22):1232-6.
30. Huang TJ, Lu CC, Tsai JC, Yao WJ, Lu X, Lai MD, et al. Novel autoregulatory function of hepatitis B virus M protein on surface gene expression. The Journal of biological chemistry. 2005;280(30):27742-54.
31. Gish RG, Given BD, Lai CL, Locarnini SA, Lau JY, Lewis DL, et al. Chronic hepatitis B: Virology, natural history, current management and a glimpse at future opportunities. Antiviral research. 2015;121:47-58.
32. Inoue T, Tanaka Y. Hepatitis B virus and its sexually transmitted infection - an update. Microbial cell (Graz, Austria). 2016;3(9):420-37.
33. Tong S, Revill P. Overview of hepatitis B viral replication and genetic variability. Journal of hepatology. 2016;64(1 Suppl):S4-s16.
34. Walsh R, Locarnini S. Hepatitis B precore protein: pathogenic potential and therapeutic promise. Yonsei medical journal. 2012;53(5):875-85.
35. Summers J, O'Connell A, Millman I. Genome of hepatitis B virus: restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1975;72(11):4597-601.
36. Jones SA, Hu J. Hepatitis B virus reverse transcriptase: diverse functions as classical and emerging targets for antiviral intervention. Emerging microbes & infections. 2013;2(9):e56.
37. Minor MM, Hollinger FB, McNees AL, Jung SY, Jain A, Hyser JM, et al. Hepatitis B Virus HBx Protein Mediates the Degradation of Host Restriction Factors through the Cullin 4 DDB1 E3 Ubiquitin Ligase Complex. Cells. 2020;9(4).

38. Tang H, Oishi N, Kaneko S, Murakami S. Molecular functions and biological roles of hepatitis B virus x protein. *Cancer science*. 2006;97(10):977-83.
39. Gao W, Jia Z, Tian Y, Yang P, Sun H, Wang C, et al. HBx Protein Contributes to Liver Carcinogenesis by H3K4me3 Modification Through Stabilizing WD Repeat Domain 5 Protein. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2020;71(5):1678-95.
40. Courouc -Pauty AM, Lemaire JM, Roux JF. New hepatitis B surface antigen subtypes inside the ad category. *Vox sanguinis*. 1978;35(5):304-8.
41. Croagh CM, Desmond PV, Bell SJ. Genotypes and viral variants in chronic hepatitis B: A review of epidemiology and clinical relevance. *World journal of hepatology*. 2015;7(3):289-303.
42. Kramvis A. Genotypes and genetic variability of hepatitis B virus. *Intervirolgy*. 2014;57(3-4):141-50.
43. Yuen MF, Lai CL. Hepatitis B virus genotypes: natural history and implications for treatment. *Expert review of gastroenterology & hepatology*. 2007;1(2):321-8.
44. Kramvis A, Arakawa K, Yu MC, Nogueira R, Stram DO, Kew MC. Relationship of serological subtype, basic core promoter and precore mutations to genotypes/subgenotypes of hepatitis B virus. *Journal of medical virology*. 2008;80(1):27-46.
45. Norder H, Courouc  AM, Coursaget P, Echevarria JM, Lee SD, Mushahwar IK, et al. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirolgy*. 2004;47(6):289-309.
46. Echevarr a JM, Avell n A, Magnius LO. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Spain: identification of viral genotypes and prediction of antigenic subtypes by limited sequencing. *Journal of medical virology*. 2005;76(2):176-84.
47. Liu T, Wang F, Zhang S, Wang F, Meng Q, Zhang G, et al. Whole-gene analysis of two groups of hepatitis B virus C/D inter-genotype recombinant strains isolated in Tibet, China. *PloS one*. 2017;12(6):e0179846.
48. Wai CT, Fontana RJ. Clinical significance of hepatitis B virus genotypes, variants, and mutants. *Clinics in liver disease*. 2004;8(2):321-52, vi.
49. Di Lello FA, Ridruejo E, Mart nez AP, P rez PS, Campos RH, Flichman DM. Molecular epidemiology of hepatitis B virus mutants associated with vaccine escape, drug resistance and diagnosis failure. *Journal of viral hepatitis*. 2019;26(5):552-60.
50. Jacquet S, Pons JB, De Bernardo A, Ngoubangoye B, Cosset FL, R gis C, et al. Evolution of Hepatitis B Virus Receptor NTCP Reveals Differential Pathogenicities and Species Specificities of Hepadnaviruses in Primates, Rodents, and Bats. *Journal of virology*. 2019;93(5).

51. Yan H, Li W. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide acts as a receptor for hepatitis B and D virus. *Digestive diseases* (Basel, Switzerland). 2015;33(3):388-96.
52. Yeh CT, Wong SW, Fung YK, Ou JH. Cell cycle regulation of nuclear localization of hepatitis B virus core protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90(14):6459-63.
53. Aiba N, McGarvey MJ, Waters J, Hadziyannis SJ, Thomas HC, Karayiannis P. The precore sequence of hepatitis B virus is required for nuclear localization of the core protein. *Hepatology* (Baltimore, Md). 1997;26(5):1311-7.
54. Summers J, Mason WS. Replication of the genome of a hepatitis B--like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell*. 1982;29(2):403-15.
55. Urban S, Schulze A, Dandri M, Petersen J. The replication cycle of hepatitis B virus. *Journal of hepatology*. 2010;52(2):282-4.
56. Yuen MF, Chen DS, Dusheiko GM, Janssen HLA, Lau DTY, Locarnini SA, et al. Hepatitis B virus infection. *Nature reviews Disease primers*. 2018;4:18035.
57. Chang J, Block TM, Guo JT. The innate immune response to hepatitis B virus infection: implications for pathogenesis and therapy. *Antiviral research*. 2012;96(3):405-13.
58. Zou ZQ, Wang L, Wang K, Yu JG. Innate immune targets of hepatitis B virus infection. *World journal of hepatology*. 2016;8(17):716-25.
59. Wang S, Chen Z, Hu C, Qian F, Cheng Y, Wu M, et al. Hepatitis B virus surface antigen selectively inhibits TLR2 ligand-induced IL-12 production in monocytes/macrophages by interfering with JNK activation. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 2013;190(10):5142-51.
60. Xia Y, Protzer U. Control of Hepatitis B Virus by Cytokines. *Viruses*. 2017;9(1).
61. Shin EC, Sung PS, Park SH. Immune responses and immunopathology in acute and chronic viral hepatitis. *Nature reviews Immunology*. 2016;16(8):509-23.
62. Li X, Wang Y, Chen Y. Cellular immune response in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Microbial pathogenesis*. 2014;74:59-62.
63. Revill P, Yuan Z. New insights into how HBV manipulates the innate immune response to establish acute and persistent infection. *Antiviral therapy*. 2013;18(1):1-15.
64. Lebossé F, Testoni B, Fresquet J, Facchetti F, Galmozzi E, Fournier M, et al. Intrahepatic innate immune response pathways are downregulated in untreated chronic hepatitis B. *Journal of hepatology*. 2017;66(5):897-909.

65. Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. Microbiology and molecular biology reviews : MMBR. 2000;64(1):51-68.
66. Wu M, Xu Y, Lin S, Zhang X, Xiang L, Yuan Z. Hepatitis B virus polymerase inhibits the interferon-inducible MyD88 promoter by blocking nuclear translocation of Stat1. The Journal of general virology. 2007;88(Pt 12):3260-9.
67. Milich D, Liang TJ. Exploring the biological basis of hepatitis B e antigen in hepatitis B virus infection. Hepatology (Baltimore, Md). 2003;38(5):1075-86.
68. Li X, Kong H, Tian L, Zhu Q, Wang Y, Dong Y, et al. Changes of costimulatory molecule CD28 on circulating CD8+ T cells correlate with disease pathogenesis of chronic hepatitis B. BioMed research international. 2014;2014:423181.
69. Webster GJ, Reignat S, Brown D, Ogg GS, Jones L, Seneviratne SL, et al. Longitudinal analysis of CD8+ T cells specific for structural and nonstructural hepatitis B virus proteins in patients with chronic hepatitis B: implications for immunotherapy. Journal of virology. 2004;78(11):5707-19.
70. Boni C, Fisicaro P, Valdatta C, Amadei B, Di Vincenzo P, Giuberti T, et al. Characterization of hepatitis B virus (HBV)-specific T-cell dysfunction in chronic HBV infection. Journal of virology. 2007;81(8):4215-25.
71. Nguyen MH, Wong G, Gane E, Kao JH, Dusheiko G. Hepatitis B Virus: Advances in Prevention, Diagnosis, and Therapy. Clinical microbiology reviews. 2020;33(2).
72. Coffin CS, Zhou K, Terrault NA. New and Old Biomarkers for Diagnosis and Management of Chronic Hepatitis B Virus Infection. Gastroenterology. 2019;156(2):355-68.e3.
73. Morgan M, Park W, Keeffe EB. Diagnosis and treatment of chronic hepatitis B: an update. Minerva gastroenterologica e dietologica. 2007;53(1):25-41.
74. Mast EE, Margolis HS, Fiore AE, Brink EW, Goldstein ST, Wang SA, et al. A comprehensive immunization strategy to eliminate transmission of hepatitis B virus infection in the United States: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) part 1: immunization of infants, children, and adolescents. MMWR Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report Recommendations and reports. 2005;54(Rr-16):1-31.
75. Chen P, Xie Q, Lu X, Yu C, Xu K, Ruan B, et al. Serum HBeAg and HBV DNA levels are not always proportional and only high levels of HBeAg most likely correlate with high levels of HBV DNA: A community-based study. Medicine. 2017;96(33):e7766.

76. Chevaliez S, Dauvillier C, Dubernet F, Poveda JD, Laperche S, Hézode C, et al. The New Aptima HBV Quant Real-Time TMA Assay Accurately Quantifies Hepatitis B Virus DNA from Genotypes A to F. *Journal of clinical microbiology*. 2017;55(4):1211-9.
77. Fopa D, Candotti D, Tagny CT, Doux C, Mbanya D, Murphy EL, et al. Occult hepatitis B infection among blood donors from Yaoundé, Cameroon. *Blood transfusion = Trasfusione del sangue*. 2019;17(6):403-8.
78. Akinbami A, Badiru M, Uche E, Onyekwere C, Ismail K, Olowoselu O, et al. The Prevalence of Occult Hepatitis B Infection among Blood Donors in Lagos, Nigeria. *Nigerian medical journal : journal of the Nigeria Medical Association*. 2019;60(1):22-6.
79. Candotti D, Laperche S. Hepatitis B Virus Blood Screening: Need for Reappraisal of Blood Safety Measures? *Frontiers in medicine*. 2018;5:29.
80. Louisirirochanakul S, Khupulsup K, Akraekthalin S, Chan KP, Saw S, Aw TC, et al. Comparison of the technical and clinical performance of the Elecsys HBsAg II assay with the Architect, AxSym, and Advia Centaur HBsAg screening assays. *Journal of medical virology*. 2010;82(5):755-62.
81. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *Journal of hepatology*. 2017;67(2):370-98.
82. Terrault NA, Lok ASF, McMahon BJ, Chang KM, Hwang JP, Jonas MM, et al. Update on prevention, diagnosis, and treatment of chronic hepatitis B: AASLD 2018 hepatitis B guidance. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2018;67(4):1560-99.
83. Wong VW, Chan SL, Mo F, Chan TC, Loong HH, Wong GL, et al. Clinical scoring system to predict hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B carriers. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(10):1660-5.
84. Wong GL, Chan HL, Chan HY, Tse PC, Tse YK, Mak CW, et al. Accuracy of risk scores for patients with chronic hepatitis B receiving entecavir treatment. *Gastroenterology*. 2013;144(5):933-44.
85. Buster EH, Hansen BE, Lau GK, Piratvisuth T, Zeuzem S, Steyerberg EW, et al. Factors that predict response of patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B to peginterferon-alfa. *Gastroenterology*. 2009;137(6):2002-9.
86. Rijckborst V, Hansen BE, Ferenci P, Brunetto MR, Tabak F, Cakaloglu Y, et al. Validation of a stopping rule at week 12 using HBsAg and HBV DNA for HBeAg-negative patients treated with peginterferon alfa-2a. *Journal of hepatology*. 2012;56(5):1006-11.

87. Yang HC, Kao JH. Persistence of hepatitis B virus covalently closed circular DNA in hepatocytes: molecular mechanisms and clinical significance. *Emerging microbes & infections*. 2014;3(9):e64.
88. Kumar R, Pérez-Del-Pulgar S, Testoni B, Lebossé F, Zoulim F. Clinical relevance of the study of hepatitis B virus covalently closed circular DNA. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2016;36 Suppl 1:72-7.
89. Laras A, Koskinas J, Dimou E, Kostamena A, Hadziyannis SJ. Intrahepatic levels and replicative activity of covalently closed circular hepatitis B virus DNA in chronically infected patients. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2006;44(3):694-702.
90. van Bömmel F, Bartens A, Mysickova A, Hofmann J, Krüger DH, Berg T, et al. Serum hepatitis B virus RNA levels as an early predictor of hepatitis B envelope antigen seroconversion during treatment with polymerase inhibitors. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2015;61(1):66-76.
91. Honda M, Shirasaki T, Terashima T, Kawaguchi K, Nakamura M, Oishi N, et al. Hepatitis B Virus (HBV) Core-Related Antigen During Nucleos(t)ide Analog Therapy Is Related to Intra-hepatic HBV Replication and Development of Hepatocellular Carcinoma. *The Journal of infectious diseases*. 2016;213(7):1096-106.
92. Matsumoto A, Tanaka E, Minami M, Okanoue T, Yatsushashi H, Nagaoka S, et al. Low serum level of hepatitis B core-related antigen indicates unlikely reactivation of hepatitis after cessation of lamivudine therapy. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology*. 2007;37(8):661-6.
93. Jung KS, Park JY, Chon YE, Kim HS, Kang W, Kim BK, et al. Clinical outcomes and predictors for relapse after cessation of oral antiviral treatment in chronic hepatitis B patients. *Journal of gastroenterology*. 2016;51(8):830-9.
94. Kennedy PTF, Litwin S, Dolman GE, Bertoletti A, Mason WS. Immune Tolerant Chronic Hepatitis B: The Unrecognized Risks. *Viruses*. 2017;9(5).
95. Ni YH. Natural history of hepatitis B virus infection: pediatric perspective. *Journal of gastroenterology*. 2011;46(1):1-8.
96. Burns GS, Thompson AJ. Viral hepatitis B: clinical and epidemiological characteristics. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2014;4(12):a024935.
97. Trépo C, Chan HL, Lok A. Hepatitis B virus infection. *Lancet (London, England)*. 2014;384(9959):2053-63.
98. Cheng J, Dai Y, Yan L, Zhou H, Xu X, Sun C, et al. Clinical Characteristics and Correlation Analysis of Subjects with Chronic Hepatitis B Virus (HBV) Infection and Sustained Low Levels of Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg). *Medical science*

monitor : international medical journal of experimental and clinical research. 2018;24:1826-35.

99. Hadziyannis SJ. Natural history of chronic hepatitis B in Euro-Mediterranean and African countries. *Journal of hepatology*. 2011;55(1):183-91.

100. Milich DR. The Concept of Immune Tolerance in Chronic Hepatitis B Virus Infection Is Alive and Well. *Gastroenterology*. 2016;151(5):801-4.

101. Koshino Y, Shinozaki Y, Wada T. Occult Hepatitis B Virus Infection With Increased Virus DNA Levels in a Chronic Hemodialysis Patient. *Therapeutic apheresis and dialysis : official peer-reviewed journal of the International Society for Apheresis, the Japanese Society for Apheresis, the Japanese Society for Dialysis Therapy*. 2018;22(1):91-2.

102. Sunbul M. Hepatitis B virus genotypes: global distribution and clinical importance. *World journal of gastroenterology*. 2014;20(18):5427-34.

103. Chen T, Yang Z, Choudhury AK, Al Mahtab M, Li J, Chen Y, et al. Complications constitute a major risk factor for mortality in hepatitis B virus-related acute-on-chronic liver failure patients: a multi-national study from the Asia-Pacific region. *Hepatology international*. 2019;13(6):695-705.

104. Chen G, Lin W, Shen F, Iloeje UH, London WT, Evans AA. Past HBV viral load as predictor of mortality and morbidity from HCC and chronic liver disease in a prospective study. *The American journal of gastroenterology*. 2006;101(8):1797-803.

105. Bertoletti A, Kennedy PTF, Durantel D. HBV infection and HCC: the 'dangerous liaisons'. *Gut*. 2018;67(5):787-8.

106. World Health O. Global hepatitis report, 2017. 2017 978-92-4-156545-5.

107. Schweitzer A, Horn J, Mikolajczyk RT, Krause G, Ott JJ. Estimations of worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection: a systematic review of data published between 1965 and 2013. *Lancet (London, England)*. 2015;386(10003):1546-55.

108. Ott JJ, Stevens GA, Groeger J, Wiersma ST. Global epidemiology of hepatitis B virus infection: new estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity. *Vaccine*. 2012;30(12):2212-9.

109. Ni YH, Chang MH, Jan CF, Hsu HY, Chen HL, Wu JF, et al. Continuing Decrease in Hepatitis B Virus Infection 30 Years After Initiation of Infant Vaccination Program in Taiwan. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2016;14(9):1324-30.

110. Tamandjou CR, Maponga TG, Chotun N, Preiser W, Andersson MI. Is hepatitis B birth dose vaccine needed in Africa? The Pan African medical journal. 2017;27(Suppl 3):18.
111. Amini-Bavil-Olyaei S, Sarraimi-Forooshani R, Mahboudi F, Sabahi F, Adeli A, Noorinayer B, et al. Genotype characterization and phylogenetic analysis of hepatitis B virus isolates from Iranian patients. Journal of medical virology. 2005;75(2):227-34.
112. Fontes AM, Ardisson JS, Souza MA, Freitas RR, Pancoto JA. Epidemiology of hepatitis B virus in the cities of the northern region of Espírito Santo, Brazil. Anais da Academia Brasileira de Ciencias. 2016;88(3):1549-55.
113. Forbi JC, Dillon M, Purdy MA, Drammeh BS, Tejada-Strop A, McGovern D, et al. Molecular epidemiology of hepatitis B virus infection in Tanzania. The Journal of general virology. 2017;98(5):1048-57.
114. Liu T, Wang F, Zhang S, Wang F, Meng QL, Zhang G, et al. Whole-gene analysis of two groups of hepatitis B virus C/D inter-genotype recombinant strains isolated in Tibet, China. PLoS ONE. 2017;12(6):11.
115. Mixson-Hayden T, Lee D, Ganova-Raeva L, Drobeniuc J, Stauffer WM, Teshale E, et al. Hepatitis B virus and hepatitis C virus infections in United States-bound refugees from Asia and Africa. The American journal of tropical medicine and hygiene. 2014;90(6):1014-20.
116. Rodríguez L, Bello M, Montalvo M, Sariego S, Sánchez M, Valdés L, et al. Genetic diversity of the Hepatitis B virus strains in Cuba: absence of West-African genotypes despite the transatlantic slave trade. . PLOS ONE 2016;15(6):983-1022.
117. Yin X, Han G, Zhang H, Wang M, Zhang W, Gao Y, et al. A Real-world Prospective Study of Mother-to-child Transmission of HBV in China Using a Mobile Health Application (Shield 01). Journal of clinical and translational hepatology. 2020;8(1):1-8.
118. Haussig JM, Nielsen S, Gassowski M, Bremer V, Marcus U, Wenz B, et al. A large proportion of people who inject drugs are susceptible to hepatitis B: Results from a bio-behavioural study in eight German cities. Int J Infect Dis. 2017;66(43):5-13.
119. Debes JD, Kayandabila J, Pogemiller H. Knowledge of Hepatitis B Transmission Risks Among Health Workers in Tanzania. The American journal of tropical medicine and hygiene. 2016;94(5):1100-2.
120. Yassin MH, Gupta V, Li Z, Zhang D, Gao J, Li WX, et al. Role of infection control in prevention of hepatitis B virus (HBV) in hemodialysis (HD) patients. Infect Disord Drug Targets. 2013;13(3):162-8.

121. Zhu S, Feng Y, Rao P, Xue X, Chen S, Li W, et al. Hepatitis B virus surface antigen as delivery vector can enhance Chlamydia trachomatis MOMP multi-epitope immune response in mice. New therapeutic vaccination strategies for the treatment of chronic hepatitis B. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014;98(9):4107-17.
122. Chonwattana W, Raengsakulrach B, Holtz TH, Wasinrapee P, Tongtoyai J, Chaikummao S, et al. Hepatitis B vaccination uptake and correlates of serologic response among HIV-infected and uninfected men who have sex with men (MSM) in Bangkok, Thailand. *Vaccine*. 2016;34(17):2044-50.
123. Magalhães RLB, Teles SA, Reis RK, Galvão MTG, Gir E. Low completion rate of hepatitis B vaccination in female sex workers. *Revista brasileira de enfermagem*. 2017;70(3):489-94.
124. Vet R, de Wit JB, Das E. Factors associated with hepatitis B vaccination among men who have sex with men: a systematic review of published research. *International journal of STD & AIDS*. 2017;28(6):534-42.
125. Utsumi T, Pranawa, Lusida MI, Yano Y, Wahyuni RM, Istimagfiroh A, et al. PREVALENCE AND RISK FACTORS OF HEPATITIS B AND C VIRUS INFECTIONS AMONG HEMODIALYSIS PATIENTS FROM PRIVATE HEMODIALYSIS UNITS IN SURABAYA, INDONESIA. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*. 2016;47(5):927-34.
126. Samadi E, Mirshahabi H, Motamed N, Sadeghi H. Prevalence of Occult Hepatitis B Virus Infection in Hemodialysis Patients Using Nested PCR. *Reports of biochemistry & molecular biology*. 2020;9(1):82-8.
127. Nayagam S, Shimakawa Y, Lemoine M. Mother-to-child transmission of hepatitis B: What more needs to be done to eliminate it around the world? *Journal of viral hepatitis*. 2020;27(4):342-9.
128. Tenney DJ, Rose RE, Baldick CJ, Pokornowski KA, Eggers BJ, Fang J, et al. Long-term monitoring shows hepatitis B virus resistance to entecavir in nucleoside-naïve patients is rare through 5 years of therapy. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2009;49(5):1503-14.
129. Aggarwal R, Ranjan P. Preventing and treating hepatitis B infection. *BMJ (Clinical research ed)*. 2004;329(7474):1080-6.
130. Schillie SF, Murphy TV. Seroprotection after recombinant hepatitis B vaccination among newborn infants: a review. *Vaccine*. 2013;31(21):2506-16.
131. World Health O. Hepatitis B vaccines: WHO position paper, July 2017 - Recommendations. *Vaccine*. 2019;37(2):223-5.

132. Hernandez-Bernal F, Aguilar-Betancourt A, Aljovin V, Arias G, Valenzuela C, de Alejo KP, et al. Comparison of four recombinant hepatitis B vaccines applied on an accelerated schedule in healthy adults. *Hum Vaccin*. 2011;7(10):1026-36.
133. Capeding MR, Alberto E, Versteilen A, Rauscher M, Bagchi P, Palacios PI. Comparison of the immunogenicity and safety of pentavalent vaccine Quinvaxem in a compact prefilled auto-disabled (cPAD) injection system versus single-dose vials in healthy infants: a phase 3, open-label, randomized, parallel-group, non-inferiority study. *Int J Infect Dis*. 2016;46(1):71-8.
134. Estévez ZC, Betancourt AA, González VM, Baile NF, Silva CV, Bernal FH, et al. Immunogenicity and safety assessment of the Cuban recombinant hepatitis B vaccine in healthy adults. *Biologicals*. 2007;35(2):115-22.
135. González V, González A, Ramírez V, González A. Inmunogenicidad de la vacuna cubana recombinante heberbiovac HB en modelos experimentales y aplicados al humano. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 2000;19:34-44.
136. Kramvis A. The clinical implications of hepatitis B virus genotypes and HBeAg in pediatrics. *Reviews in medical virology*. 2016;26(4):285-303.
137. Haussig JM, Nielsen S, Gassowski M, Bremer V, Marcus U, Wenz B, et al. A large proportion of people who inject drugs are susceptible to hepatitis B: Results from a bio-behavioural study in eight German cities. *Int J Infect Dis*. 2017;66:5-13.
138. Fryer JF HA, Wilkinson DE, Minor PD. . A collaborative study to establish the 3rd WHO international standard for hepatitis B virus for nucleic acid amplification techniques. *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization*. 2016(46):57-63.
139. Jacqueline F. Fryer 1, Rehan Minhas 1, Thomas Dougall 2, Peter Rigsby 2, Clare L. Morris 1 and the Collaborative Study Group. Collaborative Study to Evaluate the Proposed WHO 4th International Standard for Hepatitis B Virus (HBV) DNA for Nucleic Acid Amplification Technique (NAT) based assays WHO ECBS Report 2016 Contract No.: WHO/BS/2016.2291
140. E. B. Validation of laboratory developed molecular assays for infectious diseases. *Clin Microbiol Rev*. 2010(23):570-6.
141. Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA dermatology*. 2018;310(20):2191-4.
142. Van Delden J VdGR. Revised CIOMS International Ethical Guidelines for HealthRelated Research Involving Humans. *JAMA dermatology*. 2016;317(2):135-6.

143. El-Serag HB, Mason AC. Risk factors for the rising rates of primary liver cancer in the United States. *Archives of internal medicine*. 2000;160(21):3227-30.
144. KASL clinical practice guidelines for management of chronic hepatitis B. *Clinical and molecular hepatology*. 2019;25(2):93-159.
145. Ohkubo K, Kato Y, Ichikawa T, Kajiya Y, Takeda Y, Higashi S, et al. Viral load is a significant prognostic factor for hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Cancer*. 2002;94(10):2663-8.
146. Xing YF, Zhou DQ, He JS, Wei CS, Zhong WC, Han ZY, et al. Clinical and histopathological features of chronic hepatitis B virus infected patients with high HBV-DNA viral load and normal alanine aminotransferase level: A multicentre-based study in China. *PloS one*. 2018;13(9):e0203220.
147. Huang R, Wang J, Yan X, Xia J, Wu C. Letter: risk of developing hepatocellular carcinoma in untreated HBeAg-negative chronic hepatitis B patients with high viral load and no significant ALT elevation. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2019;50(5):618-9.
148. Pollicino T, Cacciola I, Saffioti F, Raimondo G. Hepatitis B virus PreS/S gene variants: pathobiology and clinical implications. *Journal of hepatology*. 2014;61(2):408-17.
149. Han Z, Liu Y, Pan J, Bi Y, Liu J, Zhou YH. Occult hepatitis B virus infection with positive hepatitis B e antigen. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2015;438:266-8.
150. Chen J, Liu Y, Zhao J, Xu Z, Chen R, Si L, et al. Characterization of Novel Hepatitis B Virus PreS/S-Gene Mutations in a Patient with Occult Hepatitis B Virus Infection. *PloS one*. 2016;11(5):e0155654.
151. Armas Cayarga A, Perea Hernández Y, González González YJ, Figueredo Lago JE, Valdivia Álvarez IY, Gómez Cordero I, et al. Performance characteristics of a fast real-time PCR assay for hepatitis B virus DNA quantification. *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization*. 2019;58:22-7.
152. Enjalbert F KD, Candotti D, et al. Comparison of seven hepatitis B virus (HBV) nucleic acid testing assays in selected samples with discrepant HBV marker results from United States blood donors. . *Transfusion*. 2014;54:2485-95.
153. Rodríguez Lay LA, Corredor MB, Villalba MC, Frómeta SS, Wong MS, Valdes L, et al. Genetic Diversity of the Hepatitis B Virus Strains in Cuba: Absence of West-African Genotypes despite the Transatlantic Slave Trade. *PloS one*. 2015;10(5):e0125052.

154. Fryer JF, Heath AB, Wilkinson DE, Minor PD. A collaborative study to establish the 3rd WHO International Standard for hepatitis B virus for nucleic acid amplification techniques. *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization*. 2017;46:57-63.
155. Baylis SA, Wallace P, McCulloch E, Niesters HGM, Nübling CM. Standardization of Nucleic Acid Tests: the Approach of the World Health Organization. *Journal of clinical microbiology*. 2019;57(1).
156. E. B. Validation of laboratory developed molecular assays for infectious diseases. *Clinical microbiology reviews*. 2010;23(570-576).
157. Ding C CC. Quantitative analysis of nucleic acids-the last few years of progress. . *Journal of biochemistry, molecular biology, and biophysics : JBMBB : the official journal of the Federation of Asian and Oceanian Biochemists and Molecular Biologists (FAOBMB)*. 2004;37(1):1-10.
158. Weber J, Sahoo MK, Taylor N, Uy E, Shi RZ, Pinsky BA. Comparison of Transcription-Mediated Amplification and Real-Time PCR Assays for Hepatitis B Virus DNA Quantitation in Serum. *The journal of applied laboratory medicine*. 2019;4(3):383-90.
159. Yeh ML, Huang CF, Hsieh MY, Huang JF, Dai CY, Yu ML, et al. Comparison of the Abbott RealTime HBV assay with the Roche Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HBV assay for HBV DNA detection and quantification. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2014;60(3):206-14.
160. Kim H, Hur M, Bae E, Lee KA, Lee WI. Performance evaluation of cobas HBV real-time PCR assay on Roche cobas 4800 System in comparison with COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV Test. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2018;56(7):1133-9.
161. Bonanzinga S, Onelia F, Jackson K, Glass A, Maree L, Krügel M, et al. Multicenter clinical evaluation of alinity m HBV assay performance. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2020;129:104514.
162. Pawlotsky JM. Hepatitis B virus (HBV) DNA assays (methods and practical use) and viral kinetics. *Journal of hepatology*. 2003;39 Suppl 1:S31-5.
163. Santos AP, Levi JE, Lemos MF, Calux SJ, Oba IT, Moreira RC. An in-house real-time polymerase chain reaction: standardisation and comparison with the Cobas Amplicor HBV monitor and Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HBV tests for the quantification of hepatitis B virus DNA. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2016;111(2):134-40.

164. Yeh ML, Huang CF, Huang CI, Liu SF, Yang HL, Hsieh MY, et al. Abbott RealTime HBV assay is more sensitive in detection of low viral load and little impacted by drug resistant mutation in chronic hepatitis B patients under nucleot(s)ide analogues therapy. PloS one. 2014;9(7):e101790.
165. Hernández-Lalinde J E-CJ, Penaloza-Tarazona ME, Díaz-Camargo E, BautistaSandoval M, Riaño-Garzón ME, et al. Sobre el uso adecuado del coeficiente de correlación de Pearson: verificación de supuestos mediante un ejemplo aplicado a las ciencias de la salud. Arch Venez de Farmacol y Terapeut 2018;37(5):434-43.
166. Lall S, Choudhary MC, Mahajan S, Kumar G, Gupta E. Performance evaluation of TRUPCR(®) HBV Real-time PCR assay for Hepatitis B virus DNA quantification in clinical samples: report from a tertiary care liver centre. Virusdisease. 2019;30(2):186-92.
167. Lall S. CM, Mahajan S., Kumar G., Gupta E. Performance evaluation of TRUPCR HBV Real-time PCR assay for Hepatitis B virus DNA quantification in clinical samples: report from a tertiary care liver centre. Virus Disease. 2019;30(2):186-92.
168. Édgar Cortés-Reyes TF JAR-R, Hernando Gaitán-Duarte. MÉTODOS ESTADÍSTICOS DE EVALUACIÓN DE LA CONCORDANCIA Y LA REPRODUCIBILIDAD DE PRUEBAS DIAGNÓSTICAS Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología 2010;61(3):247-55.
169. Kopp-Schneider A HT. How to evaluate agreement between quantitative measurements. Radiother Oncol. 2019;141:321-6.
170. Gabriel C. Concordancia Parte II: el método de Bland-Altman. Rev chil endocrinol diabetes 2013;6(3):127-8.
171. D. G. Understanding Bland Altman analysis Biochemia medica. 2015;25(2):141-51.
172. Madihi S, Syed H, Lazar F, Zyad A, Benani A. Performance Comparison of the artus HBV QS-RGQ and the CAP/CTM HBV v2.0 Assays regarding Hepatitis B Virus DNA Quantification. BioMed research international. 2020;2020:4159189.
173. Pública. MdS. Plan Estratégico Nacional para la prevención y control de las ITS, el VIH y las hepatitis 2019-2023.La Habana: Ministerio de Salud Pública. 2019:159-65.
174. Winston A WA, Gordon C, Goyal N. . Viral hepatitis in patients on hemodialysis. Seminars in dialysis. 2020;00:1-9.
175. Susel Sariego Frómeta EVM, Marité Bello Corredor, María Caridad Montalvo Villalba, Alberto Bali, Meilin Sánchez Wong, Bárbara Marrero Sánchez, Licel de los

Ángeles Rodríguez Lay. Infección oculta por el virus de la hepatitis B en pacientes hemodializados cubanos. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 2016;68(3) 2016;68(3):179-90.

176. Cordova E, Miglia I, Festuccia F, Sarlo MG, Scornavacca G, Punzo G, et al. Hepatitis B vaccination in haemodialysis patients: an underestimated problem. Factors influencing immune responses in ten years of observation in an Italian haemodialysis centre and literature review. *Annali di igiene : medicina preventiva e di comunita.* 2017;29(1):27-37.

177. Garthwaite E, Reddy V, Douthwaite S, Lines S, Tyerman K, Eccles J. Clinical practice guideline management of blood borne viruses within the haemodialysis unit. *BMC nephrology.* 2019;20(1):388.

178. Montalvo MC, Delgado G, Díaz M, de los Angeles Rodríguez Lay L. [Prevalence of hepatitis B virus markers and risk factors associated in haemodialysis patients from Havana City; 2002-2003]. *Nefrologia : publicacion oficial de la Sociedad Espanola Nefrologia.* 2007;27(2):234-5.

179. Minh C Duong VTTN, Satoko Otsu and Mary-Louise McLaws. Prevalence of hepatitis B and C virus infections in hemodialysis patients in Vietnam: A systematic review and meta-analysis *Journal of gastroenterology and hepatology.* 2019:1-10.

180. Musa M. D. AHK. Prevalence of overt and occult hepatitis B virus infections among 135 haemodialysis patients attending a haemodialysis centre at Al-Nasiriyah city, Iraq IRAN *J MICROBIOL.* 2020;12(5):475-82.

181. Enjalbert F KD, Candotti D, et al. . Comparison of seven hepatitis B virus (HBV) nucleic acid testing assays in selected samples with discrepant HBV marker results from United States blood donors. . *Transfusion.* 2014;54:2485-95.

182. Zhou K, Terrault N. Management of hepatitis B in special populations. *Best practice & research Clinical gastroenterology.* 2017;31(3):311-20.

183. Edmunds WJ, Medley GF, Nokes DJ, Hall AJ, Whittle HC. The influence of age on the development of the hepatitis B carrier state. *Proceedings Biological sciences.* 1993;253(1337):197-201.

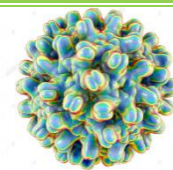
184. Cheung KW, Seto MTY, So PL, Wong D, Mak ASL, Lau WL, et al. Optimal timing of hepatitis B virus DNA quantification and clinical predictors for higher viral load during pregnancy. *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica.* 2019;98(10):1301-6.

185. Terrault NA, Levy MT, Cheung KW, Jourdain G. Viral hepatitis and pregnancy. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology.* 2020.

186. Terrault NA, Feld JJ, Lok ASF. Tenofovir to Prevent Perinatal Transmission of Hepatitis B. *The New England journal of medicine*. 2018;378(24):2348-9.
187. Sirilert S, Tongsong T. Hepatitis B Virus Infection in Pregnancy: An Update on Evidence-Based Management. *Obstetrical & gynecological survey*. 2020;75(9):557-65.
188. [Management algorithm for interrupting mother-to-child transmission of hepatitis B]. *Zhonghua gan zang bing za zhi = Zhonghua ganzangbing zazhi = Chinese journal of hepatology*. 2017;25(4):254-6.
189. Cryer AM, Imperial JC. Hepatitis B in Pregnant Women and their Infants. *Clinics in liver disease*. 2019;23(3):451-62.
190. Berkem R, Karakoç AE. Safer Blood Supply for Transfusion: Which Algorithm Should Be Used to Determine Occult Hepatitis B Infection in Blood Donors? *Clinical laboratory*. 2019;65(5).
191. Rosa María Ruiz-Calero Cendrero BCC, María Victoria Martín Hidalgo-Barquero, María Cruz Cid Parra, Josefa Galán González, María Antonia Fernández Solís y Olga Sánchez García. ¿Cuándo puede ser útil buscar VHB oculto en pacientes en hemodiálisis? *Nefrología : publicación oficial de la Sociedad Española Nefrología*. 2020;40(2):115-9.
192. Soriano V, Aguilera A, Gonzalez R, Gomez-Gallego F, Barea L, Treviño M, et al. Occult hepatitis B and HIV infection. *European journal of gastroenterology & hepatology*. 2019;31(11):1403-7.
193. Fabrizi F, Lunghi G, Alongi G, Aucella F, Barbisoni F, Bisegna S, et al. Kinetics of Hepatitis B virus load during haemodialysis sessions and α -interferon: a prospective study. *Kidney & blood pressure research*. 2013;37(4-5):286-94.
194. Busch K, Thimme R. Natural history of chronic hepatitis B virus infection. *Medical microbiology and immunology*. 2015;204(1):5-10.
195. Chu CJ, Hussain M, Lok AS. Quantitative serum HBV DNA levels during different stages of chronic hepatitis B infection. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2002;36(6):1408-15.

CAPÍTULO VIII

ANEXOS



VIII. ANEXOS

Anexo 1

Marcadores serológicos empleados en el diagnóstico de laboratorio de la infección por VHB.

Marcador diagnóstico	Nombre	Descripción e interpretación clínica
HBsAg	Antígeno de superficie del VHB	Es el primer marcador que se detecta en suero. Si está presente al mismo tiempo que los anticuerpos IgM anti-HBcAg indica infección aguda. Si se mantiene positivo por más de 6 meses, indica infección crónica. Se negativiza cuando se resuelve la hepatitis B.
HBeAg	Antígeno e del VHB	Puede detectarse tanto en la fase aguda como en la infección crónica. Indica replicación viral activa. Está asociado con la alta infectividad. Cuando es reactivo por más de 6 meses indica infección crónica.
Anti-HBsAg	Anticuerpos contra el AgsHB	Son detectables de 1 a 3 meses después de la vacunación: valores < 10 UI/L indican que no hay protección; ≥10 UI/L indican seroprotección; ≥1000 indican hiperrespuestas. Son los últimos marcadores que aparecen en suero, indican recuperación e inmunidad.
Anti-HBeAg	Anticuerpos contra el AgeHB	Aparecen cuando el HBeAg ya no es detectable. Indican un pronóstico favorable.
IgM anti-HBcAg	Anticuerpos contra el AgcHB	Son la primera clase de anticuerpos detectables en un paciente infectado, indica infección reciente. Puede permanecer reactivo hasta 6 meses.
Anti-HBcAg	Anticuerpos totales contra el AgcHB	Se mantienen reactivos durante años. Indican una infección pasada o crónica. No se inducen por la vacunación ni indican inmunidad. Puede ser el único marcador detectable en el período de ventana cuando el AgsHB ya es negativo y los anti-HBsAg no han aparecido todavía.