



**REPÚBLICA DE CUBA  
CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS  
CENTRO DE INMUNOENSAYO**

**DETECCIÓN Y CONFIRMACIÓN DEL ANTÍGENO DE SUPERFICIE DEL VIRUS DE  
LA HEPATITIS B POR ULTRAMICROELISA DE NUEVA GENERACIÓN**

**Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en  
Ciencias de la Salud**

**Lic. IRINIA YELENA VALDIVIA ÁLVAREZ**

**La Habana**

**2013**



**REPÚBLICA DE CUBA  
CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS  
CENTRO DE INMUNOENSAYO**

**DETECCIÓN Y CONFIRMACIÓN DEL ANTÍGENO DE SUPERFICIE DEL VIRUS DE  
LA HEPATITIS B POR ULTRAMICROELISA DE NUEVA GENERACIÓN**

**Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en  
Ciencias de la Salud**

**Autor: Lic. Irinia Yelena Valdivia Álvarez**

**Tutores: Prof. Tit., Dr. Eduardo Pentón Arias, Dr C**

**Prof. Tit., Ing. Antonio Melchor Rodríguez, Dr C**

**Asesor: Prof. Tit., Dr. Rolando Ochoa Azze, Dr C**

**La Habana**

**2013**

*A mi país, por permitirme ser y hacer  
y al cual entrego agradecida los frutos de mi labor diaria*

*A la memoria de mi padre*

*A mi madre y mis hijos*

*"...a la patria no se le ha de servir por el beneficio que se pueda sacar de ella, sea de gloria o de cualquier otro interés, sino por el placer desinteresado de serle útil".*

*José Martí*

*Este trabajo resume más de 10 años de labor de un afanado, entusiasta y comprometido colectivo, al cual tengo el honor de pertenecer. Muchas personas, de una manera u otra, permitieron que se desempeñara adecuadamente y deseo expresar mi gratitud a todos aquellas que han contribuido a mi formación profesional, humana e integral. Sin ellas no hubiera sido posible esta verdad.*

*Muchas gracias a:*

- *Melchor, mi tutor, compañero y amigo, por su preocupación, entrega y compromiso en la realización de este trabajo. Por compartirme su sabiduría, metodología y experiencia en todo momento y estar siempre a mi lado, hombro con hombro. Gracias por incitarme en los momentos de flaqueza, por la constante exigencia y toda su bondad.*
- *Ochoa, mi asesor y entrañable amigo, quien contribuyó a mi formación profesional desde los inicios y participó en la obtención de muchos de estos resultados. Gracias por toda su ayuda en cada fase del trabajo, por sus conocimientos, que entrega a torrentes y por todo el tiempo que me dedicó a pesar de sus obligaciones.*
- *A Darién, Ariel, Auro y Jeny, por su apoyo constante e incondicional en el procesamiento y presentación de estos resultados, por no escatimar tiempo ni esfuerzo para auxiliarme.*
- *A Gustavo, por asumir casi por completo mis actividades en los últimos meses, recargándose considerablemente del trabajo de dirección que compartimos, por toda su ayuda y por garantizar los medios necesarios para la presentación de este trabajo.*
- *A las profesoras Isabel Martínez Mota y Martha González Griego, por sus oportunos señalamientos y toda la ayuda que me brindaron en el perfeccionamiento de este trabajo.*
- *A todos mis compañeros del Centro de InmunoEnsayo y en especial a los de la agrupación de Inmunoquímica, por su preocupación constante sobre la marcha del trabajo y permitirme formar parte de este excelente colectivo.*
- *Mis compañeros del Laboratorio de Hepatitis, los de la vieja guardia, Auro, Janette y Julio (que son como hermanos), por ser parte importante en la obtención de los resultados que aquí se presentan y a los nuevos compañeros que se fueron incorporando, por dar continuidad al trabajo realizado.*
- *A la generación gestora del Centro de InmunoEnsayo, que contribuyó a mi formación como profesional y me inculcó el sentido de pertenencia y el compromiso inmenso con Cuba.*
- *A Raque, Pedro y Sonia, por su preocupación constante y todo su apoyo. A Yaimé, que aún desatendiendo sus propias urgencias, estuvo para ayudarme. A Mariprú y Milagritos, por el sabroso y oportuno café que tantas veces contribuyó a disipar el cansancio.*
- *A Lillena, Adriana, Aramis, Celia, Anita y León, por facilitarme todos los datos que les pedí, casi siempre con urgencia, por su incondicional apoyo, a toda prueba.*

- *A Martica, por su contribución en la presentación final de este trabajo, a Yanelly y Harold, por el apoyo informático.*
- *A mis padres, por la formación que me dieron, por forjarme en la disciplina y el compromiso hacia el deber, por todo el amor y el apoyo constantes.*
- *A mis hermanas, por su preocupación y ocupación para conmigo, porque siempre están ahí cuando las necesito. En especial a lly, por su ayuda y sugerencias para la realización de este trabajo.*
- *A mis hijos, que son dos de mis principales razones, porque se han crecido en este tiempo para facilitarme la dedicación al trabajo. En especial a Oly, que a cada momento me incita a volar y ha resultado una compañera y una compañía excepcional, quien junto a Roberto vuelven a dar un ambiente de hogar a la casa.*
- *A Viti, por el amor que guardó celosamente durante tantos años, por el sólido, aunque efímero, soplo de brisa que trajo a mi vida en duros momentos, por su ánimo e incitación constantes para que realizara este trabajo y porque le debo una tesis desde los años de universidad.*
- *A mis amigas Auro, Ofe, Mily y Celia, por estar siempre a mi lado, brillantes e incondicionales, por no permitirme tocar fondo ante los embates de la vida y reparar mis alas.*

## SÍNTESIS

El Centro de InmunoEnsayo trabaja desde 1988 en el desarrollo y aplicación de ensayos basados en una tecnología ultramicroanalítica, para el pesquisaje y confirmación del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B. Con el objetivo de dotar al Sistema Nacional de Salud de un ensayo con mejores características funcionales, se realizó la normalización y evaluación de un ultramicroELISA, con una mayor sensibilidad y detectabilidad para la identificación del HBsAg en muestras de suero o plasma; así como su prueba confirmatoria. En los años 2000 y 2001, el Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos otorgó el registro sanitario para la producción y comercialización de ambos ensayos. Los resultados se debieron en gran medida al empleo combinado de nuevos anticuerpos monoclonales y el sistema amplificador estreptavidina/biotina. La normalización de una prueba más sensible, permitió evaluar su aplicación en muestras de sangre seca sobre papel de filtro, dadas sus ventajas para la realización de estudios epidemiológicos en zonas de difícil acceso o escasos recursos instrumentales. Desde 2001 estos ensayos permitieron ahorrar más de 50 millones de USD e ingresaron más de 25 millones de USD al país. Su introducción aporta nuevos datos epidemiológicos y la medición de la eficacia de la vacuna cubana contra la hepatitis B.

## LISTADO DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

- 1<sup>er</sup> EI-OMS: Primer Estándar Internacional de la OMS (80/549)

### A

- aa: Aminoácidos
- AcB: Anticuerpos biotinilados
- AcM: Anticuerpos monoclonales
- AcP: Anticuerpos policlonales
- ADN: Ácido desoxirribonucleico.
- ADNccc: Ácido desoxirribonucleico circular covalentemente cerrado.
- anti-HBc: Anticuerpos contra el antígeno *core* del virus de la hepatitis B.
- anti-HBeAg: Anticuerpos contra el antígeno e del virus de la hepatitis B.
- anti-HBsAg: Anticuerpos contra el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B.
- ARN: Ácido ribonucleico
- ARN (m): Ácido ribonucleico mensajero

### B

- BBI: Boston Biomedica, Inc.
- BSA: Albúmina de suero bovino, del inglés bovine serum albumin

### C

- CB: Disolución reguladora carbonato-bicarbonato de sodio 0,5 mol/L pH 9,6
- CECMED: Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos.
- CHP: Carcinoma hepatocelular primario
- CIE: Centro de InmunoEnsayo de Cuba
- CIEF: Contrainmunolectroforesis
- CIGB: Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Cuba
- CMHE: Centro Municipal de Higiene y Epidemiología
- CN: Control negativo
- CP: Control positivo
- CPA: Célula presentadoras de antígenos

- CPH: Complejo principal de histocompatibilidad

## D

- DACC: Departamento de Aseguramiento y Control de la Calidad del Centro de InmunoEnsayo

## E

- E: Especificidad clínica
- EIE: Ensayo inmunoenzimático
- ELISA: Análisis de Inmunoadsorción Ligado a Enzima, del inglés Enzyme-linked Immunosorbent Assay
- EPEI-ad: Estándar del Instituto "Paul Ehrlich", subtipo *ad*
- EPEI-ay: Estándar del Instituto "Paul Ehrlich", subtipo *ay*
- ES-ad: Estándar secundario, subtipo *ad* (Centro de InmunoEnsayo)
- Estrep./FA: Conjugado de estreptavidina/fosfatasa alcalina

## F

- FDA: Agencia Reguladora de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos de Norteamérica, del inglés Food and Drug Administration
- FN: Falso negativo
- FP: Falso positivo
- FR: Factor reumatoideo

## H

- HAMA: Anticuerpos humanos anti-ratón, del inglés human anti-mouse antibodies
- HBcAg: antígeno *core* del virus de la hepatitis B, del inglés Hepatitis B core antigen.
- HBeAg: antígeno e o *precore* del virus de la hepatitis B, del inglés Hepatitis B e antigen.
- HBsAg: antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, del inglés Hepatitis B surface antigen.
- Hepanostika Confirmatory: Hepanostika HBsAg Uni-Form II Confirmatory (Organon Teknika, Boxtel, Holanda)
- Hepanostika HBsAg: MicroELISA Hepanostika HBsAg Uni-Form II (Organon Teknika, Boxtel, Holanda)
- HR: Humedad relativa

## I

- ICBS: Consorcio Internacional para la Seguridad de la Sangre

- IFN: Interferón
- INCQS: Instituto Nacional de Control de Calidad en Salud de Brasil
- INDRE: Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos de México
- INOR: Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología de Cuba

## K

- Kaf: Coeficiente de afinidad
- K: Índice de concordancia (Kappa)

## L

- LT: Linfocitos T
- LTC: Linfocitos T citotóxicos

## M

- m: Pendiente de la curva
- M: Fluorescencia de la muestra
- MAL: Marco abierto de lectura
- Mc: Muestra tratada con el reactivo control
- Mn: Muestra tratada con el reactivo neutralizante

## N

- NAT: Ensayo de amplificación de ácido nucleico, del inglés Nucleic Acid Test
- NC: Nivel de corte

## O

- OMS: Organización Mundial de la Salud

## P

- pb: Pares de bases
- PBS: disolución reguladora salina-fosfato, del inglés phosphate buffered saline solution
- PCR: reacción en cadena de la polimerasa, del inglés polymerase chain reaction
- PEI: Paul Ehrlich Institute

- p/v: peso/volumen

## R

- Rc: Reactivo control
- RIA: Radioinmunoanálisis
- Rn: Reactivo neutralizante

## S

- S: Sensibilidad clínica
- SNC: Suero normal de carnero
- SNCo: Suero normal de conejo
- SNH: Suero normal humano
- SNR: Suero normal de ratón
- S&S 903: Papel de filtro Schleicher and Schuell 903
- SSPF: Sangre seca sobre papel de filtro
- SUMA: Sistema Ultra Micro Analítico

## T

- T: Temperatura
- TRIS: Disolución reguladora Tris-HCl 0,05 mol/L pH 8

## U

- UF: Unidades de fluorescencia
- UI: Unidades Internacionales
- UMELISA: ultramicroELISA
- UMELISA HBsAg: Generación anterior de ultramicroELISA
- UPEI: Unidades Paul Ehrlich Institute

## V

- VHB: Virus de la hepatitis B
- VHC: Virus de la hepatitis C

- **VIH:** Virus de la inmunodeficiencia humana
- **VN:** Verdadero positivo
- **VP:** Verdadero negativo
- **VPN:** Valor predictivo negativo
- **VPP:** Valor predictivo positivo
- **v/v:** volumen/volumen

ÍNDICE	Página
INTRODUCCIÓN .....	1
1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	7
1.1. El virus de la hepatitis B .....	7
1.1.1. Características generales del virión .....	7
1.1.2. Organización del genoma del VHB. Proteínas virales .....	7
1.1.3. Variabilidad genética del VHB.....	10
1.1.4. Replicación del VHB.....	11
1.1.5. Patogénesis.....	11
1.1.6. Transmisión del VHB.....	12
1.2. Historia natural de la infección por el VHB .....	13
1.2.1. Tratamiento y prevención .....	14
1.3. Epidemiología de la hepatitis B .....	16
1.4. Diagnóstico de la hepatitis B .....	17
1.4.1. Características del diagnóstico de la hepatitis B. Marcadores serológicos.....	17
1.4.2. Evolución de los métodos de diagnóstico de la hepatitis B. Detección del HBsAg.....	19
1.4.3. Ensayos confirmatorios para el HBsAg .....	24
1.4.4. Ensayos para la detección del HBsAg en Cuba .....	25
1.4.4.1. Antecedentes.....	25
1.4.4.2. Desarrollo de ensayos para la detección de HBsAg, basados en la tecnología SUMA.....	25
2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	28
2.1. Materiales.....	28
2.1.1. Materiales de referencia .....	28
2.1.1.1. Preparaciones estándar de los subtipos ad y ay del HBsAg (Instituto Paul Ehrlich, Alemania) .....	28
2.1.1.2. Primer Estándar Internacional de la OMS para el subtipo ad del HBsAg, código 80/549 (NIBSC, Reino Unido).....	28
2.1.1.3. Estándar Secundario HBsAg subtipo ad (CIE, Cuba).....	28
2.1.1.4. Paneles de la Boston Biomedica, Inc.....	28
2.1.1.5. Sueros controles.....	29
2.1.1.6. Estuches comerciales para la detección y confirmación del HBsAg .....	29
2.1.2. Papel de filtro Schleicher & Schuell 903, Alemania .....	29
2.1.3. Reactivos químicos y biológicos.....	29
2.1.4. Fase sólida .....	31

2.1.5. Equipamiento .....	31
2.2. Métodos .....	32
2.2.1. Metodología para la normalización de un ensayo inmunoenzimático para la detección del HBsAg en muestras de suero o plasma .....	32
2.2.1.1. Selección del principio de ensayo .....	32
2.2.1.2. Obtención y purificación de los anticuerpos monoclonales y policlonales .....	32
2.2.1.3. Caracterización de los anticuerpos monoclonales.....	32
2.2.1.4. Selección de los anticuerpos para la fase sólida y para el conjugado con biotina.....	34
2.2.1.5. Preparación de las muestras de concentración conocida de HBsAg .....	34
2.2.1.6. Preparación del control negativo.....	34
2.2.1.7. Preparación del control positivo .....	35
2.2.1.8. Preparación de los conjugados de anticuerpos con biotina .....	35
2.2.1.9. Preparación del conjugado estreptavidina/fosfatasa alcalina.....	35
2.2.1.10. Selección de las condiciones de inmunorreacción del ensayo.....	35
2.2.1.10.1. Selección de las condiciones de recubrimiento de la fase sólida.....	35
2.2.1.10.2. Características de las muestras.....	36
2.2.1.10.3. Titulación de los conjugados de anticuerpos-biotina y estreptavidina/fosfatasa alcalina .....	36
2.2.1.10.4. Determinación del tiempo de incubación de los diferentes pasos del ensayo .....	37
2.2.1.11. Evaluación de las condiciones del ensayo.....	37
2.2.1.12. Determinación del nivel de corte .....	38
2.2.1.13. Determinación de la detectabilidad o sensibilidad analítica del ensayo.....	38
2.2.1.14. Evaluación de las características funcionales del ensayo.....	38
2.2.1.15. Estudio de especificidad analítica .....	39
2.2.1.16. Establecimiento de la zona gris.....	39
2.2.1.17. Estudio de la reproducibilidad .....	39
2.2.1.18. Estudios de estabilidad.....	40
2.2.1.19. Evaluación externa del ensayo normalizado.....	41
2.2.2. Registro sanitario del estuche de reactivos.....	41
2.2.3. Estudio piloto con el UMELISA HBsAg PLUS.....	41
2.2.4. Metodología para la normalización de una prueba confirmatoria para el HBsAg en muestras de suero o plasma.....	42
2.2.4.1. Selección del principio de la prueba confirmatoria .....	42
2.2.4.2. Preparación del reactivo control.....	42

2.2.4.3.	Preparación del reactivo neutralizante .....	43
2.2.4.3.1.	Selección de la concentración de trabajo del reactivo neutralizante .....	43
2.2.4.4.	Preparación del control positivo .....	43
2.2.4.5.	Selección de las condiciones de ensayo .....	44
2.2.4.5.1.	Selección de la proporción de mezcla óptima de la muestra con los reactivos control y neutralizante .....	44
2.2.4.5.2.	Tiempo y temperatura de reacción de la muestra con los reactivos control y neutralizante.....	44
2.2.4.6.	Determinación del nivel de corte de la prueba confirmatoria.....	44
2.2.4.7.	Evaluación de la detectabilidad del ensayo confirmatorio .....	44
2.2.4.8.	Coincidencia de los resultados con la prueba de referencia .....	44
2.2.4.9.	Estudios de estabilidad.....	45
2.2.4.10.	Evaluación externa .....	45
2.2.5.	Registro sanitario de la prueba confirmatoria .....	46
2.2.6.	Evaluación del UMELISA HBsAg PLUS para su aplicación a la detección del HBsAg en muestras de sangre seca sobre papel filtro .....	46
2.2.6.1.	Obtención de las muestras de sangre seca sobre papel de filtro, necesarias para evaluar la aplicación del UMELISA HBsAg PLUS en este tipo de muestra .....	46
2.2.6.1.1.	Obtención de las muestras pareadas de suero y de sangre seca sobre papel de filtro .....	46
2.2.6.1.2.	Preparación de las muestras de sangre seca sobre papel de filtro con concentraciones conocidas de HBsAg .....	46
2.2.6.2.	Selección de las condiciones de elución de las muestras de sangre seca .....	47
2.2.6.3.	Evaluación del nivel de corte del ensayo para las muestras de sangre seca .....	47
2.2.6.4.	Determinación de la detectabilidad del ensayo para muestras de sangre seca sobre papel de filtro .....	48
2.2.6.5.	Evaluación de las características funcionales del UMELISA HBsAg PLUS para muestras de sangre seca sobre papel de filtro.....	48
2.2.6.6.	Evaluación de la estabilidad del HBsAg en sangre seca sobre papel de filtro.....	48
2.2.6.6.1.	Preparación de las muestras de sangre en papel de filtro .....	48
2.2.6.6.2.	Secado y almacenamiento de las muestras .....	49
2.2.6.6.3.	Evaluación de la estabilidad del HBsAg en las muestras de sangre seca sobre papel de filtro.....	49
2.2.7.	Evaluaciones realizadas a las pruebas desarrolladas. Sus aplicaciones.....	49
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	51
3.1.	Normalización de un ensayo para la detección de HBsAg en muestras de suero y plasma .....	51
3.1.1.	Selección del principio del ensayo .....	51

3.1.2.	Caracterización de los anticuerpos monoclonales .....	52
3.1.3.	Selección de los anticuerpos para la fase sólida y para el conjugado con biotina.....	53
3.1.4.	Selección de las condiciones de inmunorreacción del ensayo.....	54
3.1.4.1.	Selección de las condiciones de recubrimiento de la fase sólida.....	54
3.1.4.2.	Titulación de los conjugados de anticuerpos-biotina y estreptavidina/fosfatasa alcalina .....	56
3.1.4.3.	Determinación del tiempo de incubación de los diferentes pasos del ensayo .....	57
3.1.5.	Evaluación de las condiciones del ensayo .....	59
3.1.6.	Determinación del nivel de corte .....	64
3.1.7.	Determinación de la detectabilidad o sensibilidad analítica del ensayo .....	65
3.1.8.	Evaluación de las características funcionales del ensayo.....	69
3.1.9.	Estudio de especificidad analítica .....	71
3.1.10.	Establecimiento de la zona gris .....	73
3.1.11.	Estudio de reproducibilidad .....	73
3.1.12.	Estudios de estabilidad de los componentes y el diagnosticador .....	74
3.1.13.	Evaluación externa del ensayo normalizado.....	75
3.1.14.	Estudio piloto con el UMELISA HBsAg PLUS .....	77
3.2.	Normalización de una prueba confirmatoria para el HBsAg en muestras de suero o plasma .....	80
3.2.1.	Selección del principio de la prueba confirmatoria .....	80
3.2.2.	Reactivos control y neutralizante.....	80
3.2.2.1.	Selección de la concentración de trabajo del reactivo neutralizante .....	81
3.2.3.	Selección de las condiciones del ensayo .....	82
3.2.3.1.	Selección de la proporción de mezcla óptima de la muestra con los reactivos control y neutralizante .....	82
3.2.3.2.	Tiempo y temperatura de reacción de la muestra con los reactivos control y neutralizante.....	83
3.2.4.	Determinación del nivel de corte de la prueba confirmatoria .....	84
3.2.5.	Evaluación de la detectabilidad del ensayo confirmatorio .....	84
3.2.6.	Coincidencia de los resultados con la prueba de referencia.....	85
3.2.7.	Estudios de estabilidad .....	87
3.2.8.	Evaluación externa de la prueba confirmatoria.....	87
3.3.	Evaluación del UMELISA HBsAg PLUS para su aplicación a la detección del HBsAg en muestras de sangre seca sobre papel filtro.....	88
3.3.1.	Selección de las condiciones de elución de las muestras.....	88
3.3.2.	Evaluación del nivel de corte del ensayo.....	89

3.3.3. Determinación de la detectabilidad del ensayo para muestras de sangre seca sobre papel de filtro .....	92
3.3.4. Evaluación de las características funcionales del UMELISA HBsAg PLUS para muestras de sangre seca sobre papel de filtro.....	93
3.3.5. Evaluación de la estabilidad del HBsAg en muestras de sangre seca sobre papel de filtro.....	95
3.4. Evaluaciones realizadas a las pruebas desarrolladas. Sus aplicaciones.....	97
3.5. Consideraciones generales finales.....	99
CONCLUSIONES .....	103
RECOMENDACIONES.....	104
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	105
ANEXOS .....	128

## INTRODUCCIÓN

La hepatitis B es una enfermedad infecciosa potencialmente peligrosa para la vida de los seres humanos, que daña fundamentalmente el hígado y es considerada como uno de los principales problemas de salud global, por afectar a millones de personas en todo el mundo (1-3). Su agente causal es el virus de la hepatitis B (VHB), transmitido por la exposición percutánea y de las mucosas a la sangre o los fluidos corporales infectantes. Este microorganismo es de 50 a 100 veces más contagioso que el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (2,4).

Alrededor de un tercio de la población mundial se ha infectado con el VHB (5), con un curso clínico complejo y variable, en dependencia de factores relacionados con el virus y el hospedero. Los resultados de la infección aguda varían desde la hepatitis B subclínica asintomática (70%) y la infección aguda sintomática (30%) hasta el fallo hepático fulminante (<1%) (6). Una proporción de las personas infectadas progresa hacia la cronicidad, cuya incidencia decrece con la edad y es mucho mayor entre los neonatos (hasta 90%) y niños pequeños (25-50%) (7). Las secuelas de la infección crónica por el VHB comprenden desde el estado de portador asintomático hasta el desarrollo de cirrosis, la descompensación hepática y el carcinoma hepatocelular primario (CHP) (8).

Cada año ocurren alrededor de un millón de muertes debido a las formas crónicas de la hepatitis B (2, 9), que afectan principalmente a las poblaciones de Asia y África subsahariana, aunque la incidencia de CHP se incrementa en todo el mundo y en estos momentos constituye el quinto cáncer más frecuente (10).

A pesar de existir medicamentos antivirales efectivos para el tratamiento de la hepatitis B, capaces de prevenir su progresión hacia las formas graves, estos no permiten la erradicación total del virus (2, 11). Por otra parte, aunque las vacunas existentes demuestran su alta eficacia para prevenir la infección, no son efectivas para los más de 350 millones de personas con infección crónica (12, 13), las que junto con las infecciones agudas subclínicas, constituyen un importante reservorio para la transmisión del VHB. Esto hace que el pesquisaje rutinario de la sangre y sus productos, así como la vigilancia de los grupos de riesgo (hijos de madres infectadas, personal médico y paramédico, usuarios de drogas parenterales, hemodializados, entre otros) mediante pruebas de diagnóstico sensibles y específicas, continúe siendo una de las principales acciones para prevenir la diseminación del VHB.

Tras la infección aparecen antígenos del virus y sus anticuerpos específicos en el suero, así como el ácido nucleico viral, denominados como marcadores serológicos de la infección, que tienen un incuestionable valor para el diagnóstico y varían su comportamiento en dependencia del curso clínico de la misma.

El diagnóstico de la infección por el VHB se establece mediante la detección de su antígeno de superficie (HBsAg) en la sangre de las personas infectadas, por ser el primero en aparecer, incluso antes del inicio de los síntomas.

Además, se encuentra presente tanto en los pacientes con hepatitis B aguda como en los portadores crónicos (14). La detección en el suero de los restantes marcadores es importante para determinar el grado de infectividad, así como la etapa de la infección y su pronóstico. La detección del ADN (ácido desoxirribonucleico) viral perfecciona el proceso de evaluación y manejo del paciente, pues permite establecer la infección desde las etapas tempranas, antes que el HBsAg sea detectable, con lo cual se reduce el período de ventana inicial (3, 15); pero estas técnicas de biología molecular, basadas por lo general en ensayos de amplificación de la señal o ensayos de amplificación de ácidos nucleicos (NAT, por sus siglas en inglés) (16, 17), son muy costosas y trabajosas para utilizarse en las labores de pesquisajes realizadas de forma masiva en los sistemas de salud pública, por lo que las pruebas que detectan el HBsAg constituyen las de elección para cumplir este objetivo y son la base para el pesquisaje de la sangre (18). Cada vez más se intenta la obtención de métodos con mejores niveles de sensibilidad y detectabilidad, capaces de reducir el período de ventana inicial de la infección, así como las fases donde el HBsAg se encuentra en bajas concentraciones (15, 19).

Los procedimientos para detectar el HBsAg evolucionan desde métodos relativamente poco sensibles de difusión en gel de agar, como la contraimmunoelectroforesis (CIEF), hasta las técnicas sensibles y fiables de radioinmunoanálisis (RIA) y ensayos inmunoenzimáticos (EIE), dentro de estos últimos las técnicas de ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) son las más empleadas por sus extraordinarias ventajas, que incluyen el procesamiento de un gran número de muestras a la vez, con relativa facilidad de ejecución, constituyendo herramientas muy útiles en las labores de pesquisaje (20).

Desde el surgimiento de los ELISAs para la detección del HBsAg investigadores de todo el mundo trabajan para proporcionar mejoras en estos ensayos, que eleven los niveles de detectabilidad y sensibilidad de las pruebas, sin detrimento de su especificidad (3). En tal sentido, se promueve la sustitución de los anticuerpos policlonales (AcP), inicialmente empleados como reactivo biológico, por anticuerpos monoclonales (AcM), dada las ventajas de estos últimos en cuanto a su especificidad, homogeneidad y características productivas (21). Por otra parte, para aumentar la sensibilidad y detectabilidad de los ensayos se busca incrementar el número de anticuerpos de captura enlazados a la fase sólida, para lo cual se utilizan materiales especiales y diferentes formas geométricas (22-24). Sin embargo, las microplacas con sus múltiples variantes constituyen las fases sólidas de elección para procesar un elevado número de muestras. A pesar de existir una gran diversidad de materiales (cloruro de polivinilo, polipropileno, acrílico, nitrocelulosa), se prefiere el poliestireno por sus excelentes propiedades (20, 24).

La detectabilidad de estos ensayos puede incrementarse también mediante métodos de amplificación no inmunológicos, por ejemplo, las cascadas enzimáticas y el sistema estreptavidina/biotina, entre otros (24), este último se aplica con gran fuerza desde finales del siglo XX (25-29). Algunos de estos ensayos están adaptados a instrumentos automatizados, que los hacen más simples y convenientes en su realización (30-32); pero esta tecnología, por sus costos, resulta inaccesible para los países en vías de desarrollo que pretenden masificar el diagnóstico y la vigilancia de la hepatitis B.

El hecho de que en Cuba se desarrollara la tecnología SUMA (Sistema Ultra Micro Analítico) en la década de los '80 del siglo pasado (33), posibilita el estudio masivo de diversas patologías con una tecnología propia, caracterizada por el empleo de mínimos volúmenes de reactivos y muestras (5-10  $\mu$ L), un bajo costo de ejecución y determinado grado de automatización, características que la hacen particularmente adecuada para los programas de prevención en salud. Las técnicas de ultramicroELISA (UMELISA), desarrolladas y basadas en el SUMA, constituyen el soporte de importantes programas de salud en el país (34).

Debido al alto costo en el mercado internacional de los ensayos destinados a la detección y confirmación de la infección por el VHB (entre 3 y 4 USD por prueba de HBsAg y entre 8 y 11 USD por prueba confirmatoria), lo cual sería insostenible para nuestra economía, el Centro de InmunoEnsayo (CIE), creador de la tecnología SUMA, trabaja desde 1988 en el desarrollo y la aplicación de ensayos para la detección del HBsAg en muestras de suero o plasma, así como en su prueba confirmatoria, lo cual persigue el objetivo de contribuir al desarrollo y el perfeccionamiento de los programas cubanos de certificación de sangre y vigilancia epidemiológica de la hepatitis B (35).

En correspondencia con la evolución mundial de estos métodos, así como el reto incesante de contar con pruebas más sensibles y específicas para prevenir la transmisión del VHB, se desarrollan diferentes generaciones de ensayos ultramicroanalíticos, en los cuáles se propicia de forma evolutiva la sustitución de AcP por AcM, así como la combinación de estos últimos con las ventajas de amplificación que ofrece el sistema estreptavidina/biotina. El objetivo es contar con una prueba más competente que las precedentes, acorde con los requerimientos internacionales (36), para aplicarse al pesquiasaje de la infección por el VHB en los donantes de sangre y los grupos de riesgo. Asimismo, el desarrollo de pruebas que confirmen la presencia del HBsAg, son de inestimable valor para el establecimiento de un resultado definitivo y la implementación de un algoritmo de diagnóstico más seguro.

Por otra parte, la normalización de una prueba de pesquisaje más sensible para muestras de suero o plasma, posibilitaría evaluar su aplicación en muestras de sangre seca sobre papel de filtro (SSPF), dadas las ventajas del empleo de este tipo de muestra para la realización de estudios epidemiológicos en condiciones de campo (37-39).

### **PROBLEMA**

Necesidad de dotar al país de un ensayo con superiores niveles de sensibilidad y detectabilidad que los precedentes para la detección del HBsAg, así como su prueba confirmatoria, que soportados en una tecnología propia, permitan el perfeccionamiento del pesquisaje de la infección por el VHB en los donantes de sangre y los grupos de riesgo como una de las principales acciones para prevenir la transmisión de la hepatitis B.

### **HIPÓTESIS**

Es posible desarrollar un ensayo, basado en la tecnología SUMA, para la detección del HBsAg con mejores niveles de sensibilidad y detectabilidad que los UMELISAs anteriormente usados para este fin, así como su prueba confirmatoria, sin que esto conlleve a una afectación de la especificidad del sistema.

Para demostrar esta hipótesis se plantean los siguientes objetivos:

### **OBJETIVO GENERAL**

Introducir en la Red Nacional de Laboratorios SUMA un ensayo inmunoenzimático de nueva generación para la detección del HBsAg con elevados niveles de sensibilidad, detectabilidad y especificidad, así como una prueba confirmatoria que incremente la seguridad en los resultados.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Normalizar un ultramicroELISA de nueva generación para la detección del HBsAg en muestras de suero y plasma y desarrollar su prueba confirmatoria.
2. Evaluar un procedimiento para la detección del HBsAg en muestras de sangre seca sobre papel de filtro.
3. Evaluar los resultados de la introducción de las pruebas desarrolladas en los laboratorios pertenecientes a la Red Nacional de Laboratorios SUMA, así como internacionalmente.

### **NOVEDAD CIENTÍFICA**

La novedad científica de este trabajo está dada por:

- Se pone al servicio del Sistema Nacional de Salud un ensayo para la detección del HBsAg en muestras de suero y plasma, con mejores características funcionales que los anteriores y al estar basado en la tecnología SUMA, permite las labores de pesquisaje en los donantes de sangre y los grupos de riesgo con un considerable ahorro de reactivos y muestras, así como facilidades para el procesamiento automatizado de los resultados, lo cual potencia

su uso en la realización de estudios masivos.

- Se emplea por primera vez el sistema estreptavidina/biotina en las técnicas de ultramicroELISA basadas en la tecnología SUMA y se demuestra su influencia en el mejoramiento de las características funcionales de un ensayo de este tipo para la detección del HBsAg.
- Se normaliza, por primera vez en Cuba, un ensayo confirmatorio para el HBsAg, cuyo registro e introducción a la Red Nacional de Laboratorios SUMA permite perfeccionar el diagnóstico de la hepatitis B y brindar mayor seguridad en los datos epidemiológicos de la infección por el VHB en el país.
- Se aplica por primera vez la detección del HBsAg en muestras de sangre seca colectada sobre papel de filtro en un ensayo de la tecnología SUMA para estos fines y se demuestra su factibilidad, dadas las ventajas del empleo de este tipo de muestra en cuanto a su recolección, trasportación y conservación, lo cual facilita la realización de pesquisajes en zonas de difícil acceso, posibilidad que no ofrecen muchas casas comerciales.
- Se utilizan por primera vez, en un ensayo de la tecnología SUMA para la detección del HBsAg, AcM obtenidos y caracterizados en el CIE, los cuales al combinarse con el sistema estreptavidina/biotina permiten elevar la sensibilidad y detectabilidad de la prueba, sin afectación de su especificidad.

#### IMPACTO ECONÓMICO Y SOCIAL

El desarrollo de un ensayo para la detección del HBsAg con mejores niveles de sensibilidad, detectabilidad y especificidad que los precedentes, contribuye al perfeccionamiento del Programa Nacional para la Prevención de la Infección por el VHB, ya que al detectar menores concentraciones de este antígeno en el suero de las personas infectadas permite la identificación de la infección desde estadios más tempranos, lo que reduce el período de ventana inicial o cuando el HBsAg se encuentra a muy bajas concentraciones hacia el final de su pico de elevación en la infección aguda, antes de la aparición de los anticuerpos específicos. Esto conlleva a un incremento de la eficiencia en la interrupción de la transmisión del VHB, como un medio de prevenir la infección y reduce aún más las posibilidades de contraer el virus a través de las transfusiones de sangre o los hemoderivados contaminados. Asimismo, la posibilidad de contar con una prueba confirmatoria permite una mayor seguridad en el diagnóstico y la información al paciente, así como disminuye el número de donaciones de sangre declaradas no útiles. Todo esto redundará en una elevación de la calidad de vida para la población y permite la adopción de medidas terapéuticas más oportunas, lo que garantiza la reducción de las consecuencias de esta grave enfermedad, dentro de las que se encuentra el CHP, responsable de 33% de las muertes debidas a la infección por el VHB (8, 10).

Al ampliar el campo de aplicación de estos ensayos al estudio en muestras de SSPF, se proporciona un instrumento útil para la realización de estudios epidemiológicos en zonas de difícil acceso o en condiciones de escasos recursos instrumentales.

El hecho de contar con una tecnología de factura nacional para la detección y confirmación del HBsAg ahorra al país cuantiosas sumas de dinero, que sería necesario invertir para la compra de pruebas de este tipo en el mercado internacional. A partir de la introducción del nuevo ensayo para la detección del HBsAg en la Red Nacional de Laboratorios SUMA en enero de 2001, hasta septiembre de 2012, se pesquisaron más de 850 mil embarazadas, cerca de 5,6 millones de donantes de sangre y poco más de igual cifra de personas pertenecientes a los grupos de riesgo, con lo cual el país ahorró cerca de 50 millones de USD por concepto de importación de reactivos para la realización de esta prueba. En cuanto al confirmatorio se realizaron más de 129 mil determinaciones, lo que representó economizar más de un millón de USD. Es importante, además, tener en cuenta el ahorro de recursos que se logra al minimizar la transmisión de la enfermedad, lo cual implica una disminución en las inversiones por tratamientos, así como, subsidios por certificados médicos, gastos hospitalarios y afectación de la actividad laboral o estudiantil del enfermo.

Por otra parte, contar con ensayos de superiores características funcionales, abre sus posibilidades de comercialización, que junto a las ventajas brindadas por la tecnología SUMA, constituyen un excelente producto exportable, con lo cual se ingresan divisas al país. Estos diagnosticadores se encuentran registrados en diferentes países del área, como son: Brasil, Colombia, Venezuela, México, Perú y Ecuador. Desde 2001 y hasta octubre de 2012 se exportaron cerca de 23 millones de determinaciones del ensayo de pesquisaje y alrededor de 170 mil pruebas confirmatorias, lo cual representa un ingreso de más de 25 millones de USD a la economía nacional.

## 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 1.1. El virus de la hepatitis B

#### 1.1.1. Características generales del virión

El VHB, también llamado partícula de Dane, pertenece a la familia Hepadnaviridae, que agrupa dos géneros: los *orthohepadnavirus* (que infectan a los mamíferos) y los *avihepadnavirus* (que infectan a las aves). Todos estos virus son de ADN y se replican fundamentalmente en las células del hígado. El VHB es un virus envuelto de 40-42 nm de diámetro, con un núcleo central de simetría icosaédrica y diámetro de 27 nm, que contiene el ADN y la polimerasa viral y cuyo componente principal es la proteína conocida como antígeno del core (HBcAg). La cubierta externa del virión es de naturaleza lipoproteica, compuesta de lípidos derivados de la célula hospedera y tres proteínas virales de superficie (figura 1.1) (40-42).

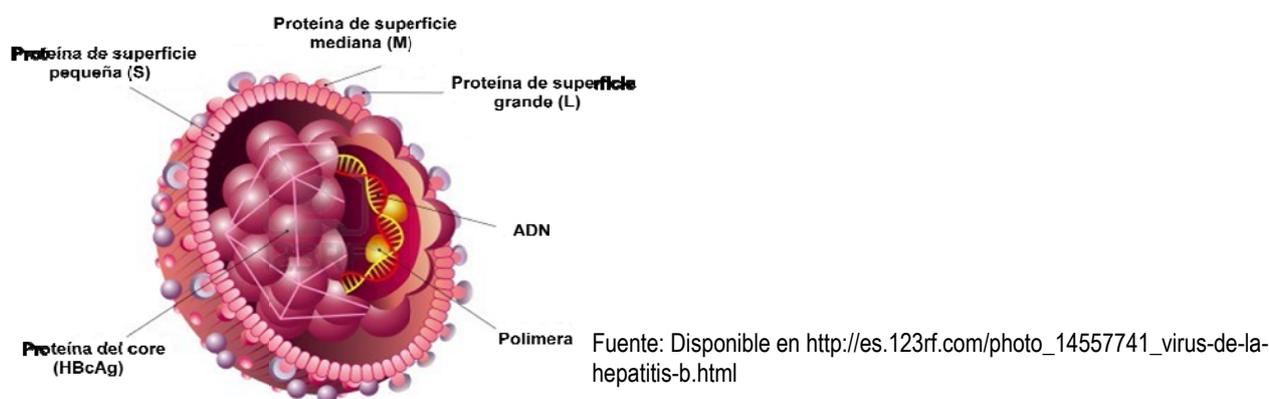


Figura 1.1 Estructura del VHB

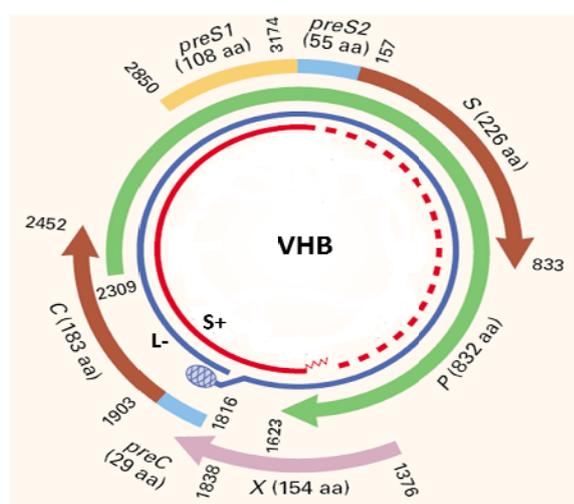
En la circulación de las personas infectadas, además de los viriones completos, se pueden encontrar numerosas partículas subvirales de 22 nm de diámetro, que superan en número a los viriones ( $10^2 - 10^5$  veces más); pero son incapaces de interferir en el ciclo infectivo de estos. Estas partículas no son infecciosas, están compuestas de lípidos y proteínas que forman parte de la superficie del VHB, se denominan antígeno de superficie de la hepatitis B y son producidas en exceso durante el ciclo de vida del virus (40,42).

#### 1.1.2. Organización del genoma del VHB. Proteínas virales

El genoma posee 3 200 pares de bases (pb), está formado por un ADN circular compuesto por dos cadenas de diferente longitud: la cadena denominada L tiene una longitud completa y fija y es complementaria al ARN (ácido ribonucleico) viral, por lo que convencionalmente se le asigna polaridad negativa (L-), tiene aproximadamente 3,2 kb, con los extremos 5' y 3' fijos, formando un círculo casi continuo y la polimerasa viral unida a uno de sus extremos.

La cadena S es más corta y de longitud variable, tiene la misma secuencia nucleotídica que el ARN viral, por lo cual se le asigna polaridad positiva (S+). La posición 5' de esta cadena es fija, pero su extremo 3' tiene una ubicación variable. Por tal motivo, el genoma circular es solo parcialmente de doble cadena, y posee una región de cadena simple de extensión variable (1,7-2,8 kb) (43).

El genoma tiene una organización compacta y eficiente en la que los genes se solapan en cuatro marcos abiertos de lectura (MAL), todos codificados por la cadena L- y conservados entre los diferentes subtipos del VHB. Este solapamiento permite al VHB incrementar su capacidad codificante. Los MAL se denominan S, C, P y X, y codifican a las proteínas de la envoltura, la cápsida nuclear, la polimerasa viral y la proteína X, respectivamente. El MAL S se solapa de manera total con el P, que a su vez lo hace parcialmente con el X y el C (figura 1.2) (44).



Fuente: Tomada de Hunt CM, Mc Gill JM, Allen MI, *et al.* (2000). Clinical relevance of hepatitis B viral mutations. *Hepatology* 31: 1037-1044. American Association for Liver Diseases.

Figura 1.2 Estructura y organización del genoma del VHB

El MAL preC-C (precore-core) codifica para el HBcAg y el antígeno *e* (HBeAg). Si la traducción se inicia en la región core, se produce el HBcAg, que no es secretado a la sangre, pero puede detectarse en el tejido hepático de los pacientes infectados e induce una potente respuesta inmune celular, convirtiéndolo en uno de los blancos más importantes de la respuesta inmune del hospedero, ya que propicia el reconocimiento y la eliminación de los hepatocitos infectados por las células T citotóxicas (18, 45). Cuando la traducción se inicia en la región preC, se produce la proteína precore, de 24 kD, que después de someterse a cortes por proteasas celulares genera el HBeAg, un fragmento de 16 kD que es transportado a la superficie de las células y secretado a la circulación (46). Se le clasifica como una proteína accesoria del VHB, ya que no se requiere para la replicación ni participa en el ensamblaje viral, aunque se produce durante la replicación viral activa (47).

La polimerasa viral, codificada por la región P, es una proteína con actividad multifuncional de polimerasa, transcriptasa inversa y ARNasa H, implicada en los mecanismos de transcripción inversa del VHB, debido a que la replicación del virus requiere de ARN intermediarios e interviene también en la encapsidación del ARN pregenómico (48).

La función de la proteína codificada por el MAL X no está estudiada por completo; pero se asocia al desarrollo del CHP y puede, directa e indirectamente, afectar la expresión de los genes virales. La actividad de la proteína X es absolutamente necesaria para la replicación y diseminación del virus (49-51).

El MAL S codifica las proteínas de la envoltura viral y contiene tres codones de iniciación que lo dividen en tres secciones: preS1, preS2 y S, a causa de esto se producen tres proteínas de diferentes tallas llamadas grande (L, del inglés Large), media (M, del inglés Medium) y pequeña (S, del inglés Small) o principal, que comparten el mismo dominio C-terminal (50, 52). La proteína S, producida por la transcripción de los genes ubicados en la región S, es la más abundante, constituye el componente antigénico más importante de la envoltura y es la principal proteína que forma el HBsAg (53). La proteína M (o preS2), cuya función aún se desconoce, es producto de la transcripción de los genes presentes en las regiones S y preS2 y la proteína L (o preS1) es codificada por los genes que se encuentran en las regiones S, preS2 y preS1. Su dominio preS1 puede contener 119 o 108 aminoácidos (aa) en dependencia del subtipo viral (48, 54). Se plantea que esta proteína juega un papel clave en la unión del virus a los receptores de la célula hospedera, así como en el ensamblaje de los nuevos viriones y su liberación de la célula (55).

En la formación de las partículas subvirales de HBsAg, la proteína S es suficiente para la generación y secreción de las partículas esféricas, en tanto que la proteína M puede estar o no presente; lo cual no afecta su morfología. Sin embargo, se necesita una producción suficiente de la proteína L para formar las partículas filamentosas. Las proteínas preS (M y L) representan un componente pequeño (<10%) del total de HBsAg circulante. Mientras que estas partículas están compuestas casi en su totalidad por proteína S, los viriones están formados virtualmente por proporciones equimolares de las tres proteínas, las cuales serpentean a través de la bicapa lipídica que forma la envoltura (56).

La secuencia correspondiente a la proteína S, presente en las tres proteínas de envoltura, contiene el principal epítipo inmunogénico del VHB o determinante antigénico *a*. Este epítipo conformacional se corresponde con los residuos de aa del 110 al 160 y puede reconocerse por anticuerpos neutralizantes en todos los subtipos del VHB (53).

Diversos estudios han permitido localizar epítomos dominantes de células B y T en las regiones preS1 y preS2, que demuestran ser más inmunogénicos que los ubicados en la región S e incrementan la respuesta inmune contra esta última, induciendo la producción de anticuerpos neutralizantes (57, 58).

### 1.1.3. Variabilidad genética del VHB

Se describen ocho genotipos y nueve subtipos del VHB (40, 59, 60). El primer indicio que apunta a la heterogeneidad en la secuencia de este virus es la existencia de diferentes determinantes antigénicos en la proteína S, que dan lugar a los subtipos conocidos del VHB. Hasta la fecha se identifican cuatro subtipos serológicos principales: *adw*, *adr*, *ayw*, y *ayr*, los que al subdividirse dan lugar a nueve subtipos del VHB (42, 59, 61), directamente relacionados con sustituciones de aa dentro de la secuencia de esta proteína (18, 62). La letra *a* denota una especificidad antigénica común a todos los subtipos del virus. Las letras *d/y* y *w/r* denotan pares mutuamente excluyentes característicos de los subtipos antigénicos. Los anticuerpos contra el determinante común *a* confieren protección frente a todos los subtipos del VHB, en tanto que los anticuerpos contra los determinantes *d*, *y*, *w* o *r* solo reconocen el subtipo específico (63).

El determinante *a* es de gran importancia, ya que la respuesta protectora de anticuerpos contra el virus (anti-HBsAg) está dirigida contra él. Este epítomo depende de la conformación de la proteína S, lo cual está determinado por el entrecruzamiento de las uniones disulfuro (18) y parece tener una estructura que forma dos lazos (posiciones 122-137 y 139-147), encontrándose entre los residuos que forman el segundo de ellos, la secuencia mínima esencial para la inmunogenicidad de este determinante. Esta secuencia es un epítomo dominante, ya que es capaz de adsorber la proporción principal de anticuerpos contra la proteína S presentes en sueros policlonales anti-HBsAg (64).

Sobre la base de las diferencias en la secuencia del genoma completo, el VHB se divide en los genotipos del A al H, (65, 66), que se establecen por divergencias de más de un 8% en la secuencia de pb y sustituyen progresivamente a los subtipos en la clasificación de las infecciones por este agente. Los genotipos, a su vez, pueden dividirse en subgenotipos, de los cuales se han identificado un total de 21 (67, 68).

Los genotipos muestran una distribución geográfica diferente, siendo más comunes los A-D (8, 59, 69), aunque en los últimos años el movimiento de las poblaciones de los países pobres a los más ricos, así como la disponibilidad de la vacuna y el tratamiento en las zonas con recursos, modifican considerablemente su espectro inicial de distribución (68). Datos recientes sugieren que los genotipos pueden tener una importante influencia en la progresión de la enfermedad, así como en la respuesta al tratamiento y a la vacunación (70, 71).

Por otra parte, durante la replicación viral aparecen mutaciones dadas por la sustitución de bases, que conllevan a una expresión inadecuada de determinadas proteínas virales. Esto provoca diversidad en la progenie del virus incluso a partir de una sola ronda de replicación, lo cual asegura su supervivencia y le permite escapar de la respuesta inmune, de los efectos de la vacunación o de las drogas antivirales (70).

#### 1.1.4. Replicación del VHB

La característica principal de la replicación del VHB es que el ADN resultante se forma por transcripción inversa de un ARN intermediario (72). El proceso comienza con la unión del virus a un receptor desconocido en la superficie de los hepatocitos y su endocitosis. Luego, las partículas del core son transportadas al núcleo de la célula con ayuda de proteínas del hospedero llamadas chaperonas, aquí el genoma viral se libera y el ADN circular asimétrico se convierte en ADN circular covalentemente cerrado (ADNccc), el cual sirve de molde para la síntesis de cuatro ARN mensajeros (ARNm) virales, el de mayor talla (3,5 kb) se conoce como pregenoma viral, ya que contiene una copia completa de la información genética del virus, de modo que debe servir tanto de molde para la síntesis del ADN genómico, como de mensajero para la síntesis de las proteínas del precore, core y polimerasa (8, 50, 52, 73-75).

Todos los ARNm virales son transportados al citoplasma donde ocurre la traducción para la producción de las diferentes proteínas del virus, así como el ensamblaje de la nucleocápside en forma de partículas inmaduras que contienen el pregenoma y la polimerasa (52), dentro de las cuales ocurre el proceso de maduración del genoma, que incluye: la síntesis de la cadena L- por transcripción inversa del pregenoma viral, la degradación de este por la actividad ARNasa H de la polimerasa y la síntesis de la cadena S+, parcialmente sintetizada a partir de la cadena L- (72, 74, 76). La mayoría de las partículas del core se cubren de las proteínas de la envoltura y se secretan a la circulación en forma de viriones completos. Otras transportan el genoma viral de regreso al núcleo, provocando nuevos ciclos de replicación que producen un número mayor de copias del virus (77). El ADNccc puede aparecer en el núcleo de la célula hospedera como un minicromosoma y sirve como reservorio intrahepático del VHB (20).

#### 1.1.5. Patogénesis

Se acepta que el VHB no tiene un efecto citopático directo sobre el hepatocito infectado, siendo los mecanismos inmunológicos que se producen en respuesta a la infección viral, los responsables de la destrucción de estas células. De este modo, la respuesta inmune del hospedero en función de aclarar el virus, provoca el daño hepatocelular (78, 79).

La respuesta inmune innata no juega un papel significativo en este proceso (80), por lo que es la respuesta inmune adaptativa la responsable del aclaramiento viral y la patogénesis de la enfermedad. Se reconoce que la respuesta humoral contribuye al aclaramiento de las partículas virales en circulación, previniendo la diseminación del virus en el hospedero, mientras que la respuesta inmune celular elimina las células infectadas (81-83).

Diversos estudios muestran que en la mayoría de los pacientes capaces de aclarar el virus, se produce una vigorosa, policlonal y multiespecífica respuesta de linfocitos T (LT) a los antígenos del VHB presentes en las proteínas de envoltura, core y polimerasa, donde el HBcAg juega un papel fundamental por su notable capacidad inmunogénica. Esta respuesta involucra tanto a los LT cooperadores CD4+ restringidos al complejo principal de histocompatibilidad (CPH) de clase II, como a los linfocitos T citotóxicos (LTC) CD8+ restringidos al CPH de clase I. Los LT CD4+ reconocen los péptidos derivados de las proteínas virales presentados por las células presentadoras de antígenos (CPA), principalmente los macrófagos y las células dendríticas, lo cual permite, mediante el mecanismo de cooperación celular, la activación de LTC CD8+ y de las células B, que se transforman en células plasmáticas productoras de anticuerpos. Por tanto, se plantea que los LT CD4+ contribuyen indirectamente al control de la infección, ya que facilitan la inducción de la respuesta de células B y de células T CD8+, necesarias para eliminar el virus (47, 81).

Los LTC CD8+ específicos al virus, con la ayuda de las células T CD4+, pueden reconocer los antígenos virales expuestos por el CPH de clase I, presente en la superficie de las CPA o de los hepatocitos infectados, lo cual puede conducir a la lisis directa de estas células o a la liberación de Interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) y Factor de Necrosis Tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), productos de la respuesta inflamatoria que actúan sobre la replicación viral sin provocar la muerte directa de la célula infectada (81).

La diferente respuesta inmune en los pacientes que aclaran el virus y aquellos que no lo logran y progresan a la cronicidad, depende de la correspondencia entre los péptidos presentados por las moléculas del CPH y el repertorio de receptores de células T específicos del hospedero, lo cual está sujeto a factores como la edad y el empleo de tratamientos inmunosupresores, entre otros, que pueden incidir en la inmunocompetencia del paciente. La persistencia de la infección por VHB se caracteriza por una débil respuesta inmune adaptativa y también pueden contribuir otros factores como la tolerancia inmunológica y la inactivación de epítomos por mutaciones (48, 81).

#### 1.1.6. Transmisión del VHB

El VHB se detecta en la sangre y en la mayoría de los fluidos corporales de las personas infectadas, como el semen y las secreciones vaginales. Además, puede permanecer viable en objetos inanimados durante una semana

bajo determinadas condiciones ambientales, por lo que su transmisión ocurre por la exposición percutánea o de las membranas mucosas a estos fluidos y objetos contaminados. Las posibles formas de transmisión incluyen el contacto sexual, la vía vertical durante el parto, la horizontal, que tiene lugar por el contacto estrecho con individuos infectados, así como la vía parenteral/percutánea (84-89).

La vía perinatal constituye la más importante ruta de transmisión de este virus a nivel mundial (90). La probabilidad de que el bebé se infecte en el momento del nacimiento varía de 90 a 10%, en dependencia de si la madre se encuentra, o no, en la fase de replicación viral activa, respectivamente (91). La transmisión madre/hijo puede establecerse también por los cuidados de la madre al niño durante los primeros años de vida y está demostrado que la lactancia materna puede ser otra vía de contagio, lo que no ocurre cuando el bebé se encuentra inmunizado (92).

La transmisión por vía parenteral/percutánea, que involucra la exposición directa a la sangre u otros fluidos infectados, incluye las transfusiones de sangre infectada, así como la administración parenteral de hemoderivados contaminados (93), el uso compartido de jeringuillas y agujas no esterilizadas, en el caso de los usuarios de drogas parenterales (94), la exposición a los procesos de hemodiálisis, la acupuntura y la práctica de tatuajes, entre otros (95, 96). El riesgo de adquirir hepatitis B por accidentes percutáneos varía desde 20% en los países donde prevalecen los pacientes positivos solamente al HBsAg, hasta 66% para aquellos que tienen una alta prevalencia de HBsAg y HBeAg (58). El riesgo de transmisión postransfusional ha disminuido en la actualidad porque desde la década del 70 se implementó, con carácter obligatorio, el pesquisaje de toda la sangre donada (58).

La transmisión por contacto sexual constituye una de las principales vías en los países desarrollados, junto al uso de drogas parenterales y la exposición ocupacional (97).

En Cuba, la incidencia de la hepatitis B disminuyó de 2 194 casos en 1992 a 20 en el año 2011, gracias a las medidas de prevención aplicadas en el país. No obstante, se recomienda mantener los niveles inmunitarios de la población y continuar la vigilancia para los mayores de 30 años, cuya vía principal de transmisión es a través de las relaciones sexuales cuando en la pareja hay un portador del VHB (98-100).

## 1.2. Historia natural de la infección por el VHB

La interacción entre la replicación del virus y la respuesta inmune del hospedero pueden variar el curso clínico de la infección por el VHB (101, 102); esta puede clasificarse en dos grandes grupos: aguda o crónica, si el tiempo que se mantiene instaurada es menor o mayor de seis meses (103-106).

En 95% de los adultos infectados existe una adecuada respuesta inmune, que aclara el virus. Un tercio de estos pacientes manifiesta síntomas de la enfermedad y los restantes presentan infección subclínica (6). Generalmente, los recién nacidos infectados no manifiestan ningún signo o síntoma clínico (91, 107). Estos casos asintomáticos se convierten en portadores silentes del VHB y fuente para la transmisión del mismo (107).

Después de una infección aguda, el riesgo de progresar a la cronicidad, dado por la ausencia de una respuesta inmune suficiente para eliminar el VHB, depende de la edad a la cual el paciente adquirió la infección y varía inversamente con esta, es muy alto para los recién nacidos de madres portadoras del VHB infectados en el período perinatal (108, 109). Igualmente, las personas inmunocomprometidas tienen un elevado riesgo de evolucionar hacia la cronicidad (110). Las consecuencias de la infección crónica abarcan desde el estado de portador asintomático, con graves consecuencias para la diseminación de la infección, hasta la inflamación crónica del hígado, que conduce a la cirrosis y el desarrollo de CHP (111). Los individuos con infección crónica por el VHB tienen un riesgo superior de desarrollar enfermedades graves del hígado, alrededor de un tercio de estos pacientes puede progresar a la cirrosis o desarrollar CHP (112-114).

El VHB ocasiona entre 60-80 % de los CHP a nivel mundial (112). La distribución de edades entre los pacientes que lo presentan sugiere que estos tumores aparecen después de 25 a 30 años de la infección por el VHB y afectan de dos a tres veces más hombres que mujeres (91, 115). La probabilidad de que la infección se haga crónica es la misma para las personas con infección aguda sintomática o asintomática. La persistencia del HBsAg es el principal indicador de riesgo para el desarrollo de una hepatopatía crónica, así como el incremento sostenido en la concentración de las aminotransferasas (8). Su curso se caracteriza por cuatro fases y en cada una de ellas la respuesta inmune del hospedero determina los resultados de la infección y la severidad del daño hepático (116, 117).

Entre 1-10% de las personas infectadas con el VHB presentan manifestaciones extrahepáticas, estas incluyen neuropatía, glomerulonefritis, poliarteritis nudosa, manifestaciones dermatológicas y desórdenes hematológicos, entre otras (118-120), las cuales se deben a la formación de los inmunocomplejos HBsAg-anti-HBsAg, que exceden las capacidades de los sistemas encargados de su eliminación, por lo que comienzan a depositarse de forma sistémica (121).

### 1.2.1. Tratamiento y prevención

Los tratamientos establecidos para la hepatitis B no permiten eliminar completamente el virus y lograr, con ello, la total remisión de la enfermedad. Su objetivo es minimizar la inflamación y prevenir la progresión a la fibrosis

hepatocelular, que conlleva a la cirrosis y al cáncer de hígado, lo cual se logra suprimiendo la replicación viral a los niveles más bajos posibles (105, 106, 122). Se aplican a los pacientes con infección crónica en fase inmunoactiva (altos niveles de replicación viral y aminotransferasas, así como fibrosis o inflamación del hígado) y aquellos que portan mutantes precore (HBeAg negativos) y presenten señales de replicación viral (123).

Hasta la fecha, hay siete drogas licenciadas para el tratamiento de la infección por el VHB, entre ellas se encuentran los moduladores del sistema inmune IFN- $\alpha$ 2a e IFN- $\alpha$ 2a pegilado y los inhibidores de la polimerasa del VHB, como la lamivudina, el adefovir, el entecavir, la telbivudina y el tenofovir. Estos se aplican en forma de monoterapia y también asociados con el IFN (105, 124).

La prevención en el caso específico de la infección por el VHB, adquiere una relevancia especial, teniendo en cuenta las limitaciones de los tratamientos existentes (2). Dentro de las medidas de mayor impacto para reducir la incidencia de la hepatitis B y sus secuelas se encuentran la adecuada certificación de los hemoderivados con técnicas suficientemente sensibles, la aplicación diferenciada de medidas higiénico-epidemiológicas en los grupos de riesgo y la vacunación (12, 13, 125). Otra forma de prevención es mediante la administración de inmunoglobulinas contra la hepatitis B, efectivas cuando se aplican inmediatamente o poco tiempo después de la exposición al virus (58, 91) y se utilizan de manera frecuente en combinación con la vacuna (101, 126).

Se ha demostrado que la vacunación neonatal es efectiva, alterando de forma favorable el curso clínico de la infección en regiones donde la enfermedad es endémica, lo que muestra un positivo balance costo-beneficio de esta acción de salud (127). Sin embargo, a nivel mundial solo uno de cada cinco niños reciben la primera dosis al nacer y muchos adultos en grupos de riesgo permanecen sin vacunar (88).

En 1992 comienza la aplicación en Cuba de una vacuna de producción nacional contra la hepatitis B (Heberbiovac HB®) (128, 129). El aumento de la cobertura de inmunización con este producto farmacéutico (que abarca los menores de 20 años y los principales grupos de riesgo) y la adecuada certificación de los hemoderivados mediante métodos de diagnóstico también desarrollados en el país, permiten la reducción de la incidencia de la enfermedad en 98% entre los años 1992 y 2011. No obstante, la prevalencia de la infección por el VHB entre los mayores de 30 años, hace que se considere aún como un problema de salud por las autoridades sanitarias nacionales, por lo que es necesario mantener el sistema de vigilancia, en el cual las pruebas para su diagnóstico juegan un importante papel (100, 130).

### 1.3. Epidemiología de la hepatitis B

Según los reportes de la Organización Mundial de la Salud (OMS), unos 2 000 millones de personas han padecido la hepatitis B. Además, se estima que es el riesgo ocupacional más importante para los trabajadores de la salud y que 25% de los niños que se infectan mueren en la adultez de cáncer de hígado o cirrosis hepática (2, 88).

De acuerdo a la prevalencia de portadores crónicos del VHB, el mundo puede dividirse en tres áreas (figura 1.3) (53, 101, 131). En las áreas de alta prevalencia, donde vive 45% de la población mundial, aproximadamente entre 70-90% de los individuos se infecta antes de los 40 años de edad y de 8 a 20% son portadores del VHB (91). La mayoría de estas infecciones ocurren al nacimiento o durante la infancia temprana, cuando el riesgo de progresar hacia la cronicidad es elevado, por lo que las tasas de enfermedad crónica y cáncer de hígado son altas (132). El 43% de la población del mundo habita regiones de prevalencia intermedia, donde el riesgo de infección por VHB a lo largo de la vida va desde 20 a 60% y estas ocurren en todos los grupos de edad. Además de la transmisión perinatal, las vías más probables de infección son los contactos hogareños, las relaciones sexuales y la exposición percutánea (53).

Menos de 20% de la población en las regiones de baja prevalencia ha estado infectada con el VHB (91, 101) y la mayoría de estas infecciones ocurren entre los adultos, en grupos de riesgo bien definidos, los cuales incluyen a los usuarios de drogas intravenosas, los homosexuales hombres y el personal con exposición ocupacional a la sangre y los fluidos contaminados, entre otros (97).

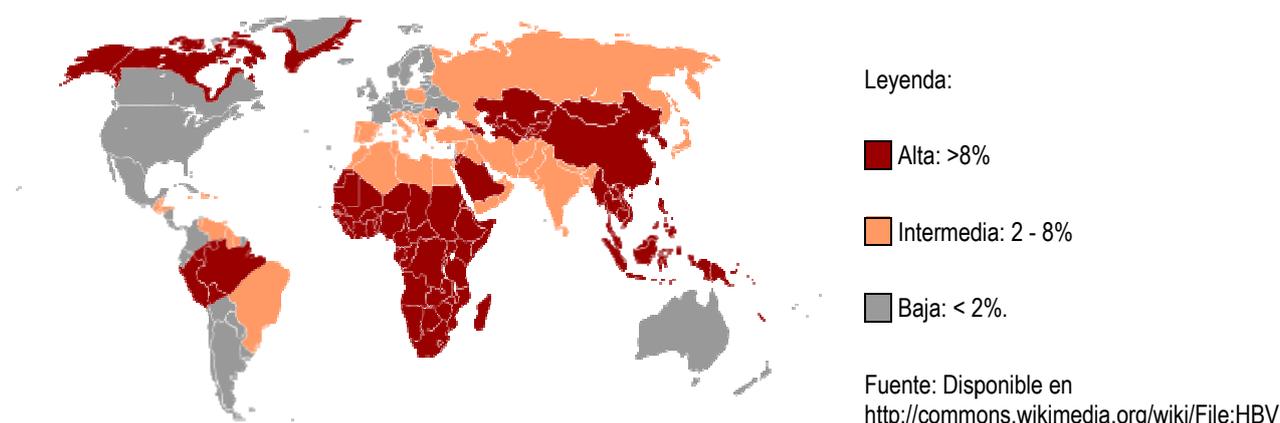


Figura 1.3 Prevalencia mundial de portadores crónicos de VHB

En cuanto a la distribución de los subtipos y genotipos del VHB, los subtipos *adw*, *ayw* y *adr* se encuentran en extensas regiones geográficas del mundo, mientras que el *ayr* solo se detecta en pequeñas poblaciones de Oceanía (101, 133).

Los genotipos muestran una distribución geográfica específica. El genotipo A es prevaeciente en Europa occidental, América del Norte y Sur y Este de África, en tanto que la distribución de los genotipos B y C es bastante entremezclada, siendo frecuentes en el Lejano Oriente y el Sudeste de Asia. Específicamente, el genotipo C se encuentra también en las poblaciones de las islas del Pacífico Sur, donde la prevalencia de portadores del VHB es muy alta. El genotipo D es el de más amplia distribución, es frecuente en el subcontinente Indio, en el medio Oriente, la cuenca del mediterráneo y algunas partes de Africa, mientras que el genotipo E, que es el más similar genéticamente al D, es frecuente en Africa occidental y otras partes de este continente. El genotipo F es el más divergente, predomina en América del Sur y Central, así como la Polinesia y es casi único entre los indios americanos, por lo que se considera perteneciente a la población nativa del Nuevo Mundo. El genotipo G, descubierto en los '2000, se encuentra en Europa (fundamentalmente Francia) y América del Norte y tiene alta estabilidad genética. Todas las cepas aisladas del genotipo el H, íntimamente relacionado con el F, son procedentes de América Central y del Norte (59, 68, 134)

Cuba se ubica en una región geográfica con una prevalencia de portadores del HBsAg por debajo de 2% (130) y los genotipos predominantes son A y D, este último en menor proporción (135).

#### 1.4. Diagnóstico de la hepatitis B

##### 1.4.1. Características del diagnóstico de la hepatitis B. Marcadores serológicos

La hepatitis B es una enfermedad compleja que puede ser diagnosticada mediante la interpretación precisa de parámetros bioquímicos, serológicos, virológicos e histológicos (88, 106, 136). Debido a que el VHB no crece con facilidad en los cultivos celulares, las pruebas serológicas para la detección de sus antígenos y anticuerpos específicos, así como el ADN viral, son las herramientas más empleadas para el diagnóstico de la infección. La determinación de estos marcadores serológicos durante estudios de rutina de la sangre, constituye la clave del diagnóstico dado que la infección por el VHB puede ser subclínica y existen portadores asintomáticos (137-140).

En la hepatitis B se identifican tres sistemas de antígeno-anticuerpo, todos muy útiles para el diagnóstico y el pronóstico evolutivo de la enfermedad: HBsAg/anti-HBsAg, anticuerpos IgM e IgG al HBcAg y HBeAg/anti-HBeAg (107). El comportamiento de estos marcadores serológicos, varía en dependencia de si la infección es aguda o crónica (122) (figuras 1.4 y 1.5, anexo1). Otros factores como la respuesta de cada individuo a la infección y la presencia de virus mutantes pueden influir en los resultados de estas pruebas (19).

El primer antígeno detectable en la sangre luego de la infección es el HBsAg, este aparece en el suero desde el período de incubación y alcanza su máxima concentración cuando se inician los síntomas y comienzan a elevarse

las aminotransferasas. Su detección indica infección, aunque no necesariamente replicación viral. Está presente durante la infección aguda, volviéndose indetectable para aquellas personas que aclaran el virus; pero persiste en la infección crónica. Su permanencia en el suero por más de seis meses define este tipo de infección (14).

Los anticuerpos anti-HBsAg son los últimos en aparecer después del comienzo de la infección. Se detectan algunas semanas o meses después que el HBsAg ya no es detectable. No se identifican desde el inicio de la infección por la formación de inmunocomplejos con el antígeno (103). Su presencia indica recuperación clínica y desarrollo de inmunidad, ya que neutralizan el VHB y proporcionan protección contra sus re-infecciones. Los anti-HBsAg generalmente persisten por toda la vida en personas recuperadas de una hepatitis B aguda o en aquellas que responden a la vacunación; pero no son detectables en los pacientes con infección crónica o aparecen en bajas concentraciones (40, 50, 124, 141).

El HBcAg no se detecta en la sangre durante la infección por el VHB. Sin embargo, sus anticuerpos se evidencian en el suero una o dos semanas después de la aparición del HBsAg. Los anti-HBc de clase IgM son los primeros en aparecer y constituyen el marcador más importante en el período de ventana inmunológica, durante el cual el HBsAg disminuye a niveles imperceptibles y los anticuerpos anti-HBsAg aún no son detectados por las pruebas serológicas (figura 1.4, anexo 1). Se identifican con altos títulos durante la infección aguda y su elevación es evidencia de este tipo de infección, aunque pueden encontrarse también en bajos niveles durante los períodos de reactivación de la hepatitis B crónica (142). Cuando los anticuerpos IgM comienzan a declinar, empiezan a detectarse los IgG anti-HBc, que persisten casi siempre de por vida a pesar de no ser anticuerpos protectores, por tanto, pueden estar presentes en todas las personas que han estado expuestas al VHB, tanto en las infecciones resueltas, como en las crónicas (142). La mayoría de los ensayos serológicos disponibles no detectan directamente estos anticuerpos, sino anticuerpos totales anti-HBc, cuya determinación en algunos países se aplica al pesquaje de la sangre y sus productos, contribuyendo a la identificación de los individuos infectados por el VHB (70).

El HBeAg aparece en el suero simultáneamente o poco tiempo después del HBsAg y comienza a desaparecer hacia el momento de elevación máxima de las aminotransferasas, cuando los síntomas son más intensos. Es uno de los marcadores de replicación viral activa y, por tanto, de alta infectividad y severidad de la enfermedad. Sin embargo, la existencia de una población crónicamente infectada que presenta altos niveles de ADN y son negativos para el HBeAg (mutantes precore y del promotor core), ha hecho que este antígeno deje de considerarse un marcador inequívoco de replicación viral (70). Cuando el HBeAg declina, comienzan a detectarse sus anticuerpos, que generalmente persisten por uno o más años luego de la resolución de la infección y cuya presencia se asocia a

una reducción de la infectividad del paciente y pronóstico de recuperación, por lo que la seroconversión a anti-HBeAg se toma como punto final del tratamiento (14, 40, 141, 143). Esta seroconversión aparece temprano en los pacientes con infección aguda. En los portadores crónicos el HBeAg y su anticuerpo se presentan de manera variable, en dependencia de si el paciente se encuentra, o no, en fase replicativa (14).

El mejor indicador de replicación viral activa y alto grado de infectividad es la presencia de ADN del virus en el suero, por lo que se emplean diferentes técnicas de biología molecular para la detección serológica del genoma viral (143), esto ha resultado de utilidad para evaluar, tanto el nivel de replicación en los pacientes infectados, como la respuesta al tratamiento en aquellos que reciben terapia, para lo cual se emplean métodos que cuantifican el nivel de ADN viral (14).

La detección de los marcadores serológicos de la infección se logra con pruebas basadas en la reacción antígeno-anticuerpo, siendo los ensayos que usan como marcador enzimas (EIE), los más empleados. El uso combinado de estos, con las técnicas de biología molecular, contribuye al mejor entendimiento de la patobiología de la infección por el VHB, propiciando las herramientas para establecer el tipo de infección, su etapa y pronóstico, así como identificar los momentos de replicación activa del virus, todo lo cual se logra con el análisis simultáneo de los diferentes marcadores (11, 144). En la tabla 1.1 (anexo 2) se presenta un resumen de las diferentes interpretaciones que se pueden dar sobre el estado y fases de la infección por el VHB, en dependencia del comportamiento de los marcadores serológicos.

#### 1.4.2. Evolución de los métodos de diagnóstico de la hepatitis B. Detección del HBsAg

Para evidenciar la reacción antígeno-anticuerpo en el diagnóstico serológico de la hepatitis B, se desarrollan métodos de diferentes generaciones, que se diferencian en su sensibilidad. Dentro de los de primera generación el más empleado es la inmunodifusión doble (145), método muy específico, pero de baja sensibilidad. La segunda generación de inmunoensayos se caracteriza por métodos como la CIEF (146), con una mejor sensibilidad que los anteriores; pero aún insuficiente y las técnicas de aglutinación, como la hemaglutinación pasiva (146), superior en sensibilidad, pero menos específica.

En los métodos de tercera generación para la detección del HBsAg se emplean diferentes marcadores: isótopos radioactivos, como el caso del RIA (147); compuestos fluorescentes en técnicas inmunohistoquímicas y enzimas, empleadas en los EIE, entre otros (24). El primero de estos métodos es la técnica de RIA (148), descrita en 1959, con la cual se logran altos niveles de sensibilidad y especificidad, sin embargo requiere de equipos y reactivos costosos y el uso de material radiactivo representa un riesgo potencial. Doce años más tarde, dos equipos de

trabajo diferentes introducen casi al mismo tiempo el uso de enzimas como marcadores, iniciándose la era de aplicación de los EIE (149, 150), que, siendo igualmente sensibles y específicos, presentan ventajas en cuanto al empleo de reactivos relativamente baratos y de larga vida, procedimientos técnicos rápidos y sencillos, así como permiten el uso de gran variedad de sustratos, entre otras; por lo que tienen un auge vertiginoso y se utilizan para la detección de diversos antígenos y anticuerpos (20, 24).

Los EIE se apoyan en la extraordinaria especificidad de los anticuerpos, así como en el elevado poder catalítico y la alta especificidad de las enzimas. Mediante la combinación de la reacción inmunológica con un indicador altamente sensible, el específico; pero débil efecto inmunológico, se ve reforzado por la amplificación enzimática, de forma que se consiguen elevados niveles de sensibilidad, detectabilidad y especificidad, características imprescindibles para cualquier método de diagnóstico (24). Entre los marcadores enzimáticos más utilizados se encuentran la fosfatasa alcalina y la peroxidasa (151). El uso de sustratos de depósito permite la visualización de los resultados y han sido muy utilizados para el diseño de pruebas rápidas sobre membranas, para evidenciar la presencia de HBsAg (152).

La mayoría de los ensayos serológicos disponibles comercialmente para la detección de los antígenos y anticuerpos del VHB se basan en EIE del tipo ELISA (20), también llamados heterogéneos, los cuales transcurren en dos fases: sólida y líquida y requieren la realización de lavados intermedios para separar el inmunocomplejo formado sobre la fase sólida y las biomoléculas no fijadas (24). Estas técnicas atienden a diferentes principios (captura, tipo sándwich, entre otros) de acuerdo al marcador del VHB que se quiera detectar (24).

El hecho de que la detección del HBsAg sea suficiente para indicar la infección con el VHB y que se encuentre presente tanto en las infecciones agudas como en las crónicas, le confiere gran importancia a la detección de este marcador en los programas de pesquisaje de la hepatitis B, constituyendo los ensayos para la detección del HBsAg las pruebas más aplicadas para el pesquisaje de los donantes de sangre y la vigilancia de los grupos de riesgo, por lo que se trabaja en la mejora continua de la sensibilidad y detectabilidad de estas pruebas, preservando niveles de especificidad aceptables. Los ELISAs para la detección del HBsAg se basan en el principio sándwich y emplean AcP o AcM dirigidos contra los principales determinantes antigénicos del HBsAg, fundamentalmente el determinante común *a*, con lo cual se garantiza la detección de todos los subtipos del virus (153).

La optimización de las características funcionales de estos ensayos se logra, en primer lugar, asegurando la calidad de los reactivos biológicos que se involucran en ellos. Inicialmente, se emplean AcP, tanto para la fase sólida, como para el revelado de la reacción inmunológica. Luego, estos se sustituyen por AcM, primero usados como

anticuerpos de captura y posteriormente, también formando parte del conjugado de la reacción. El uso de AcM ofrece ventajas con respecto a los policlonales, estos anticuerpos por su especificidad definida reaccionan con una afinidad uniforme y pueden ser purificados hasta la homogeneidad, lo que permite disponer sin limitaciones de un reactivo biológico homogéneo y de propiedades bien definidas. Sin embargo, su origen clonal determina que se necesite mezclar diferentes anticuerpos para obtener un rango de especificidades suficientemente amplio (154).

El empleo de diferentes materiales y formas como fase sólida es otro de los recursos utilizados para aumentar la sensibilidad y detectabilidad de estos ensayos, siendo el poliestireno el más usado por sus excelentes propiedades ópticas, dureza mecánica y la unión estable de los reactivos a su superficie. Para los ensayos colorimétricos se usa el poliestireno transparente y para los fluorimétricos los blancos o negros. Por otra parte, las matrices particuladas, como las perlas o micropartículas, las membranas y los formatos de tubos, tiras o placas de fondo tipo "estrella", mejoran las características de los ensayos al aumentar la superficie de contacto, lo que posibilita, además, disminuir los tiempos de reacción. Los formatos en microplacas tienen una gran aplicación por permitir el procesamiento simultáneo de un elevado número de muestras (20, 24).

Otro de los aspectos que se toman en cuenta para mejorar la detectabilidad de las pruebas de ELISA destinadas a la detección del HBsAg, es el empleo de diferentes sustancias asociadas a los componentes de la reacción, como el sistema avidina/biotina, que amplifica el efecto inmunológico y encuentra una amplia aplicación en estos ensayos (24-26, 29). Una de las interacciones más usadas en inmunoquímica es la que se establece entre la biotina, una vitamina soluble en agua y la avidina, una proteína de la clara del huevo. La avidina puede conjugarse con enzimas, fluorocromatos, ferritinas o marcadores coloidales y, al tener varios sitios de unión para la biotina, actúa como un agente amplificador de la reacción; incrementando la detectabilidad y sensibilidad de los ensayos.

La molécula de biotina, por su parte, puede activarse y acoplarse a los antígenos o anticuerpos, generalmente con retención completa de la actividad biológica de los mismos (28). La intensidad de la interacción avidina-biotina constituye una herramienta excepcional para mejorar las características de los inmunoensayos (155). La avidina provoca algunas reacciones inespecíficas, por lo que se sustituye por la estreptavidina obtenida a partir de la bacteria *Streptomyces avidinii*, que no presenta dificultades inherentes a uniones inespecíficas y es de más fácil obtención (156). El complejo biotina/estreptavidina tiene gran aplicación en los ensayos utilizados para la detección de HBsAg (26, 29).

La aplicación de variantes que eleven cada vez más los niveles de sensibilidad y detectabilidad de las pruebas de pesquiasaje del HBsAg, conservando adecuados índices de especificidad, permite el cumplimiento de los

requerimientos dispuestos por las autoridades internacionales y de cada país en particular, sobre el nivel mínimo de detección de HBsAg que deben tener estos ensayos para emplearse en la certificación de la sangre (20, 157).

En este sentido, se establecen patrones de referencia internacionales, un modo de proporcionar la base para la normalización de los ensayos que detectan el HBsAg, así como una útil herramienta en manos de las autoridades regulatorias para facilitar la comparación de los resultados en diferentes laboratorios y por diferentes ensayos, desde pruebas de ELISA de última generación hasta las llamadas pruebas rápidas (158).

En 1985, el Grupo Asesor de Hepatitis del Departamento de Salud y Seguridad Social y el Instituto Nacional para Estándares y Controles Biológicos (NIBSC, por sus siglas en inglés), del Reino Unido, preparan y establecen un estándar para el HBsAg a partir de un suero positivo a hepatitis B del subtipo ad. Al estándar obtenido se le asigna una concentración de HBsAg de 100 Unidades Internacionales (UI) por ampolla (1 UI equivale a 0,55 Unidades Paul Ehrlich Institute (UPEI)) y se le identifica como el Primer Estándar Internacional de la OMS, con el código 80/549 (159, 160). Esta preparación de referencia se reemplaza, en 2003, por otra que contiene HBsAg del subtipo adw2 y genotipo A, purificado e inactivado por calor. Este Segundo Estándar Internacional se codifica como 00/588 y su concentración por vial es de 33 UI de HBsAg (1 UI equivale a 0,58 UPEI) (161).

El número de pruebas comerciales disponibles para la detección del HBsAg aumenta de manera progresiva, así como sus niveles de sensibilidad y especificidad. Por tal motivo, se realizan estudios por parte de las entidades regulatorias internacionales para evaluar las características funcionales de las mismas, tanto en formato de ELISAs, como de pruebas rápidas, las cuales muestran diferentes niveles de detección para el HBsAg, desde ensayos muy sensibles capaces de detectar concentraciones de HBsAg a partir de 0,13 UI/mL (según Estándares Internacionales de la OMS) hasta las pruebas menos sensibles, cuyo nivel de detectabilidad inhabilita su empleo en la certificación de sangre, tal es el caso de algunas pruebas rápidas (158, 161).

En la actualidad, un importante número de los ensayos disponibles para la detección del HBsAg se encuentran parcial o totalmente automatizados. Estos analizadores permiten elevar la velocidad del procesamiento de las pruebas, aumentan el número de muestras evaluadas por unidad de tiempo y disminuyen el tiempo de ejecución de las técnicas (148, 149, 153). Por otra parte, la cuantificación del HBsAg adquiere importancia en los últimos años, sobre todo a partir de la introducción de los ensayos automatizados (162, 163), debido a que diversos estudios demuestran su utilización en la predicción de la respuesta a diferentes medicamentos antivirales o para evaluar la efectividad de los mismos (164-171).

A pesar de las mejoras constatadas en cuanto a la detectabilidad y sensibilidad alcanzadas por los ensayos para HBsAg, existen situaciones en las que este marcador no es detectable aunque el VHB esté presente, tal es el caso de la fase temprana de la infección, durante el período de ventana inicial o hacia el final de la fase aguda, cuando el virus se está aclarando; pero los anti-HBsAg aún no han aparecido (3, 15, 172). Otro caso lo constituyen los mutantes de escape de la vacunación, que portan variaciones en la secuencia del determinante *a* (173-175), lo que provoca que este no sea reconocido en las pruebas de diagnóstico disponibles. Por otra parte, se pueden encontrar variantes del virus que no pueden sintetizar las proteínas de envoltura, las cuales, en algunos casos, representan la población viral dominante en los pacientes con hepatitis crónica (176). También el caso de personas infectadas con variantes del virus que producen muy bajos niveles de HBsAg, por lo que este marcador se hace indetectable en los ensayos de diagnóstico. Todas estas situaciones en las que existe presencia del virus en la sangre o el hígado; pero el HBsAg se hace indetectable se clasifican como infección de hepatitis B oculta (117, 177-179), por lo que para establecer la infección en estos casos, se recurre a las pruebas que detectan el ADN viral (180).

Para detectar el ADN del VHB existen técnicas de hibridación de ácidos nucleicos, dot blot y slot blot, así como ensayos de hibridación líquida (181) y técnicas de NAT, dentro de las cuales se incluye la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, polymerase chain reaction, por sus siglas en inglés), que permiten detectar trazas de ADN (16, 181-183). La PCR se considera la más sensible de todas las técnicas de detección y cuantificación de ADN (70).

Con el objetivo de prevenir la transmisión del VHB asociada a las transfusiones o los productos de la sangre, determinada por la no detectabilidad del HBsAg en personas infectadas, a finales de los '90 se establece el pesquisaje del ADN viral en los donantes de sangre (172), además de las pruebas de HBsAg, lo cual se lleva a cabo con pruebas de NAT en mezclas que, por lo general, abarcan 20 bolsas de sangre y ante un resultado positivo se analizan de manera individual las 20 donaciones que conforman la mezcla.

Independientemente de las ventajas que ofrecen las técnicas de detección del ADN viral, estas son más costosas y laboriosas, por tanto, tienen menos posibilidades de aplicación en las labores de pesquisajes masivos que se realizan en los sistemas de salud, por lo que los ELISAs que detectan el HBsAg siguen siendo las herramientas más usadas para estas tareas (18, 20). Lo que se trata es de incrementar cada vez más sus niveles de detectabilidad y sensibilidad, para lograr la identificación del HBsAg en aquellas situaciones en que se encuentra a muy bajas concentraciones, reduciendo así el período de ventana inicial de la infección. Todo lo cual debe ocurrir sin una afectación importante de la especificidad del sistema (20).

### 1.4.3. Ensayos confirmatorios para el HBsAg

A pesar de la alta especificidad de las pruebas desarrolladas para el pesquisaje del HBsAg, se obtienen resultados falsos positivos, los cuales se clasifican en: no repetibles, cuando se deben a errores de manipulación o instrumental, o repetibles, si se producen por la ocurrencia de reacciones inespecíficas provocadas, entre otras causas, por la presencia en la muestra de anticuerpos tipo factor reumatoideo, anticuerpos heterófilos, o anticuerpos contra la enzima u otros componentes que forman parte del conjugado de la reacción, los cuales pueden establecer puentes entre el complejo fijado a la fase sólida y los anticuerpos marcados (153). Por tanto, junto con el desarrollo de los métodos inmunoenzimáticos para la detección del HBsAg, se desarrollan los ensayos confirmatorios con el objetivo de establecer un resultado definitivo sobre la presencia o no de este marcador en las muestras reiteradamente reactivas en la prueba de pesquisaje (184-187).

Los falsos positivos no repetibles por lo general se eliminan cuando se repite la prueba, siempre y cuando se subsane el error que los provoca. Sin embargo, aquellos que se deben a interacciones inespecíficas, muestran resultado positivo en el ensayo de pesquisaje tantas veces como se realizan y solo son clasificados como tal tras su evaluación en la prueba confirmatoria.

La mayoría de los ensayos comerciales que confirman la presencia de HBsAg en el suero de las personas infectadas se basan en el principio de neutralización, que tiene lugar mediante: (i) el establecimiento de una competencia por los epítomos del virus entre los anticuerpos neutralizantes y los anticuerpos marcados, cuando se administran al mismo tiempo; (ii) el efecto bloqueador que ejercen los anticuerpos neutralizantes al ocupar los epítomos del HBsAg, cuando se aplican en un paso previo a los anticuerpos marcados y (iii) la neutralización en fase líquida, cuando la muestra se somete a una preincubación con los anticuerpos neutralizantes, los cuales al encontrarse en exceso, ocupan todos o la mayoría de los determinantes antigénicos presentes en ella (20).

La OMS plantea que la confirmación de aquellos resultados positivos por ELISA se realiza mediante una prueba de neutralización, usando antisueros específicos anti-HBsAg y tomando como base la misma prueba de pesquisaje (20). La aplicación de ensayos para confirmar la presencia del HBsAg, incrementa la confianza en los resultados, permite tomar conductas epidemiológicas y terapéuticas adecuadas en los pacientes clasificados como portadores del VHB y posibilita un mayor aprovechamiento de las donaciones de sangre, al desechar solo aquellas que son verdaderamente positivas (184-190).

#### 1.4.4. Ensayos para la detección del HBsAg en Cuba

##### 1.4.4.1. Antecedentes

El diagnóstico de la hepatitis B en Cuba, con reactivos autóctonos, se establece en el año 1975, mediante la técnica de CIEF, desarrollada por Gonzáles Griego y cols., en el Instituto Ciencias Básicas y Preclínicas (ICBP) "Victoria de Girón" (191). Este método se extiende a los policlínicos y hospitales, así como a los bancos de sangre y Centros Provinciales de Higiene y Epidemiología (192) y se aplica tanto para muestras de suero, como de sangre en papel de filtro; pero como método de segunda generación, ya en la década de los 80' no cumple con las exigencias del desarrollo científico, debido a la existencia de otros ensayos de mayor sensibilidad, como los ELISAs, recomendados por la OMS para la determinación del HBsAg (193, 194).

Por ello, en el año 1985, en este mismo instituto se normaliza un ELISA tipo sándwich de doble anticuerpo para la detección del HBsAg en suero humano (ELISA-Girón) (195), que es rápidamente introducido en los bancos de sangre y unidades asistenciales, para el pesquisaje de la hepatitis B

Este sistema emplea AcP obtenidos en ovejas, tanto para la captura, como para el revelado, utiliza un volumen de reacción de 50  $\mu$ L, con una duración de 4 h y 15 min y la lectura se realiza de manera visual. A pesar de las limitaciones de este ensayo en cuanto al carácter artesanal de su producción, el tiempo de duración de la técnica y la forma de interpretación de los resultados, así como su detectabilidad (alrededor de 2 ng/mL de HBsAg), constituye el primer ensayo tipo ELISA de producción nacional y uso generalizado para la certificación de sangre y la vigilancia epidemiológica de la hepatitis B en Cuba (195).

##### 1.4.4.2. Desarrollo de ensayos para la detección de HBsAg, basados en la tecnología SUMA

La tecnología SUMA, desarrollada por el CIE, es un sistema integral de reactivos, equipos, programas y servicios de postventa, que, puesto al servicio del Sistema Nacional de Salud, posibilita el estudio masivo y el diagnóstico de un gran número de enfermedades a través de las labores de pesquisajes (33). Las pruebas que utilizan como soporte esta tecnología son generalmente de tipo ELISA y se caracterizan por emplear pequeños volúmenes (5-10  $\mu$ L) de reactivos y muestras, motivo por el cual se denominan ultramicroELISA, las cuales constituyen la base primaria de importantes programas de salud en el país (35).

Dentro de los objetivos de trabajo del CIE está el desarrollo de pruebas económicas, confiables y escalables a niveles productivos para la detección y confirmación del HBsAg en muestras humanas, las que, cumpliendo las normas de las Buenas Prácticas de Fabricación de Diagnosticadores (196), dotan al país de las herramientas necesarias para la detección de este importante marcador de la infección por el VHB y constituyen el soporte de los

programas nacionales de certificación de sangre y vigilancia epidemiológica de esta enfermedad en el sistema de salud.

Para el cumplimiento de estos objetivos se desarrollan diferentes generaciones de ensayos inmunoenzimáticos para la detección del HBsAg, cada uno de ellos cualitativamente superior al anterior, de modo similar a lo acontecido en la dinámica mundial. Todos los ensayos desarrollados son heterogéneos de tipo sándwich de doble anticuerpo. El primero de ellos, se normaliza en 1989, emplea AcP obtenidos en oveja, tanto para el recubrimiento de la fase sólida, como para el revelado de la reacción inmunológica y su detectabilidad es de 2 ng/mL. Con este ensayo se sustituye el ELISA suministrado con anterioridad por el ICBP "Victoria de Girón" y si bien no mejora la detectabilidad de este, se reducen considerablemente los volúmenes de muestras y reactivos, lo cual abarata los costos, además de garantizar una entrega estable en formato de estuche y con el equipamiento SUMA necesario para la realización de la técnica. Dos años después, este ensayo se sustituye por una variante con AcM inmovilizados en la placa de reacción, lo cual permite mejorar la detectabilidad de la prueba a niveles entre 0,5 y 1 ng/mL (197). No obstante, el incesante desarrollo a nivel mundial de las técnicas para la detección del HBsAg en cuanto a sus características funcionales de detectabilidad, sensibilidad y especificidad, incita a continuar trabajando para acercar el diagnóstico de la hepatitis B en Cuba al nivel de los requerimientos internacionales (160).

Por otra parte, la normalización de una prueba de mayor sensibilidad y detectabilidad para las muestras de suero o plasma, permitiría, además, evaluar el desempeño del ensayo en muestras de SSPF, atendiendo a sus ventajas. La toma de muestra de sangre total en papel de filtro es un proceder sencillo, económico y aplicable en el diagnóstico de múltiples enfermedades debido a las facilidades que ofrece este método de recolección, ya que no es necesario un adiestramiento especial para su obtención, no se precisa de jeringuillas, tubos de ensayo, ni centrifugas; aumenta la capacidad de conservación de las muestras, que se mantienen estables durante algunos días a temperatura ambiente o por largos períodos de tiempo a 4 °C o -20 °C; el transporte se facilita al no haber peligro de derrame del material biológico colectado y las muestras se pueden enviar por correo (37, 198, 199). En el caso específico de la hepatitis B, la infectividad del VHB disminuye en este tipo de muestras, respecto a las líquidas (200) y se eliminan los riesgos de adquirir accidentalmente el agente infeccioso por rotura de la cristalería. Asimismo, su obtención permite una mejor cooperación de los individuos para la recolección de las mismas, lo cual puede realizarse en condiciones de campo (38, 201).

El empleo de estas muestras facilita la realización de estudios epidemiológicos en poblaciones que habitan regiones poco accesibles, donde se dificulta la obtención de muestras de suero o plasma, así como su

transportación y conservación. A pesar de sus ventajas, la detección del HBsAg en papel de filtro se aplica poco en los ensayos disponibles a nivel mundial, seguramente debido a la afectación en la detectabilidad y sensibilidad que presupone su empleo respecto a las de suero o plasma, ya que es necesario aplicar una dilución a la muestra de sangre seca para eluir el analito de interés, en tanto las de suero o plasma se emplean por lo general en forma pura.

El primer reporte en la literatura sobre la utilización de muestras en papel de filtro para la detección de HBsAg data de 1978, cuando Farzadegan y cols., proponen un método para la detección del HBsAg en eluatos de manchas de sangre seca (202). Otros investigadores las utilizan para estudios epidemiológicos de hepatitis B en áreas extensas, alejadas del centro de estudio (37, 203, 204). Este método también se incorpora al programa de pesquiasaje del hepatocarcinoma celular en Alaska, donde se incluye la detección de alfafetoproteína y HBsAg (38). Se recomienda utilizar esta forma de recolección de muestras en países en vías de desarrollo, para la realización de estudios epidemiológicos donde la prevalencia de la infección por el VHB es alta (37, 205). Otros autores emplean muestras de SSPF en estudios moleculares para el diagnóstico de la infección por el VHB (206).

El pesquiasaje de la hepatitis B en Cuba se realiza mediante una Red Nacional de Laboratorios SUMA, que incluye 257 laboratorios ubicados en bancos de sangre, centros de higiene y hospitales de todo el país (35). En los mismos se realiza la detección del HBsAg, fundamentalmente en muestras de suero y aquellas que son repetidamente reactivas a este marcador, se someten a la prueba confirmatoria para establecer un resultado definitivo. Los individuos positivos a la infección por el VHB se atienden en una consulta especializada, donde se siguen mediante pruebas bioquímicas, así como la determinación de otros marcadores de la hepatitis B, estableciéndose el tipo de infección, la fase en que se encuentran y se aplica tratamiento en los casos necesarios. Desde la implementación de los programas de vigilancia epidemiológica y certificación de la sangre con la tecnología SUMA, en 1988 y hasta junio de 2012, se pesquisaron para el HBsAg un millón y medio de embarazadas, más de 11 millones de donantes de sangre y alrededor de 8 millones de personas pertenecientes a los grupos de riesgo, con un porcentaje de confirmación de los resultados positivos que se encuentra alrededor de 80% (35, 100).

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se describe el desarrollo, el registro y la introducción en Cuba de un ultramicroELISA para la detección del HBsAg en muestras de suero, plasma y SSPF, así como su prueba confirmatoria.

### 2.1. Materiales

#### 2.1.1. Materiales de referencia

##### 2.1.1.1. Preparaciones estándar de los subtipos ad y ay del HBsAg (Instituto Paul Ehrlich, Alemania)

Estas preparaciones de referencia, procedentes del Instituto Paul Ehrlich (PEI, por sus siglas en inglés), se presentan en forma líquida, a una concentración de 1 000 UPEI/mL de HBsAg para ambos subtipos (1 UPEI/mL = 1 ng/mL).

##### 2.1.1.2. Primer Estándar Internacional de la OMS para el subtipo ad del HBsAg, código 80/549 (NIBSC, Reino Unido)

Es un suero positivo al HBsAg, subtipo ad. Se presenta en forma liofilizada y una vez reconstituido tiene una concentración de 100 UI/mL (1 UI = 0,55 UPEI).

##### 2.1.1.3. Estándar Secundario HBsAg subtipo ad (CIE, Cuba)

Se preparó tomando como referencia la disolución estándar del HBsAg-ad del PEI. Se presenta en forma liofilizada y una vez reconstituido tiene una concentración de 153 ng/mL (207).

##### 2.1.1.4. Paneles de la Boston Biomedica, Inc.

- Panel de bajo título de HBsAg PHA 105: Compuesto por 15 muestras de plasma procedentes de donantes de sangre asintomáticos, colectadas entre 1992 y 1996. Contiene un miembro negativo, incluido como control interno y 14 miembros con concentraciones de HBsAg entre 0,1 y 0,8 UI/mL.

- Panel de título mezclado PHA 204: Integrado por 25 muestras de plasma procedentes de donantes de sangre asintomáticos, colectadas entre 1992 y 1998, de ellas 23 positivas al HBsAg con concentraciones entre 0,1 y >3,8 UI/mL y dos negativas, que se incluyeron como control.

Las muestras que componen estos dos paneles de Boston Biomedica, Inc. (BBI) se procesaron por el fabricante mediante filtración estéril, sin la adición de preservantes y sus concentraciones se determinaron por comparación con el Primer Estándar Internacional de la OMS (1<sup>er</sup> EI-OMS), usando el EIE Auszyme Monoclonal, de la compañía Abbott, en su procedimiento de mayor tiempo de duración (12-20 h).

En el caso del panel de bajo título PHA 105, las concentraciones de HBsAg de los 14 miembros positivos se encontraron cercanas a los límites de detección de algunas pruebas de pesquaje licenciadas por la Administración

de Alimentos y Drogas, de E.U.A. (FDA, por sus siglas en inglés) (208), en tanto que los 23 miembros HBsAg positivos que se incluyeron en el panel de título mezclado PHA 204 abarcaron rangos de reactividad entre débil y positivos fuertes. Todas las muestras positivas de ambos paneles se confirmaron por una prueba de neutralización (209).

- Panel de seroconversión de hepatitis B PHM 921: Contiene seis muestras de plasma positivas al HBsAg, subtipo ad, colectadas durante 19 días a partir de un paciente y abarcan concentraciones entre 0,7 y >2,7 ng/mL de HBsAg.

#### 2.1.1.5. Sueros controles

- Suero control negativo preparado en el CIE, Cuba
- Suero control positivo preparado en el CIE, Cuba

#### 2.1.1.6. Estuches comerciales para la detección y confirmación del HBsAg

- MicroELISA Hapanostika HBsAg Uni-Form II (Organon Teknika, Boxtel, Holanda): ELISA basado en el principio sándwich de doble anticuerpo en un paso. Los pocillos de las placas de microELISA se encuentran recubiertos con anti-HBsAg (monoclonal murino). Cada pocillo contiene una esfera de conjugado anti-HBsAg (ovino) marcado con la enzima peroxidasa de rábano picante. Si la muestra contiene HBsAg, se forma el complejo anticuerpo de la fase sólida-HBsAg-anticuerpo marcado con la enzima. Como sustrato se emplea tetrametilbenzidina (TMB), el desarrollo de color indica la presencia de HBsAg.

-Hapanostika HBsAg Uni-Form II Confirmatory (Organon Teknika, Boxtel, Holanda): Prueba basada en el principio de neutralización, mediante el cual una muestra repetidamente positiva reaccionará con un suero neutralizante (anti-HBsAg (mono) diluido en suero humano) y como referencia con un suero control, libre de anti-HBsAg (suero normal de mono diluido en suero humano). Los anticuerpos en exceso neutralizarán los determinantes antigénicos de la muestra, lo que será demostrado por una disminución significativa de la señal de color con respecto a la muestra tratada con el reactivo control. Para su realización, este ensayo necesita del juego de reactivos Hapanostika HBsAg Uni-Form II, de Organon Teknika.

Actualmente estos ensayos se producen por la compañía Biomérieux, Boxtel, Holanda.

#### 2.1.2. Papel de filtro Schleicher & Schuell 903, Alemania

#### 2.1.3. Reactivos químicos y biológicos

- Líquido ascítico con AcM HEP-1 obtenido en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) y producido en el Centro Nacional para Animales de Laboratorio (CENPALAB), ambos de Cuba

- Líquido ascítico con AcM 8H11 obtenido en el Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología (INOR) y producido en el CIE, ambos de Cuba
- Líquido ascítico con AcM 2C4A2 obtenido y producido en el CIE, Cuba
- Líquido ascítico con AcM 2F12H9 obtenido y producido en el CIE, Cuba
- Suero de carnero anti-HBsAg procedente del CIE, Cuba
- Suero de conejo anti-HBsAg procedente del CIE, Cuba
- Suero normal de conejo (SNC<sub>o</sub>) procedente del CIE, Cuba
- Suero normal de carnero (SNC) procedente del CIE, Cuba
- Suero normal de ratón (SNR), procedente del CIE, Cuba
- Eritrocitos Grupo/factor O<sup>+</sup> (Banco de Sangre Docente de Marianao, Cuba)
- Mezcla de sueros humanos libres de HBsAg y de anticuerpos al VIH y al virus de la hepatitis C (VHC), procedentes de la Planta de Hemoderivados, Cuba
- Suero humano de alto título (Concentración de HBsAg 45,76 µg/mL) (Instituto de Gastroenterología, Cuba)
- Ester N-hidroxisuccinimida del ácido biotinaminohexanoico (Sigma, E.U.A.)
- Estreptavidina obtenida del *Streptomyces avidinii* purificado por cromatografía de afinidad (Sigma, E.U.A.)
- Fosfatasa alcalina (EC 3.1.3.1) obtenida de mucosa intestinal de ternero (Roche, Alemania)
- 4-Metilumbeliferil fosfato (Koch Light Ltd., Reino Unido)
- Albúmina de suero bovino (BSA) (Roche, Alemania)
- AH-Sepharose 4B (Amersham-Pharmacia, Suecia)
- Proteína A Sepharose CL-4B (Amersham-Pharmacia, Suecia)
- Columna PD-10 para desalado (Sephadex G-25M) (Amersham-Pharmacia, Suecia)
- Membrana Minisart de acetato de celulosa (Sartorius, Alemania)
- Disolución de glutaraldehído Grado I al 25% (volumen/volumen) (v/v) (Sigma, E.U.A.)
- Disolución reguladora salina-fosfato (PBS) pH 7,3-7,5 con la siguiente composición: NaCl 0,14 mol/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1 mmol/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mmol/L, KCl 2,7 mmol/L, NaN<sub>3</sub> 0,02% (peso/volumen) (p/v)
- Disolución reguladora de lavado (Tris 15 mmol/L, NaCl 0,15 mol/L, NaN<sub>3</sub> 0,02% (p/v), Tween 20 0,05% (v/v) pH 7,8)
- Disolución reguladora del sustrato (Dietanolamina 0,92 mol/L, MgCl<sub>2</sub> 0,72 mmol/L, NaN<sub>3</sub> 0,05% (p/v) pH 9,8)

El resto de los reactivos empleados fueron de calidad analítica.

#### 2.1.4. Fase sólida

Se emplearon placas de tiras para ultramicroELISA (96 pocillos, 30  $\mu$ L por pocillo), de poliestireno con dióxido de titanio e irradiadas, procedentes de Greiner Bio-line, Alemania.

#### 2.1.5. Equipamiento

- Lector fluorímetro/fotómetro PR 521 ( $\lambda_{excitación}= 365$  nm y  $\lambda_{emisión}= 450$  nm) (CIE, Cuba)
- Lavador de placas MAS 301M (CIE, Cuba)
- Multipipeta Erizo 201 (CIE, Cuba)
- Incubadora (Mettler, Alemania)
- Refrigerador de 2-8 °C (Sanyo SRF-S781, Japón)
- Refrigerador de -20 °C (Sanyo SRR-S781, Japón)
- Agitador magnético (IKA, Alemania)
- Espectrofotómetro UV-VIS (Pharmacia, Suecia)
- pHmetro, (Radiometer Analytical S.A., Francia)
- Sistema cromatográfico estándar compuesto por una bomba peristáltica, un detector, un registrador y un colector de fracciones, todos procedentes de Amersham Pharmacia Biotech, Suecia.
- Microcentrífuga 5415C (Eppendorf, Alemania)
- Gabinete refrigerado a 4 °C (LKB, Suecia)
- Centrífuga SCR/BA (Hitachi Koki Co. Ltd, Japón)
- Centrífuga capilar (HC-240C, Alemania)
- Balanza analítica (Sartorius, Alemania)
- Balanza técnica (Sartorius, Alemania)
- Bomba de vacío (GAST, E.U.A.)
- Baño termostático (Messgeräte-Werk LAUDA, Alemania)
- Pipetas de precisión para volúmenes entre 10  $\mu$ L- 5 000  $\mu$ L (Eppendorf, Alemania)
- Pipeta Multicanal de 5-50  $\mu$ L (Eppendorf, Alemania)
- Puntas de pipetas (Eppendorf, Alemania)
- Ponchador P-51 (CIE, Cuba)

## 2.2. Métodos

### 2.2.1. Metodología para la normalización de un ensayo inmunoenzimático para la detección del HBsAg en muestras de suero o plasma

#### 2.2.1.1. Selección del principio de ensayo

Se seleccionó como principio de ensayo un ELISA fluorescente tipo sándwich de doble anticuerpo modificado, empleando como recubrimiento de la fase sólida AcM anti-HBsAg, las muestras de suero o plasma se ensayaron sin diluir y como primer conjugado se usaron AcM y AcP unidos a biotina (Sigma, E.U.A.) [anticuerpos biotinilados (AcB)]. Como segundo conjugado se empleó estreptavidina (Sigma, E.U.A.) unida a la enzima fosfatasa alcalina (Roche, Alemania). El 4-metilumbeliferil fosfato (Koch Light Ltd., Reino Unido) se usó como sustrato de la enzima. El ensayo seleccionado fue cualitativo.

#### 2.2.1.2. Obtención y purificación de los anticuerpos monoclonales y policlonales

En la normalización del ensayo se emplearon cuatro AcM (HEP-1, 8H11, 2F12H9 y 2C4A2), los dos primeros se utilizaban para el recubrimiento de la fase sólida de la generación anterior de UMELISA (UMELISA HBsAg). El AcM murino HEP-1, obtenido en el CIGB, se generó a partir de la fusión de linfocitos esplénicos de un ratón BALB/c inmunizado con HBsAg recombinante (210). El AcM 8H11 se obtuvo en el INOR en ratones inmunizados con HBsAg purificado a partir de plasma humano.

Los AcM 2F12H9 y 2C4A2 se obtuvieron en el CIE, en ratones de la línea BALB/c inmunizados con HBsAg obtenido de plasma humano y HBsAg recombinante, procedente del CIGB (211), respectivamente.

El HBsAg obtenido a partir de plasma humano se purificó en el Laboratorio de Purificaciones del CIE (212) y se utilizó también como inmunógeno en ovejas de la raza Pelibuey Bermejo Oscuro, para la obtención de los AcP.

Los AcM se purificaron por cromatografía de afinidad, empleando como matriz Proteína A-Sepharose CL 4B, según el método descrito por Fredriksson y cols., en 1986 (213), en tanto, los AcP se purificaron por cromatografía de afinidad en una columna empaquetada con AH-Sepharose 4B-Glutaraldehído-HBsAg (214).

#### 2.2.1.3. Caracterización de los anticuerpos monoclonales

La determinación del isotipo de los AcM obtenidos en el CIE se realizó por la técnica de inmunodifusión doble (CALBIOCHEM, Boehringer). La constante de afinidad por el HBsAg se determinó sobre la base de algunas modificaciones al método descrito por Beatty (215), empleando el sistema ultramicroanalítico.

Se realizó un estudio de reconocimiento epitópico de los AcM involucrados en el ensayo, para ello se diseñaron dos pruebas:

**Ensayo indirecto:** Se diseñó para determinar la especificidad de los AcM obtenidos en el CIE, los cuales se evaluaron a una concentración de 0,5 µg/mL en placas recubiertas con 1 µg/mL de los subtipos *ad* y *ay* del HBsAg en PBS. Estos antígenos se purificaron a partir de plasma humano (212). La reacción se reveló con un conjugado anti-IgG de ratón/fosfatasa alcalina a la dilución 1:5 000. Como control positivo (CP) se empleó el AcM HEP-1 y como control negativo (CN) un AcM anti-cadena β de la TSH, con una concentración similar a la de los anticuerpos en evaluación. Como criterio de positividad se consideró un valor de fluorescencia igual o mayor que dos veces la señal del CN.

**Ensayo de inhibición:** Se diseñó un ensayo de inhibición para determinar si los AcM 2F12H9 y 2C4A2 reconocían los mismos epítomos hacia los cuales estaban dirigidos los AcM usados hasta ese momento como recubrimiento en la generación precedente de UMELISA (AcM HEP-1 y AcM 8H11) y también comprobar si reconocían el mismo epítomo entre ellos. Se emplearon placas de UMELISA recubiertas con cada uno de los cuatro AcM involucrados en el estudio, a 10 µg/mL en disolución reguladora Tris-HCl 0,05 mol/L pH 8 (TRIS). Cada AcM, a su vez, a la concentración de 0,5 mg/mL se diluyó 1:2 con una muestra de concentración conocida de HBsAg (10 ng/mL), elaborada a partir del Estándar Secundario HBsAg subtipo *ad*, del CIE (ES-*ad*). Esta mezcla se dejó reaccionar 16-24 h entre 20-25 °C y posteriormente se transfirió a las placas recubiertas con cada AcM.

Como CP se empleó la muestra de 10 ng/mL de HBsAg diluida de manera similar en PBS; como CN se usó el del estuche UMELISA HBsAg. La reacción se reveló con un conjugado anti-HBsAg/fosfatasa alcalina.

Si un AcM unido a la fase sólida era incapaz de reconocer el complejo antígeno-anticuerpo formado por otro AcM, entonces su epítomo había sido ocupado durante la preincubación del complejo y el HBsAg no podría ser capturado en la placa. Si, por el contrario, los sitios de unión al antígeno de ambos AcM eran diferentes, entonces el HBsAg podría ser reconocido en la fase sólida.

Según la fórmula 1 (anexo 3), se calcularon los porcentajes de inhibición de la señal de fluorescencia de la muestra de 10 ng/mL de HBsAg preincubada con cada AcM respecto a la señal del CP. Cuando la inhibición de la señal fluorescente de la mezcla AcM-HBsAg fue superior a 80%, indicó que el AcM de la mezcla y el de la fase sólida reconocían el mismo epítomo. Por el contrario, si el porcentaje de inhibición era menor de 20%, significó que reconocían epítomos diferentes y si se encontraba entre 20 y 80% de inhibición, indicó que reconocían epítomos cercanos en mayor o menor grado (216).

#### 2.2.1.4. Selección de los anticuerpos para la fase sólida y para el conjugado con biotina

Se evaluaron los cuatro AcM para la fase sólida, mezclándolos en diferentes proporciones y tomando como referencia el recubrimiento del UMELISA anterior (tabla 2.1, anexo 5). La evaluación se realizó con un panel de 258 muestras de suero, procedentes de donantes de sangre, clasificadas según sus resultados en el microELISA Hepanostika HBsAg Uni-Form II (Hepanostika HBsAg), de Organon Teknika y una curva (0,0625-4 ng/mL de HBsAg) preparada a partir del estándar del PEI, subtipo ad.

Se evaluó si era necesario mantener los AcP para el revelado de la reacción, en este caso, conjugados con la biotina.

#### 2.2.1.5. Preparación de las muestras de concentración conocida de HBsAg

Por diluciones seriadas se prepararon muestras de concentraciones conocidas a partir de las disoluciones estándar de los subtipos *ad* y *ay* del HBsAg procedentes del Instituto Paul Ehrlich (EPEI-ad y EPEI-ay). Las muestras preparadas abarcaron concentraciones entre 0,05 y 3,2 ng/mL. A partir del 1<sup>er</sup> EI-OMS se elaboraron, también por diluciones seriadas, muestras de concentración conocida entre 0,15 y 4,8 UI/mL. El ES-ad, del CIE, se empleó para la elaboración de muestras de concentración conocida utilizadas en algunos estudios de este trabajo, cuya preparación se describirá en los acápites correspondientes del presente capítulo. En todos los casos se usó como diluyente la disolución reguladora Tris 0,02 mol/L, NaCl 0,15 mol/L, NaN<sub>3</sub> 0,02% (p/v), BSA 8% (p/v) pH 7,2.

#### 2.2.1.6. Preparación del control negativo

El CN se preparó a partir de una mezcla de sueros humanos normales procedentes de la Planta de Hemoderivados previamente certificados para el HBsAg y anticuerpos al VIH y VHC. La mezcla de sueros se sometió a tres procesos de congelación-descongelación con el objetivo de insolubilizar los lípidos y las lipoproteínas y de esta forma facilitar su clarificación. A continuación se centrifugó a 11 292 x *g* durante 30 minutos a 4 °C en una centrífuga Hitachi Modelo 20PR-52D. La capa de lípidos y el material insoluble se eliminó por filtración sobre papel de filtración rápida.

El suero humano clarificado se sometió a una inactivación de las proteínas termolábiles del sistema de complemento durante 1 h a 56 °C, utilizando un baño termostático. Posteriormente, se le adicionó NaN<sub>3</sub> hasta una concentración final de 0,2% (p/v), se coloreó de verde añadiendo erioflavina (Sigma, E.U.A.) al 0,001% (p/v) y acriflavina (Sigma, E.U.A.) al 0,001% (p/v), se homogenizó 1 h entre 20-25 °C y se almacenó de 2 a 8 °C (217).

#### 2.2.1.7. Preparación del control positivo

El CP se preparó a partir de un suero humano de alto título de HBsAg (45,76 µg/mL) libre de anticuerpos al VIH y VHC, que se llevó a una concentración final de  $3 \pm 0,5$  ng/mL con la disolución reguladora Tris 0,02 mol/L, NaCl 0,15 mol/L, NaN<sub>3</sub> 0,02% (p/v), BSA 8% (p/v) pH 7,2 previamente filtrada por membrana de 0,2 µm y coloreada de rojo, con colorante Cristal Ponceau 6R (Sigma, E.U.A.) al 0,002% (p/v). El CP resultante se homogeneizó, utilizando un agitador magnético, durante 2 h a temperatura entre 20-25 °C y se almacenó de 2 a 8 °C (218).

#### 2.2.1.8. Preparación de los conjugados de anticuerpos con biotina

El proceso de biotilación de los anticuerpos se llevó a cabo por el método del ester de succinamida (28). Los anticuerpos se conjugaron individualmente, siguiendo el mismo procedimiento.

La reacción de biotilación de los anticuerpos se realizó en un frasco ámbar entre 20-25 °C. A 0,4 mL de una disolución de anticuerpos a 2,5 mg/mL, se le adicionaron gota a gota bajo agitación 120 µL de una disolución del ester N-hidroxisuccinimida del ácido biotinaminohexanoico a 1 mg/mL en dimetilsulfóxido y se dejó en agitación durante 4 h a la misma temperatura. El conjugado obtenido se dializó con PBS en una columna PD-10, se le añadió BSA hasta una concentración final de 1% (p/v) y se almacenó a 2-8 °C (28).

#### 2.2.1.9. Preparación del conjugado estreptavidina/fosfatasa alcalina

La estreptavidina se conjugó a la fosfatasa alcalina por el método del glutaraldehído en un sólo paso descrito por Avramea en 1969 (219).

En un frasco ámbar de 25 mL se mezcló, mediante un agitador magnético, 2,5 mg estreptavidina con 7,5 mg de fosfatasa alcalina. A esta mezcla se le adicionó gota a gota bajo agitación 62 µL de glutaraldehído Grado I a 2,5% (v/v) y se dejó en agitación durante 2 h entre 20-25 °C. Posteriormente, el conjugado se dializó en una columna PD-10 previamente equilibrada con PBS. Al conjugado dializado se le adicionó BSA hasta una concentración final de 1% (p/v) y se almacenó a 2-8 °C en un frasco ámbar hasta su uso.

#### 2.2.1.10. Selección de las condiciones de inmunorreacción del ensayo

##### 2.2.1.10.1. Selección de las condiciones de recubrimiento de la fase sólida

Para evaluar en el nuevo ensayo las condiciones de recubrimiento de la fase sólida se titularon los AcM HEP-1 y 8H11, probando diferentes concentraciones de los mismos en el rango de 2 a 10 µg/mL con tres disoluciones reguladoras de recubrimiento:

- Disolución reguladora carbonato-bicarbonato de sodio 0,5 mol/L pH 9,6 (CB).

- TRIS.
- PBS.

Además, se ensayaron diferentes condiciones de temperaturas y tiempos de incubación de las placas: 4 h a 37 °C y 16-24 h a temperatura entre 20 y 25 °C. En todos los casos las placas se recubrieron con la Multipipeta Erizo 201 (CIE, Cuba) y después de incubadas con la disolución de recubrimiento, se procedió al lavado con Tween 20 al 0,05% (v/v) en PBS. Para la estabilización y bloqueo de los sitios libres del recubrimiento se adicionaron 19 µL/pocillo de esta disolución de lavado con BSA a 1 mg/mL (disolución de preservio) y se incubó 1 h entre 20-25 °C. Posteriormente, se aspiró la disolución de preservio, las placas se secaron 2 h a 37 °C y se sellaron en condiciones controladas de humedad ( $\leq 50\%$ ) y temperatura (18-20 °C). Para la realización de la prueba se empleó una muestra de suero positiva (3 ng/mL de HBsAg), preparada a partir del EPEI-ad y el CN del UMELISA HBsAg. Se seleccionó como concentración óptima de recubrimiento aquella donde la muestra positiva alcanzó la meseta de su señal de fluorescencia y como mejor condición de recubrimiento la que propició una mayor señal fluorescente para esta muestra, junto a los más bajos valores para el CN empleado.

Se usó la prueba de análisis de varianza y la de rangos múltiples ( $p < 0,05$ ), para determinar la disolución reguladora y la condición de incubación del recubrimiento más adecuada. Estas pruebas estadísticas se aplicaron también para evaluar la concentración óptima de recubrimiento. Para el procesamiento estadístico se utilizó el programa Statgraphics 5.1.

#### 2.2.1.10.2. Características de las muestras

El ensayo se normalizó para las muestras de suero o plasma y posteriormente se evaluó su aplicación para las muestras de SSPF. En el caso de las primeras se emplearon sin diluir.

#### 2.2.1.10.3. Titulación de los conjugados de anticuerpos-biotina y estreptavidina/fosfatasa alcalina

La dilución adecuada de trabajo de estos reactivos se determinó mediante titulaciones cruzadas de ambos, empleando concentraciones de cada AcM biotinilado entre 0,25 y 0,5 µg/mL y del conjugado estreptavidina/fosfatasa alcalina (Estrep./FA) entre 0,063 y 0,0315 µg/mL, lo cual correspondió a diluciones entre 1:10 000 y 1:20 000 del mismo (0,63 mg/mL) (figura 2.1). Se empleó como diluyente TRIS con BSA (10 mg/mL) para los AcB y BSA a 10 mg/mL, sacarosa 2% (p/v) en PBS, para el conjugado. Para la realización de la prueba se emplearon CP y CN para el HBsAg, así como una curva de diluciones seriadas, preparada a partir del EPEI-ad, que abarcó concentraciones desde 0,0625 hasta 2 ng/mL. Se seleccionó como combinación de trabajo óptima la

dilución máxima de cada reactivo en la que se obtuviera una mejor separación entre las unidades de fluorescencia (UF) de los CP y CN y mantuviera el comportamiento lineal de la curva estándar.

**AcM Biotinilados**  
**2F12H9 + 2C4A2 (µg/mL)**

		0,25 + 0,25				0,5 + 0,25				0,25 + 0,5					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
A	P	C1	C3	C5	P	C1	C3	C5	P	C1	C3	C5	1:10 000	Conjugado Estrep./FA	
B	P	C1	C3	C5	P	C1	C3	C5	P	C1	C3	C5			
C	N	C2	C4	C6	N	C2	C4	C6	N	C2	C4	C6			
D	N	C2	C4	C6	N	C2	C4	C6	N	C2	C4	C6			
E	P	C1	C3	C5	P	C1	C3	C5	P	C1	C3	C5	1:20 000		
F	P	C1	C3	C5	P	C1	C3	C5	P	C1	C3	C5			
G	N	C2	C4	C6	N	C2	C4	C6	N	C2	C4	C6			
H	N	C2	C4	C6	N	C2	C4	C6	N	C2	C4	C6			

P: Control positivo    N: Control negativo  
C: Curva estándar (1: 0,0625 ng/mL; 2: 0,125 ng/mL; 3: 0,25 ng/mL;  
4: 0,5 ng/mL; 5: 1,0 ng/mL; 6: 2,0 ng/mL)

Figura 2.1 Esquema para la titulación cruzada de los anticuerpos biotinilados y el conjugado Estrep./FA

#### 2.2.1.10.4. Determinación del tiempo de incubación de los diferentes pasos del ensayo

Las variantes de ensayo evaluadas para determinar el tiempo de incubación de los diferentes pasos de la prueba se resumen en la tabla 2.2 (anexo 5). Se emplearon muestras de concentraciones conocidas, preparadas por diluciones seriadas a partir del EPEI-ad, que abarcaron un rango entre 0,05 y 3,2 ng/mL de HBsAg. Se escogió como óptima aquella variante del ensayo que, sin ser excesivamente larga, tuviera la mayor pendiente de la curva estándar y presentara valores del CP entre 100-150 UF y menores de 5 UF para el CN.

#### 2.2.1.11. Evaluación de las condiciones del ensayo

Para evaluar las condiciones de inmunorreacción establecidas se realizó un estudio con 1 997 muestras de suero procedentes de individuos supuestamente sanos, 677 correspondieron a trabajadores del Hospital Militar "Dr. Luis Díaz Soto" y 1 320 a donantes de sangre, procedentes del Banco de Sangre Docente de Marianao. Previo a su evaluación en el ensayo normalizado, se clasificaron mediante el Heparostika HBsAg, de Organon Teknika. Se

consideró como nivel de corte (NC) del ensayo desarrollado 2,5 veces las UF de la mediana de los CN en cada prueba.

Se analizó la posible existencia de resultados falsos positivos (FP) y falsos negativos (FN), así como la necesidad de incluir en el ensayo AcP anti-HBsAg y agentes bloqueadores de las inespecificidades.

#### 2.2.1.12. Determinación del nivel de corte

Con las condiciones de ensayo establecidas, se determinó su NC, para lo cual se emplearon 1 090 muestras de suero procedentes de donantes de sangre, previamente clasificadas por el ensayo de referencia Hepanostika HBsAg y su prueba confirmatoria Hepanostika HBsAg Uni-Form II Confirmatory (Hepanostika Confirmatory).

El NC se determinó normalizando la fluorescencia de las muestras (M) con respecto al CP del ensayo, sustrayendo en cada caso el valor del CN  $(M-CN)/(CP-CN)$ . Con el cociente de esta relación se realizó una distribución de frecuencias y se seleccionó como NC el valor para el cual hubo una adecuada discriminación entre las poblaciones de muestras positivas y negativas.

#### 2.2.1.13. Determinación de la detectabilidad o sensibilidad analítica del ensayo

La sensibilidad analítica del ensayo se determinó como la menor concentración de HBsAg detectada, utilizando curvas elaboradas a partir de los EPEI-ad y ay y del 1<sup>er</sup> EI-OMS, que abarcaron concentraciones de 0,05-3,2 ng/mL y 0,15-4,8 UI/mL, respectivamente. Este parámetro se corroboró con los paneles de bajo título (PHA 105), de título mezclado (PHA 204) y de seroconversión (PHM 921), de BBI (acápites 2.1.1.4).

#### 2.2.1.14. Evaluación de las características funcionales del ensayo

Se empleó un panel 1 343 muestras compuesto por 1 121 muestras pareadas de suero y plasma procedentes de donantes de sangre del Banco de Sangre Docente de Marianao y 222 muestras de suero pertenecientes a población de riesgo, colectadas en diversos Centros Municipales de Higiene y Epidemiología (CMHE) de la provincia de La Habana. Como estuche de referencia se utilizó el Hepanostika HBsAg, de Organon Teknika.

Mediante el empleo de tablas de contingencia, se evaluaron la sensibilidad (S) y especificidad (E) clínicas, los valores predictivos positivo (VPP) y negativo (VPN) del ensayo normalizado, así como su eficacia o coincidencia y el índice de concordancia (índice kappa) (K), con respecto a la prueba de referencia. Se analizaron paralelamente los resultados con la anterior generación de ultramicroensayo HBsAg, aplicada a la Red Nacional de Laboratorios SUMA. Para la evaluación de las características funcionales se emplearon las expresiones que aparecen en el anexo 3 (fórmulas 2).

Con el objetivo de observar el comportamiento de las poblaciones de positivos y negativos involucradas en el estudio, se realizaron las distribuciones de frecuencias de las muestras de suero, normalizando su fluorescencia con respecto a los controles del ensayo (M-CN)/(CP-CN). En el caso de la población de negativos, se compararon sus UF con la anterior generación de UMELISA, para determinar el comportamiento de esta población en ambas pruebas.

#### 2.2.1.15. Estudio de especificidad analítica

Se analizaron un total de 325 muestras con determinadas características que pudieran interferir en los resultados de las pruebas de inmunoensayo, siendo fuente potencial de resultados falsos positivos en las mismas. El objetivo fue determinar la influencia de estas muestras en la especificidad del ensayo desarrollado y paralelamente, en la anterior generación de UMELISA. Se evaluaron 68 muestras hemolíticas, 17 lipémicas, 19 con íctero, 23 procedentes de mujeres multíparas, 10 muestras con factor reumatoideo, 56 contaminadas por microorganismos y 132 muestras con altas concentraciones de inmunoglobulinas.

Las muestras reactivas se sometieron al Hepanostika HBsAg y su prueba confirmatoria para establecer un resultado definitivo y llegar a conclusiones acerca de su influencia, o no, en la especificidad del ensayo desarrollado.

#### 2.2.1.16. Establecimiento de la zona gris

Se determinó la zona gris del ensayo, tanto en ng/mL como en UI/mL, utilizando muestras con concentraciones de HBsAg en el entorno del nivel de detectabilidad de la prueba, preparadas a partir del EPEI-ad (0,025-0,25 ng/mL) y del 1<sup>er</sup> EI de la OMS (0,16-0,4 UI/mL). Se analizaron durante cinco días, a razón de dos placas diarias y ocho replicados por ensayo. Se calculó el porcentaje de positividad de cada una de las muestras en estudio y se graficó este parámetro frente a cada concentración de HBsAg evaluada, para determinar el ancho de la zona gris del ensayo (entre 5 y 95% de positividad), así como su límite de discriminación, correspondiente a la concentración de HBsAg a la cual se obtuvo 50% de resultados positivos (220). Se comprobó la correspondencia entre ambas preparaciones de referencia, de acuerdo a la equivalencia informada en los acápites 2.1.1.1 y 2.1.1.2.

#### 2.2.1.17. Estudio de la reproducibilidad

Para determinar la reproducibilidad del ensayo se halló el grado de concordancia entre los resultados de una serie de ensayos (al menos 20) (220) para las muestras del panel del control externo de la calidad de la Red Nacional de Laboratorios SUMA, compuesto por una muestra negativa y tres muestras con valores de concentración de 0,1; 0,4

y 0,8 ng/mL de HBsAg. La prueba se realizó con dos lotes diferentes de reactivos durante cinco días (cuatro ensayos por día).

A cada muestra se le determinó la relación entre el número de veces que resultó positiva o negativa y el total de veces que fue evaluada durante los cinco días de duración de la prueba. Para el cálculo del porcentaje de reproducibilidad se empleó la fórmula 3 del anexo 3.

Se considera 100% como el valor ideal y depende del ancho de la zona gris del ensayo.

#### 2.2.1.18. Estudios de estabilidad

Se realizaron las pruebas de estabilidad en las condiciones reales de almacenamiento (2–8 °C) (estabilidad de anaquel) para el estuche y sus componentes (CP, CN, AcB, conjugado Estrep./FA y placas recubiertas). En todos los casos se analizaron dos lotes de reactivo de cada componente y tres lotes de estuche. Las pruebas se realizaron de acuerdo a un cronograma establecido en el protocolo confeccionado previo al estudio y aprobado por el Departamento de Aseguramiento y Control de la Calidad (DACC) del CIE, en concordancia con los requisitos establecidos por el Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CECMED) (221, 222). La estabilidad de anaquel del diagnosticador se evaluó durante 18 meses y la de los componentes abarcó 24 meses de estudio.

Para el estuche se realizaron, además, pruebas de estabilidad en condiciones anormales de conservación, almacenándolos durante cuatro semanas entre 20-25 °C y 30-35 °C. La evaluación se realizó cada semana.

Debido a que todos los componentes estudiados se presentan listos para el uso, se sometieron a las pruebas de estabilidad de reutilización, con el objetivo de evaluar la factibilidad de utilizarlos reiteradamente durante un determinado período de tiempo. Esta prueba abarcó ocho semanas, realizando en cada una de ellas la evaluación de los parámetros establecidos.

Para la realización de estas pruebas se tuvieron en cuenta, tanto las señales de fluorescencia de los CP y CN del ensayo, como una curva de HBsAg (0,0625-2 ng/mL), elaborada a partir del ES-ad, del CIE. En el caso de los componentes, se analizó en cada tiempo de estudio el comportamiento de estos parámetros al ser evaluados con el componente objeto de análisis, usando lotes recientes de los restantes reactivos involucrados en la prueba.

Los lotes de componentes y de estuches se consideraron estables siempre que los porcentajes de recuperación de la fluorescencia del CP del ensayo, para cada tiempo de estudio, fueron superiores a 80, respecto al tiempo inicial o

tiempo cero (fórmula 4, anexo 4). Asimismo, se debía mantener la señal óptima del CN (1- 5 UF) y el nivel de detectabilidad del ensayo durante todo el tiempo de evaluación.

#### 2.2.1.19. Evaluación externa del ensayo normalizado

La evaluación externa del ensayo desarrollado se realizó en el laboratorio SUMA del Banco de Sangre Docente de Marianao, con tres lotes de estuches certificados por el DACC del CIE. El análisis y procesamiento de los resultados se realizó según el programa de cálculo elaborado para tales fines.

Se evaluaron 1 278 muestras de suero procedentes de donantes de sangre simultáneamente con la anterior generación de UMELISA, que constituía la prueba empleada hasta ese momento para la certificación de sangre. Las muestras de suero se ensayaron frescas, sin sufrir congelaciones previas y el estudio se llevó a cabo por el personal del laboratorio SUMA, de acuerdo con la dinámica de sus tareas y organización de trabajo. Como ensayo de referencia se empleó el Hepanostika HBsAg, de Organon Teknika.

Se determinó la S y E del nuevo ensayo, así como su VPP y VPN, la eficacia del método y K con respecto a la prueba de referencia. Algunas de estas características funcionales, así como el comportamiento de la reactividad en donantes de sangre, se analizaron también para el UMELISA HBsAg, en uso hasta ese momento.

La reproducibilidad de los resultados se evaluó mediante el ensayo reiterado de tres muestras negativas y tres positivas (25 réplicas de cada una). Las tres muestras negativas se seleccionaron entre las 1 278 muestras que formaron parte de este estudio, mientras que las positivas (0,125; 0,16 y 0,2 ng/mL) se suministraron por el CIE, elaboradas a partir del ES-ad.

#### 2.2.2. Registro sanitario del estuche de reactivos

El estuche de reactivos se registró en Cuba con el nombre UMELISA HBsAg PLUS, códigos UM 2031 y UM 2131 para 288 y 480 determinaciones, respectivamente; con el número de registro sanitario D0007-10, cuyo certificado se muestra en el anexo 6. Se registró también en México, Perú, Brasil, Colombia y Venezuela (anexo 6).

#### 2.2.3. Estudio piloto con el UMELISA HBsAg PLUS

El estudio piloto con el UMELISA HBsAg PLUS se realizó en cuatro bancos de sangre de La Habana (Guanabacoa, Diez de Octubre, Marianao y Banco de Sangre Provincial) previo a su introducción en la Red Nacional de Laboratorios SUMA para la certificación de sangre y vigilancia epidemiológica de la hepatitis B. Este estudio persiguió el objetivo de evaluar el desempeño de la prueba y la reactividad del HBsAg en los donantes de sangre, teniendo en cuenta que el ensayo mostró un mayor nivel de detectabilidad con respecto al que se utilizaba con anterioridad (UMELISA HBsAg). Era preciso conocer, además, la valoración del personal encargado de su

ejecución, tomando en consideración que este ensayo a pesar de tener el mismo tiempo de duración que el precedente, añadía un paso en su procedimiento técnico. Las muestras con resultado reactivo en los laboratorios de los bancos de sangre se colectaron y reevaluaron en el Laboratorio de Hepatitis Virales del CIE por ambos ensayos (el UMELISA precedente y el nuevo ensayo desarrollado). Las que resultaron repetidamente reactivas se sometieron a una clasificación final con la prueba comercial de referencia Heparostika HBsAg, de Organon Teknika y aquellas muestras que también fueron reactivas en este ensayo, se sometieron a su prueba confirmatoria (Heparostika Confirmatory). Durante cuatro semanas de trabajo se evaluaron en los bancos de sangre 30 727 muestras de suero.

#### 2.2.4. Metodología para la normalización de una prueba confirmatoria para el HBsAg en muestras de suero o plasma

##### 2.2.4.1. Selección del principio de la prueba confirmatoria

El ensayo se basó en el principio de neutralización (figura 2.2, anexo 7), mediante el cual una muestra repetidamente reactiva al HBsAg en la prueba de pesquisaje se pone a reaccionar con un suero que contiene anticuerpos neutralizantes (anti-HBsAg), llamado reactivo neutralizante (Rn) y, paralelamente, con un suero libre de anti-HBsAg (suero normal) que se emplea como control y fue identificado como reactivo control (Rc). Los anticuerpos en exceso, presentes en el Rn, ocupan los determinantes antigénicos del HBsAg de la muestra, neutralizándolos; lo cual ocurre durante un paso de incubación previo. Las muestras, así tratadas, son evaluadas en el UMELISA HBsAg PLUS, donde la presencia del HBsAg se confirma mediante la reducción de la señal fluorescente de la muestra tratada con el Rn con respecto a la procesada con el Rc.

Las muestras se analizaron sin diluir y diluidas 1:100 con una disolución de NaCl 0,85% (p/v).

##### 2.2.4.2. Preparación del reactivo control

Se preparó a partir de SNCo, procedente de animales no sometidos a procedimientos de inmunización, excepto los derivados de la prevención de enfermedades propia de la especie y que no reaccionaran con ningunos de los elementos del inmunoensayo o componentes de la muestra a confirmar, para lo cual se les determinó la presencia de HBsAg o anti-HBsAg, mediante los UMELISAs correspondientes, así como la verificación de actividad contra suero normal humano (SNH) y SNR, determinada por inmunoelectroforesis (146, 223).

Los SNCo seleccionados se mezclaron y sometieron a tres procesos de congelación-descongelación para eliminar los lípidos y las lipoproteínas. Posteriormente, esta mezcla se clarificó por centrifugación a  $15\ 430 \times g$ , a  $4\ ^\circ\text{C}$

durante 30 min y se filtró el sobrenadante sobre papel de filtración rápida. La inactivación de las proteínas termolábiles del sistema de complemento se llevó a cabo a 56 °C durante 1 h en un baño termostático. Al suero resultante se le añadió NaN<sub>3</sub> al 0,02% (p/v) como preservante, se filtró por una membrana Minisart de acetato de celulosa (Sartorius, Alemania) de 0,2 µm y se almacenó entre 2 y 8 °C hasta su utilización.

#### 2.2.4.3. Preparación del reactivo neutralizante

El Rn se obtuvo inmunizando conejos machos de la raza Chinchilla con 50 µg/mL de HBsAg recombinante producido en el CIGB. El esquema de inmunización consistió en cuatro inmunizaciones quincenales y posteriormente una mensual por vía subcutánea, empleando adyuvante completo de Freund en la primera dosis y adyuvante incompleto en las restantes.

La selección de los sueros de conejo hiperinmunes más adecuados para preparar el Rn se realizó teniendo en cuenta que estos no estuviera hemolíticos, turbios, ni contuvieran agregados. Se les determinó el título de anti-HBsAg a través de la técnica de CIEF (146) y paralelamente, con el juego de reactivos UMELISA anti-HBsAg, producido en el CIE (223). Estos sueros no debían presentar actividad frente a suero humano, ni suero de ratón, determinada por inmunoelectroforesis (146) y debían tener la capacidad de inhibir, al menos al 50%, la fluorescencia de una muestra, sin diluir, con 500 ng/mL de HBsAg, elaborada a partir de un suero humano de alto título (45,76 µg/mL). Para el cálculo del porcentaje de inhibición se aplicó la fórmula 5 (anexo 4).

A los sueros seleccionados se les aplicaron procedimientos para la eliminación de los lípidos y las lipoproteínas, clarificación, inactivación, preservación y almacenamiento similares a los descritos en el acápite anterior para el Rc y se evaluaron para determinar la presencia de HBsAg, mediante el UMELISA HBsAg PLUS.

##### 2.2.4.3.1. Selección de la concentración de trabajo del reactivo neutralizante

La concentración de trabajo seleccionada del Rn fue el menor título de este capaz de inhibir, al menos al 50%, la fluorescencia de la muestra, sin diluir, de 500 ng/mL de HBsAg. Para realizar la titulación, se llevó a cabo la dilución del Rn con SNCo. Para el cálculo del porcentaje de inhibición se aplicó la fórmula 5 (anexo 4).

#### 2.2.4.4. Preparación del control positivo

El CP se preparó de manera similar a la descrita en el acápite 2.2.1.7, pero en este caso se elaboró a una concentración final de  $5 \pm 1$  ng/mL de HBsAg y no se utilizó colorante en su preparación.

#### 2.2.4.5. Selección de las condiciones de ensayo

##### 2.2.4.5.1. Selección de la proporción de mezcla óptima de la muestra con los reactivos control y neutralizante

Se determinó estableciendo la menor proporción de una muestra con 500 ng/mL de HBsAg, que al ser mezclada con 10 µL de los Rc y Rn, fuera capaz de inhibir su señal de fluorescencia, como mínimo a 50%. Las proporciones de mezcla ensayadas fueron 4, 5 y 6 partes de muestra por una parte de Rc y Rn. Para seleccionar la proporción óptima se tuvo en cuenta también que el volumen de la mezcla fuera suficiente para ejecutar el procedimiento de ensayo.

##### 2.2.4.5.2. Tiempo y temperatura de reacción de la muestra con los reactivos control y neutralizante

La mezcla de reacción se incubó de 16 a 24 h a una temperatura entre 20 y 25 °C.

##### 2.2.4.6. Determinación del nivel de corte de la prueba confirmatoria

Se determinó, evaluando en el ensayo confirmatorio una muestra de 0,125 ng/mL de HBsAg, que constituye el nivel de detección de la prueba de pesquisaje, elaborada a partir del EPEI-ad. La evaluación se realizó con tres lotes de Rc y Rn, a razón de cinco placas por lote y seis replicados de la muestra en cada placa. Se calcularon los cocientes resultantes de las UF de la muestra tratada con el Rn (Mn) con respecto a la tratada con el Reactivo Control (Mc) (Mn/Mc). Se determinó como valor de corte aquel cociente que garantizara la confirmación de la muestra el 100% de las veces evaluada.

##### 2.2.4.7. Evaluación de la detectabilidad del ensayo confirmatorio

Se analizaron en la prueba confirmatoria muestras de concentración conocida de HBsAg (0,0625-1 ng/mL), elaboradas por diluciones seriadas a partir del EPEI-ad. La evaluación se realizó utilizando tres lotes diferentes de Rc y Rn. Se ensayaron 10 placas por lote y las muestras se evaluaron como mínimo tres veces en cada placa. Se sometieron también a la prueba confirmatoria las muestras de los paneles de BBI, empleados en la determinación de la detectabilidad de la prueba de pesquisaje desarrollada (acápite 2.2.1.13), que habían resultado reactivas en la misma.

##### 2.2.4.8. Coincidencia de los resultados con la prueba de referencia

La coincidencia de los resultados con el Hepanostika Confirmatory, de Organon Teknika, empleado como prueba de referencia, se realizó mediante la evaluación de 273 muestras reactivas en el UMELISA HBsAg PLUS, 123 sueros correspondieron a donantes de sangre y 150 a individuos de grupos de riesgo estudiados en el CMHE de Guanabacoa. El porcentaje de coincidencia entre los resultados de ambos métodos se determinó estableciendo la

relación entre el número de muestras confirmadas en la prueba objeto de estudio respecto a las confirmadas por el ensayo de referencia.

Adicionalmente, se evaluaron en la prueba confirmatoria desarrollada las 261 muestras de donantes de sangre que fueron reactivas en el UMELISA HBsAg PLUS durante el estudio piloto realizado, previo a la introducción de este ensayo en la Red Nacional de Laboratorios SUMA y que ya habían sido clasificadas en el confirmatorio de referencia.

#### 2.2.4.9. Estudios de estabilidad

Se realizaron las pruebas de estabilidad en condiciones reales de almacenamiento (2–8 °C) (estabilidad de anaquel) durante 30 meses a tres lotes de estuche de la prueba confirmatoria, compuestos por el Rc, el Rn y el CP. Las pruebas se realizaron de acuerdo a un cronograma establecido en el protocolo confeccionado previo al estudio y aprobado por el DACC del CIE, en concordancia con los requisitos establecidos por el CECMED (221, 222).

Los tres componentes que conforman el estuche confirmatorio se presentan en forma líquida, listos para el uso, por lo que se sometieron a pruebas de estabilidad de reutilización durante ocho semanas, para evaluar la factibilidad de utilizarlos reiteradamente durante este período de tiempo. Esta evaluación se realizó semanalmente.

Para determinar la estabilidad, se analizó el comportamiento de la señal fluorescente del CP de la prueba tratado con el Rc, en cada uno de los tiempos de estudio, referenciándolo frente a su valor en el tiempo inicial o tiempo cero. Se evaluó además, la mantención de la capacidad inhibitoria del Rn durante todo el tiempo de estudio, frente a la muestra de 500 ng/mL de HBsAg preparada a partir del suero humano de alto título.

Los lotes de componentes y de estuches se consideraron estables siempre que los porcentajes de recuperación de la fluorescencia del CP tratado con el Rc, en cada tiempo de estudio, fueron superiores a 80, respecto al tiempo inicial (fórmula 4, anexo 4). Se consideró también que el Rn fuera capaz de inhibir, al menos al 50%, la señal fluorescente de la muestra de 500 ng/mL de HBsAg, sin diluir.

#### 2.2.4.10. Evaluación externa

Se realizó a través de una validación llevada a cabo en el laboratorio SUMA del CMHE de Guanabacoa, empleando tres lotes de estuches de la prueba confirmatoria, certificados por el DACC del CIE. Se evaluaron 400 muestras de suero repetidamente reactivas en el UMELISA HBsAg PLUS. Como ensayo de referencia se empleó el Heparostika Confirmatory, de Organon Teknika. La coincidencia entre los resultados de ambas pruebas se determinó tal y como se describió en el acápite 2.2.4.8.

### 2.2.5. Registro sanitario de la prueba confirmatoria

El estuche de reactivo se registró en Cuba con el nombre HBsAg CONFIRMATORY TEST, para 20 determinaciones, con el número de registro sanitario D960621, cuyo certificado se muestra en el anexo 8. La prueba se registró también en Colombia, Ecuador y Perú (anexo 8).

### 2.2.6. Evaluación del UMELISA HBsAg PLUS para su aplicación a la detección del HBsAg en muestras de sangre seca sobre papel filtro

#### 2.2.6.1. Obtención de las muestras de sangre seca sobre papel de filtro, necesarias para evaluar la aplicación del UMELISA HBsAg PLUS en este tipo de muestra

Para evaluar los diferentes parámetros del UMELISA HBsAg PLUS en las muestras de SSPF, se emplearon, tanto muestras pareadas de suero y de SSPF, colectadas de donantes de sangre (utilizadas en la determinación del NC y de las características funcionales de la prueba); como muestras de SSPF con concentraciones conocidas de HBsAg, que se prepararon en el laboratorio a partir de sangre previamente procesada y de los estándares del PEI, de la OMS y del CIE (utilizadas para la evaluación de la detectabilidad del ensayo y las pruebas de estabilidad, entre otros aspectos).

##### 2.2.6.1.1 Obtención de las muestras pareadas de suero y de sangre seca sobre papel de filtro

A partir de 1 053 donantes de sangre, que concurrieron al Banco de Sangre Provincial de La Habana en un período de 30 días, se colectaron muestras pareadas de suero y de SSPF. Estas últimas se obtuvieron por punción digital con una lanceta y se colectaron en papel de filtro Schleicher and Schuell 903, Alemania (S&S 903), como manchas circulares de aproximadamente 1 cm de diámetro, extendidas uniformemente por ambas caras del papel, en número de dos por cada individuo; se dejaron secar a la temperatura ambiente (20-25 °C) por espacio de 2 h. Se conservaron e identificaron por separado, en sobres de papel a -20 °C hasta la realización de la prueba. Paralelamente se tomó una alícuota de la muestra de suero extraída a cada donante para los estudios de rutina de la sangre, se identificó y conservó a -20 °C hasta su utilización.

##### 2.2.6.1.2 Preparación de las muestras de sangre seca sobre papel de filtro con concentraciones conocidas de HBsAg

Se elaboraron muestras de SSPF con diferentes concentraciones de HBsAg, realizando diluciones doble seriadas a partir de los EPEI-ad y ay (0,5-4 ng/mL) y del 1<sup>er</sup> EI-OMS (0,5-4 UI/mL) en sangre previamente procesada. Se dispensaron 100 µL de cada muestra en tarjetas de papel de filtro S&S 903, así como de sangre procesada, libre

de HBsAg, que constituyó la muestra negativa. Las tarjetas se dejaron secar 2 h a 18-20 °C y se almacenaron de forma independiente en sobres de papel, a -20 °C hasta su utilización.

La sangre se procesó a partir de una bolsa de eritrocitos (grupo/factor O<sup>+</sup>) procedente de un donante de sangre. El lavado de los eritrocitos se realizó con NaCl 0,85% (p/v) (por cada volumen de eritrocitos se añadieron dos de disolución salina), se centrifugaron a 960 *x g*, a 4 °C durante 10 minutos. La disolución de NaCl 0,85% se extrajo mediante una bomba de vacío, este paso se repitió tres veces. Se midió el volumen de eritrocitos y se añadió NaN<sub>3</sub> 0,2% (p/v). Se filtró por gasa y se determinó su volumen final. Por último, para provocar hemólisis, se congelaron y descongelaron a -20 °C dos veces y se almacenaron a esa temperatura en caso que no fueran a ser utilizados inmediatamente.

Antes de utilizar los eritrocitos lavados, fue necesario ajustar su porcentaje de hematocrito a 40%, que representa un valor intermedio entre 42% en los varones y 37% en las mujeres (valores normales) (224). Se empleó como diluyente SNH anti-HBsAg negativo y se calculó el volumen de material biológico deseado según la fórmula 6 (anexo 4).

La preparación final de eritrocitos se agitó suavemente mediante un agitador magnético durante 30 min a la temperatura ambiente (20-25 °C), evitando la formación de espuma, hasta que se logró su completa homogeneización.

#### 2.2.6.2. Selección de las condiciones de elución de las muestras de sangre seca

Para establecer las condiciones óptimas de elución del analito de interés se utilizaron las muestras de concentración conocida de HBsAg elaboradas a partir EPEI-ad, según lo descrito en el acápite anterior, así como la muestra negativa. Se empleó un disco de 5 mm de diámetro perforado de la zona central de la mancha de sangre seca (Ponchador P-51, CIE, Cuba).

Como disoluciones eluentes se evaluaron la disolución reguladora de lavado (acápites 2.1.3) del UMELISA HBsAg PLUS (R1) y NaCl 0,85% (p/v) (R2). Los tiempos de elución ensayados fueron 1 y 2 h y las temperaturas evaluadas fueron de 20-25 °C y 37 °C. Como volumen de elución se empleó 40 µL. Se seleccionaron las condiciones de elución en las que se obtuvo una mayor pendiente de la curva estándar.

#### 2.2.6.3. Evaluación del nivel de corte del ensayo para las muestras de sangre seca

La evaluación de este parámetro se realizó normalizando la fluorescencia de las 1 053 muestras de suero y sangre seca, colectadas a partir de donantes de sangre (acápites 2.2.6.1.1), con respecto al CP del ensayo, similar a lo descrito en el acápite 2.2.1.12. Con los valores obtenidos se realizaron distribuciones de frecuencias. Por no

disponer de una prueba de referencia para las muestras en papel de filtro, los resultados para las muestras de suero constituyeron la referencia en este estudio, las cuales se clasificaron mediante el Heparostika HBsAg, de Organon Teknika. Se determinó como NC el valor de relación para el que se obtuvo una adecuada discriminación entre las muestras positivas y negativas y que, además, permitió la mayor concordancia con respecto a los resultados de las muestras homólogas en suero. Para realizar la distribución de frecuencias se calcularon las frecuencias absoluta, absoluta acumulada y relativa acumulada utilizando el programa Microsoft Excel 2000.

#### **2.2.6.4. Determinación de la detectabilidad del ensayo para muestras de sangre seca sobre papel de filtro**

La detectabilidad del UMELISA HBsAg PLUS para las muestras de sangre seca, se determinó mediante la evaluación en el mismo de las muestras de SSPF con diferentes concentraciones de HBsAg, preparadas a partir de los EPEI-ad y ay, así como del 1<sup>er</sup> EI-OMS, tal y como se refirió en el acápite 2.2.6.1.2. El nivel de detectabilidad establecido fue la menor concentración de estas muestras detectada en el ensayo y se comprobó la correspondencia entre las UI detectadas y las UPEI, atendiendo a la equivalencia informada en los acápites 2.1.1.1 y 2.1.1.2.

#### **2.2.6.5. Evaluación de las características funcionales del UMELISA HBsAg PLUS para muestras de sangre seca sobre papel de filtro**

La S, E, VPP, VPN y K se evaluaron con el panel de 1 053 muestras pareadas de suero y sangre seca procedentes de donantes de sangre, colectadas según se describió en el acápite 2.2.6.1.1. Estos parámetros funcionales del ensayo para las muestras de SSPF, se determinaron de manera indirecta, tomando como referencia el resultado de las muestras homólogas en suero, clasificadas en el UMELISA HBsAg PLUS frente a la prueba de referencia empleada (Heparostika HBsAg, de Organon Teknika).

El cálculo de las características funcionales del ensayo se realizó según las fórmulas correspondientes (fórmulas 2, anexo 3).

#### **2.2.6.6. Evaluación de la estabilidad del HBsAg en sangre seca sobre papel de filtro**

##### **2.2.6.6.1. Preparación de las muestras de sangre en papel de filtro**

Para evaluar la estabilidad del HBsAg, se prepararon muestras de SSPF con concentraciones de HBsAg de 1, 2 y 4 ng/mL a partir del ES-ad, del CIE. Estas muestras se elaboraron utilizando la sangre previamente procesada, según lo descrito en el acápite 2.2.6.1.2. Se dispensaron 100 µL de cada muestra en tarjetas de papel de filtro S&S 903.

#### 2.2.6.6.2. Secado y almacenamiento de las muestras

Las muestras, una vez dispensadas en papel de filtro, se dejaron secar durante 2 h en dos condiciones diferentes de temperatura (T) y humedad relativa (HR):

Variante 1 (V1): T = 15 °C y HR 55%

Variante 2 (V2): T = 30 °C y HR 89%

Posteriormente se conservaron durante seis meses, debidamente identificadas, en sobres de papel bajo cuatro ambientes diferentes de temperatura: -20 °C; 2-8 °C; 20-25 °C y 30-34 °C.

#### 2.2.6.6.3. Evaluación de la estabilidad del HBsAg en las muestras de sangre seca sobre papel de filtro

Se evaluaron las muestras de SSPF en el UMELISA HBsAg PLUS al tiempo cero o inicial (inmediatamente después del proceso de secado), cada dos días durante la primera semana, al cumplirse 15 y 30 días del primer mes y posteriormente, una vez al mes hasta completar los seis meses que duró el estudio. Las muestras se consideraron estables cuando el porcentaje de recuperación de su fluorescencia con respecto al tiempo inicial fue superior a 80. Para el cálculo de este parámetro se aplicó la fórmula 7 (anexo 4).

Para determinar si existían diferencias significativas entre las diferentes condiciones de almacenamiento de las muestras, de acuerdo a la variante de secado empleada, se realizó un análisis estadístico con ayuda del programa Microsoft Excel 2000 y se utilizó la prueba F de Fisher con un nivel de significación de 0,05.

#### 2.2.7. Evaluaciones realizadas a las pruebas desarrolladas. Sus aplicaciones

El UMELISA HBsAg PLUS fue objeto de diversas evaluaciones, en su mayoría, en los países donde se comercializa, como parte del control de calidad que las entidades regulatorias de los mismos, realizan a los productos biológicos adquiridos. En tal sentido, el ensayo se evaluó en tres diferentes oportunidades (2001, 2005 y 2011) por el Instituto Nacional de Control de Calidad en Salud (INCQS), de la Fundación Oswaldo Cruz, de Brasil, así como, en el año 2005, por el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE), de México. En estas evaluaciones se analizó la S y E de la prueba frente a paneles de muestras clasificadas pertenecientes a dichos institutos y paneles comerciales.

En 2006 se realizó un estudio dirigido por el Consorcio Internacional para la Seguridad de la Sangre (ICBS, por sus siglas en inglés), que tuvo lugar en el Instituto Paul Ehrlich, de Alemania, donde se evaluaron 70 ensayos comerciales de todo el mundo, incluido el UMELISA HBsAg PLUS, en cuanto a su S y E, detectabilidad, así como la capacidad de reconocer diferentes genotipos y subtipos del VHB. La evaluación se realizó frente a un Panel Maestro del ICBS compuesto por 394 muestras (146 para evaluar los parámetros clínicos, 48 para la detectabilidad

y 200 muestras negativas). Este panel se conformó a partir de 720 unidades de plasma procedentes de diversas áreas geográficas, que fueron caracterizadas por el CDC (Centro para el Control de Enfermedades), de E.U.A. El panel para la determinación de la detectabilidad incluyó muestras de los principales genotipos del VHB, del A al F, así como de los subtipos *adw* 2 y 4, *adr* y *ayw* 1-4 del HBsAg. Se prepararon por diluciones seriadas seis concentraciones de HBsAg de cada muestra, que abarcaron un rango de 0,031 a 4 UI/mL, usando plasma normal humano como diluyente. Estas muestras se cuantificaron en relación al 2<sup>do</sup> Estándar Internacional de la OMS (00/588). Para el análisis de este parámetro se incluyó también el EPEI-ad como una preparación de referencia independiente, a partir del cual se prepararon muestras de concentración conocida en el rango de 0,002 a 1 UPEI/mL. Los 70 ensayos evaluados incluyeron 51 EIE y 19 pruebas rápidas (61).

Por otra parte, el desempeño de la prueba confirmatoria se evaluó en la Red Nacional de Laboratorios, destacándose el Banco de Sangre Provincial y CMHE, de Santiago de Cuba.

Tanto la prueba de pesquisaje, como el ensayo confirmatorio se han aplicado para apoyar diversos estudios de hepatitis B en Cuba y otros países del área.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Normalización de un ensayo para la detección de HBsAg en muestras de suero y plasma

##### 3.1.1. Selección del principio del ensayo

El ensayo sándwich doble anticuerpo es el método clásico para la detección de antígenos y es el principio de de las técnicas empleadas en la mayoría de los ELISAs que detectan el HBsAg (20, 61), el primer anticuerpo captura el antígeno de la muestra, detectado a través del conjugado anticuerpo-enzima o amplificado con un conjugado dirigido contra el segundo anticuerpo (sándwich de doble anticuerpo modificado) (24). Las etapas del mismo se resumen en la figura 3.1 (anexo 9).

La prueba empleó las ventajas del sistema amplificador estreptavidina/biotina, que aumenta la sensibilidad de los inmunoensayos (225, 226), estrechamente relacionada con el incremento de los niveles de detectabilidad para el caso del HBsAg (160). Esto ocurre gracias a que la estreptavidina, que se conjuga fácilmente a las enzimas, puede fijar cuatro moléculas de biotina con una alta afinidad (constante de afinidad ( $K_{af}$ ) =  $10^{15}$  mol<sup>-1</sup>L), actuando como agente amplificador. La biotina, por su parte, puede enlazarse de forma covalente a los anticuerpos sin afectar su sitio de unión al antígeno, todo lo cual amplifica la reacción inmunológica, ya que los anticuerpos biotinilados pueden unir más de una molécula de estreptavidina conjugada. Desde finales del siglo pasado diversos ensayos para la detección de HBsAg emplean este sistema con excelentes resultados para sus parámetros de sensibilidad y detectabilidad (26, 29, 31).

Las características de este sistema mostraron un mejor aprovechamiento para el desarrollo del ensayo al combinarlas con los AcM, debido a la excelente especificidad y alta afinidad de los mismos. Por otra parte, ofrecen también ventajas en el orden productivo, por constituir una fuente escalable y reproducible de productos, con una disponibilidad ilimitada de los mismos, lo cual garantiza mayor estabilidad del proceso de producción de los diagnosticadores que los emplean (21). El uso de este tipo de anticuerpos posibilitó la normalización de ensayos más sensibles y específicos para la detección del HBsAg, siendo incorporados a varias de las más prestigiosas y mundialmente aceptadas pruebas diseñadas para el pesquisaje de la infección por el VHB, como por ejemplo AUSZYME Monoclonal, de Abbott; Genetic Systems HBsAg EIA 3.0, de Bio-Rad; Hepanostika HBsAg, de Biomérieux, Elecsys HBsAg, de Roche, Ortho EIA, de Ortho, entre otras (23, 31, 227-229), algunas los emplean en combinación con AcP y otras consisten en ensayos basados en AcM.

### 3.1.2. Caracterización de los anticuerpos monoclonales

Los AcM HEP-1 y 8H11 se utilizaban en la anterior generación de UMELISA y se caracterizaron en el Laboratorio de Hepatitis del CIE (197). No obstante, debido a la incorporación de dos nuevos AcM al ensayo, se sometieron de nuevo a algunas pruebas, como la del reconocimiento epitópico. El HEP-1 y 8H11 correspondieron a las subclases IgG<sub>2b</sub> e IgG<sub>1</sub> y tuvieron una Kaf de  $4,33 \pm 0,88 \times 10^9 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}$  y  $2,14 \pm 0,47 \times 10^9 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}$ , respectivamente.

En la prueba de determinación de isotipo, el AcM 2F12H9 resultó ser IgG<sub>1</sub> y el 2C4A2 IgG<sub>2b</sub>. Ambos anticuerpos mostraron una alta Kaf, con valores de  $3,54 \pm 1,07 \times 10^9 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}$  para el primero y  $0,85 \pm 0,27 \times 10^9 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}$  para el segundo.

La prueba de especificidad de los AcM 2F12H9 y 2C4A2 mostró que los dos reconocían ambos subtipos del HBsAg. Esta reactividad cruzada de los AcM evaluados pudiera explicarse porque reconocen el determinante *a* del antígeno de superficie. Resultados similares se obtuvieron con anterioridad para los monoclonales HEP-1 y 8H11. El determinante *a* es el más importante del HBsAg, ya que se encuentra presente en los nueve subtipos del VHB (42, 59, 61), por lo que contar con AcM que reconozcan este determinante garantiza la detección de todos los subtipos del virus. Yücell y cols., en el año 2003, emplean también un ensayo indirecto para la caracterización inicial de AcM dirigidos al HBsAg, recubriendo en este caso con 0,1 µg/mL de antígeno y usando el conjugado de anti-IgG de ratón/Peroxidasa a la dilución de 1:1 000 (230).

El ensayo de inhibición diseñado permitió comprobar si los AcM involucrados reconocían el mismo epítipo dentro del determinante *a*, si reconocían epítopos muy cercanos aunque diferentes o, si por el contrario, sus sitios de unión al antígeno se encontraban alejados. Esta prueba fue de importancia esencial, ya que definiría si podrían utilizarse los cuatro AcM en la normalización de la prueba o sería necesario prescindir de alguno de ellos por compartir, con otro, la especificidad hacia la misma región del HBsAg.

Todas las mezclas AcM–HBsAg ensayadas presentaron porcentajes de inhibición de su señal de fluorescencia inferiores al 20%, al evaluarse frente a un AcM diferente como recubrimiento de la fase sólida (tabla 3.1). Esto indicó que la señal positiva del HBsAg que formaba parte de la mezcla no se inhibió, o sea, el antígeno pudo reconocerse por los AcM de la fase sólida y por tanto, ambos AcM (el de la fase sólida y el de la fase líquida) identificaron al HBsAg por epítopos diferentes.

Tabla 3.1 Prueba de reconocimiento epitópico de los anticuerpos monoclonales. Ensayo de inhibición

Mezcla AcM - HBsAg	Anticuerpos en fase sólida (% Inhibición)			
	HEP-1	8H11	2F12H9	2C4A2
HEP1-HBsAg	94,1	13,4	4,6	16,3
8H11-HBsAg	12,9	93,6	17,8	8,4
2F12H9-HBsAg	6,2	15,2	94,7	15,8
2C4A2-HBsAg	16,0	11,2	17,3	93,4

Los resultados demostraron que los AcM evaluados reconocieron diferentes epítomos dentro del determinante al cual estaban dirigidos, en todos los casos el HBsAg que formó parte de las mezclas con AcM, se unió al AcM en la fase sólida, siempre y cuando este era diferente del que formaba parte de la mezcla. Estos resultados sugirieron que los cuatro AcM objeto de estudio podrían utilizarse para la normalización del ensayo, previendo un adecuado reconocimiento del HBsAg por parte de las combinaciones de AcM que se seleccionaran para la fase sólida y líquida.

En un estudio similar realizado en 2005, por Roohi y cols., determinan la localización de epítomos por ensayo de inhibición cruzada a ocho AcM específicos al HBsAg, obtenidos a partir de la inmunización de ratones BALB/c con HBsAg recombinante subtipo adw, encontrando que seis de los ocho AcM reconocían epítomos sobrelapados estrechamente relacionados, en tanto los dos restantes reconocieron epítomos diferentes (216).

### 3.1.3. Selección de los anticuerpos para la fase sólida y para el conjugado con biotina

A pesar de que las curvas estándar de HBsAg obtenidas para cada variante de recubrimiento presentaron una pendiente (m) similar (figura 3.2, anexo 9), se observó, en la evaluación del panel de muestras de donantes de sangre, que en aquellas variantes que incluían los AcM 2F12H9 y 2C4A2, se incrementaba el número de muestras positivas, clasificadas como FP, de acuerdo a sus resultados en la prueba de referencia empleada (figura 3.3). Debido a estos resultados, no se valoró la inclusión de los AcM obtenidos en el CIE para el recubrimiento de la fase sólida en el nuevo ensayo. Ver variantes de recubrimiento evaluadas en tabla 2.1, anexo 5.

Se optó por mantener en la fase sólida a los AcM usados para estos fines en la generación anterior de UMELISA (HEP-1 y 8H11), ya que históricamente el ensayo mostró un buen reconocimiento del HBsAg por este par de anticuerpos. Las muestras que se dejaban de detectar en esta generación de ensayo, identificadas en los paneles

de BBI evaluados en su momento y en las curvas preparadas a partir de los estándares del PEI, se debían a la incapacidad de detección del ensayo, por tratarse de muestras con concentraciones de HBsAg inferiores a 0,5 ng/mL, límite de detección para esta prueba. Los AcM obtenidos en el CIE se seleccionaron para el revelado de la reacción inmunológica, conjugados con biotina. En el caso de los AcP biotinilados, su inclusión o no en la fase líquida del ensayo se determinó una vez que se escogieron las condiciones de inmunorreacción del mismo.

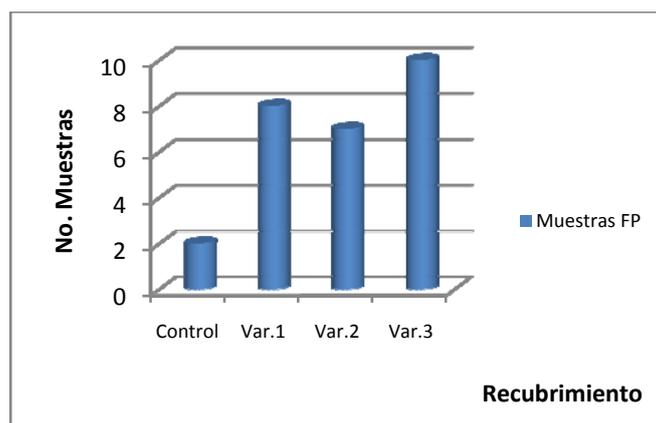


Figura 3.3 Resultados falsos positivos de acuerdo a la variante de recubrimiento empleada

### 3.1.4. Selección de las condiciones de inmunorreacción del ensayo

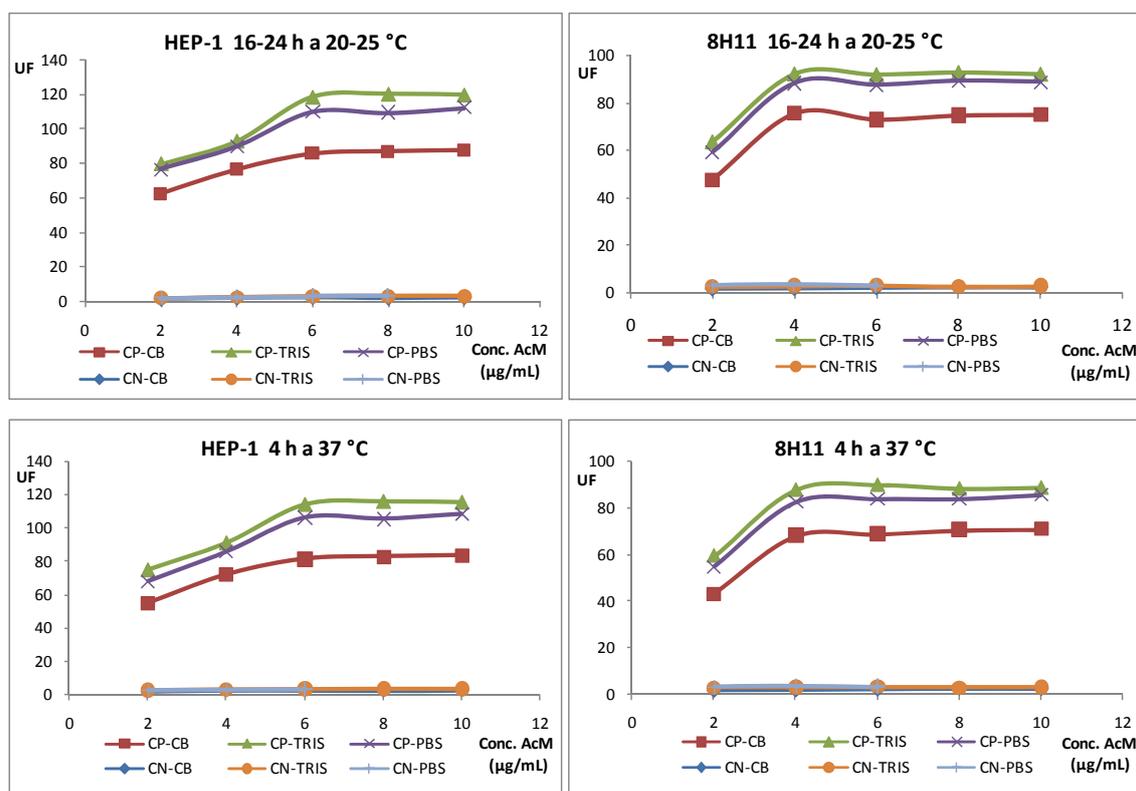
#### 3.1.4.1. Selección de las condiciones de recubrimiento de la fase sólida

En el nuevo ensayo se evaluaron las condiciones de recubrimiento de los anticuerpos seleccionados para la fase sólida, a pesar de ser los mismos empleados en el ensayo precedente, atendiendo a que se modificó el principio de ensayo, tratándose en este caso de un sándwich de doble anticuerpo modificado, por la introducción del sistema estreptavidina/biotina.

En los ELISAs es muy importante el paso de sensibilización de la fase sólida. En estos ensayos hay una proporcionalidad entre el número de moléculas inmovilizadas en la primera capa sobre la matriz sólida y las que reaccionan en la segunda capa. Esta proporcionalidad continúa en capas ulteriores y es responsable de la sensibilidad del ensayo. Además, es vital que la orientación de las moléculas inmovilizadas sea la adecuada, como resulta con los anticuerpos, los que deben adsorberse por el fragmento Fc (fragmento cristalizable) para permitir una interacción eficiente con el antígeno (231).

Se encontraron diferencias significativas en los resultados alcanzados para las diferentes disoluciones reguladoras de recubrimiento evaluadas ( $p < 0,05$ ) y se demostró que el TRIS fue el más adecuado independientemente del AcM empleado y de la condición de incubación ensayada (figura 3.4).

En esta figura también se observa que el valor de fluorescencia de la muestra positiva empleada se mantuvo constante, o sea, alcanzó la meseta de recubrimiento, a una concentración cercana a 6  $\mu\text{g/mL}$ , para el caso del AcM HEP-1 y 4  $\mu\text{g/mL}$  para el 8H11 en todas las disoluciones y condiciones de recubrimiento evaluadas, no encontrándose diferencias entre los valores correspondientes a la meseta en cada caso ( $p > 0,05$ ). En la práctica se prefiere sensibilizar la fase sólida con un exceso de material biológico, que debe ser ligero, ya que elevadas concentraciones pueden provocar una disminución de la sensibilidad y la detectabilidad de la prueba (efecto “gancho”), por la formación de sobrecapas de biomoléculas débilmente adsorbidas, que se liberan fácilmente en los pasos subsiguientes del ensayo (24, 232). Por tal motivo se decidió fijar las concentraciones de recubrimiento a 8 y 5  $\mu\text{g/mL}$  para los anticuerpos HEP-1 y 8H11, respectivamente. En todos los casos las señales del CN se mantuvieron por debajo de 4 UF.



CP: Control positivo CN: Control Negativo CB: Disolución reguladora carbonato-bicarbonato de sodio 0,5 mol/L pH 9,6  
 TRIS: Disolución reguladora Tris-HCl 0,05 mol/L pH 8 PBS: Disolución reguladora salina-fosfato pH 7,3-7,5

Figura 3.4 Titulación de los anticuerpos monoclonales de recubrimiento en diferentes disoluciones y condiciones de tiempo y temperatura

En cuanto a las condiciones de incubación del recubrimiento, no se detectaron diferencias significativas entre 16-24 h a 20-25 °C y 4 h a 37 °C ( $p > 0,05$ ), por lo que se seleccionó la primera, ya que desde el punto de vista

productivo es más conveniente debido a que luego del proceso de recubrimiento, se incluye el paso de bloqueo y preservo, seguido por el secado y el sellado de las placas y la incubación del recubrimiento 4 h a 37 °C alargaría el proceso productivo de las placas recubiertas, en caso de realizarse en un solo día todas las fases del mismo. Las condiciones de recubrimiento óptimas seleccionadas en este estudio coincidieron con las aplicadas en la generación anterior de UMELISA, en estas condiciones se obtuvieron las mayores señales de fluorescencia para la muestra positiva de 3 ng/mL, manteniéndose el CN a un bajo nivel.

No se valoró la condición de incubación del recubrimiento entre 2 y 8 °C, atendiendo a las limitaciones tecnológicas futuras que pudieran encontrarse en el orden productivo, ya que no están dados los requerimientos necesarios para la incubación de grandes volúmenes de placas a esa temperatura en condiciones de humedad controlada.

#### 3.1.4.2. Titulación de los conjugados de anticuerpos-biotina y estreptavidina/fosfatasa alcalina

Los mejores resultados en cuanto a la mayor separación de la señal de fluorescencia del CP y CN, así como el incremento lineal de la curva estándar utilizada en el estudio, se lograron mediante el empleo de la mezcla de AcB a la concentración de 0,25 µg/mL para cada AcM (2F12H9 y 2C4A2) y el conjugado de Estrep./FA 1:10 000, esta dilución de conjugado correspondió a una concentración de 0,063 µg/mL (figura 3.5). Con esta combinación de concentraciones para los AcB y el conjugado se lograron señales para el CP entre 120 y 160 UF y para el CN por debajo de 4 UF, así como el incremento lineal de la curva estándar. Estos resultados superaron los alcanzados en la anterior generación de UMELISA, en la cual los conjugados trabajaban a diluciones entre 1 500 y 3 000. Las mayores diluciones de trabajo alcanzadas en el nuevo ensayo pudieran ser atribuibles a la inclusión de AcM para todas las fases de inmunorreacción, con las características de pureza, especificidad y alta afinidad por el antígeno aportadas por ellos, así como al empleo del sistema estreptavidina/biotina, que amplifica en mayor grado la reacción inmunológica que tiene lugar en la fase sólida, con respecto a los conjugados tradicionales de anticuerpo/enzima.

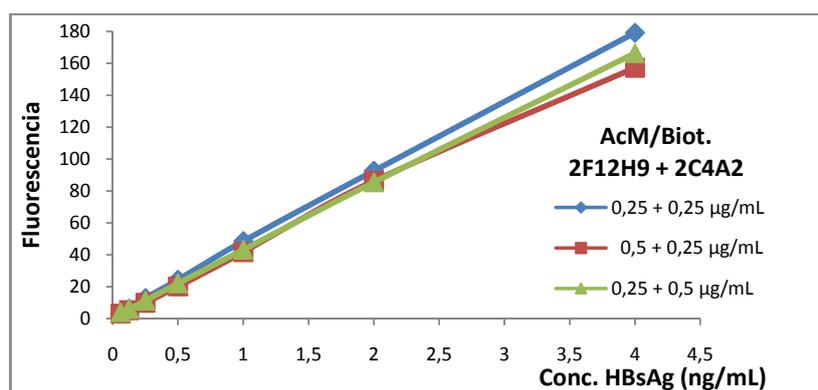


Figura 3.5 Comportamiento de la curva estándar de HBsAg con diferentes combinaciones de concentración de los anticuerpos monoclonales biotinilados y el conjugado Estrep./FA 1:10 000 (0,063 µg/mL)

### 3.1.4.3. Determinación del tiempo de incubación de los diferentes pasos del ensayo

La selección del tiempo de incubación de los diferentes pasos de la prueba tuvo en cuenta, para la mayor parte de sus variantes (tabla 2.2, anexo 5), no alargar el ensayo con respecto al UMELISA que hasta ese momento se utilizaba en la Red Nacional de Laboratorios SUMA (2 h-30 min), a pesar de que el nuevo ultramicroELISA incluía un paso más en su procedimiento. Se consideraron también los tiempos de duración promedios descritos para otros ensayos comerciales tipo ELISA empleados para este fin (entre 1,5 y 4 h) (20), así como la aplicación futura de esta prueba para la certificación de sangre, con la consiguiente necesidad de obtener los resultados en el menor plazo de tiempo posible. Por tanto, se partió de una variante en la que todos los pasos se incubaron 1 h (Variante A) y en las restantes se mantuvo a este tiempo solo uno de los pasos del ensayo, reduciendo los restantes a 30 min, para determinar aquella donde se obtuvieran las señales apropiadas de los controles, así como la mejor pendiente de la curva estándar. La variante E se valoró en atención a lo descrito en la literatura (208, 227), donde las variantes de ensayo que alargan el tiempo de incubación de la muestra entre 12 y 24 h a 20 a 25°C, logran niveles de detectabilidad superiores.

En todos los casos, la incubación del sustrato se evaluó entre 20 y 25 °C, desestimando su incubación a 37 °C como se realizaba en la anterior generación de UMELISA, atendiendo a la necesidad de homogeneizar los procedimientos de los ensayos ultramicroanalíticos empleados para la certificación de sangre y los programas de vigilancia epidemiológica, lo cual evitaría errores al personal que los realiza simultáneamente. Además, la mayoría de los ensayos para el HBsAg disponibles en el mercado incuban el sustrato a esta temperatura.

La incubación del sustrato a 37 °C en el UMELISA HBsAg, persiguió el objetivo de que el ensayo alcanzara el nivel de detectabilidad requerido, según las regulaciones internacionales establecidas para el pesquisaje de la sangre.

En la figura 3.6 se observa que, para las variantes cortas (A, B, C y D), los mejores resultados se alcanzaron para la B, que incluye la incubación de las muestras durante 1 h y los restantes pasos 30 min. Con esta variante se obtuvo la mayor pendiente de la curva estándar, el CP estuvo cercano a 120 UF y el CN por debajo de 4 UF. La mayor pendiente de la curva garantiza mayores valores de fluorescencia para las diferentes muestras de concentración conocida ensayadas, lo cual está directamente relacionado con la detectabilidad. Esta variante garantiza, además, un tiempo total de realización del ensayo similar al del UMELISA anterior.

El hecho de que los mejores resultados se alcanzaron cuando se alargó a 1 h el tiempo de incubación de la muestra, demostró que este es el paso limitante en el ensayo y debe alargarse para garantizar la unión más eficiente del HBsAg a los anticuerpos de la fase sólida. Los resultados obtenidos para la variante E corroboraron esta afirmación. Con la incubación de la muestra 16-24 h se obtuvo la mayor pendiente de la curva estándar; pero esta variante no es aplicable para las labores de pesquisaje en los donantes de sangre y los grupos de riesgo, por alargar el tiempo de diagnóstico, constituyendo estos grupos el objetivo primordial para el cual se desarrollan los ensayos de HBsAg basados en la tecnología SUMA, en Cuba. Además, para esta variante la señal del CP superó las premisas establecidas en la metodología, por lo que habría que preparar un suero control específico para ella. Atendiendo a esto, la variante E solo podría aplicarse como alternativa de realización del ensayo para los estudios que requieran de los procedimientos de detectabilidad máxima de la prueba, tal y como sugieren otras casas comerciales (227).

El aumento del tiempo en el paso de los AcB y el conjugado no aumentó la pendiente de la curva estándar, afectándose especialmente para el conjugado Estrep./FA.

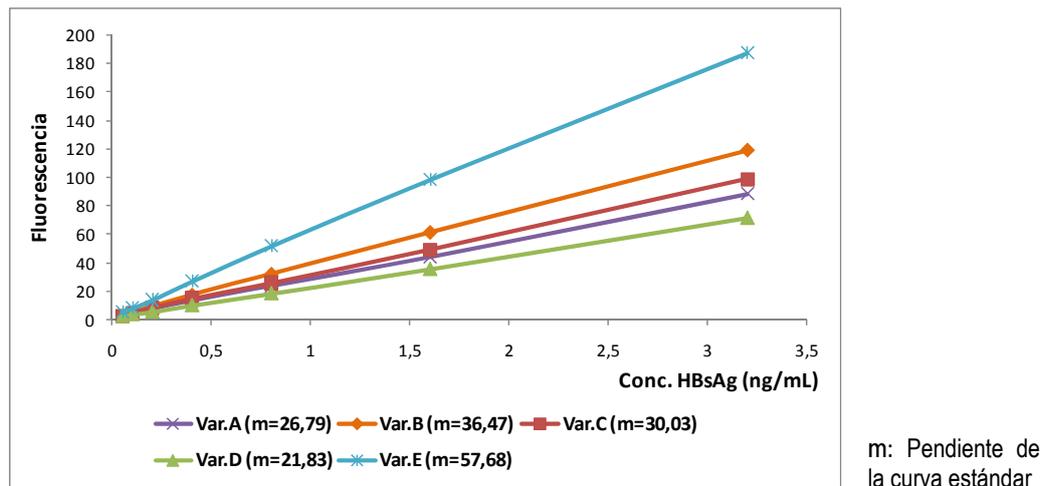


Figura 3.6 Evaluación de diferentes variantes de tiempo de realización del ensayo

### 3.1.5. Evaluación de las condiciones del ensayo

De las 1 997 muestras evaluadas, el ensayo de referencia clasificó 16 como HBsAg positivas y 1 981 negativas. En el nuevo ensayo 37 fueron positivas y 1 960 negativas, encontrándose 22 muestras con resultado FP y una muestra en que la prueba no fue capaz de detectar el antígeno, lo que representó valores de S y E de 93,75% y 98,8%, respectivamente. La baja S se debió a la ocurrencia de un FN, también influenciada por el reducido tamaño de la población de positivos involucrada en el estudio. No obstante, es inaceptable que una prueba destinada al pesquisaje del HBsAg no cuente, desde su propio proceso de normalización, con la máxima sensibilidad, tomando en cuenta que estos pesquisajes están dirigidos, entre otras, a poblaciones de donantes de sangre y las implicaciones que puede tener un FN para la seguridad de la sangre y sus productos, íntimamente relacionada con la prevención de la transmisión por esta vía (172).

En cuanto a los resultados FP en este tipo de ensayo, se describe que estos pueden deberse a reacciones inespecíficas provocadas por anticuerpos heterófilos, anticuerpos tipo factor reumatoideo (FR) o anticuerpos contra la enzima u otros componentes que integran el conjugado de la reacción, los cuales se encuentran presentes en la muestra y pudieran establecer puentes entre el complejo fijado a la fase sólida y los anticuerpos marcados (153, 233).

Los anticuerpos heterófilos son anticuerpos humanos con capacidad de unirse a inmunoglobulinas de origen animal, tal es el caso de las especies animales que habitualmente son empleadas para la producción de los reactivos usados en las pruebas para diagnóstico, como ovejas, conejos, cabras, ratones y ratas. Estos anticuerpos humanos anti-animal pueden ser de las clases IgG, IgA, IgM e IgE y tener especificidad anti-isotipo y

anti-idiotipo. Sus concentraciones pueden llegar al orden de los gramos por litro y persistir por años. La prevalencia estimada va desde 1 hasta 80% (234, 235). Aunque existen reportes relacionados con la presencia de anticuerpos heterófilos dirigidos a policlonales de ovejas, conejos y cabras (236), los producidos contra monoclonales de ratón (HAMA) son los que más se han informado (237, 238). En la literatura se plantea que los anticuerpos heterófilos están presentes en un 30 a 40% de las muestras (233, 239) y ello es consecuencia del contacto íntimo, intencional o no, con los animales.

La interferencia de este tipo de anticuerpo tiene lugar con mayor frecuencia en los inmunoensayos tipo sándwich, ya que pueden unirse simultáneamente a la región Fc de los anticuerpos de captura y de detección, generando una señal en ausencia del antígeno, por lo que ocurriría un resultado elevado falso (233-235). Marks y cols., plantean, en 2002, que los anticuerpos heterófilos son la sustancia interferente más importante encontrada en los inmunoensayos (240), mientras que Selby informa, en 1999, que los ensayos para HBsAg se encuentran entre los que describen afectación de su especificidad por la presencia de este tipo de anticuerpo interferente (233).

El tipo de interferencia por HAMA es mayor en aquellos pacientes que reciben tratamiento con AcM murinos (241, 242). Algunos estudios para minimizar las interferencias producidas por estos anticuerpos muestran el efecto que puede tener la adición de inmunoglobulinas de ratón en los diluentes de los reactantes (233, 243, 244), aunque otros autores proponen la adición de inmunoglobulinas animales no específicas, de otras especies, para evitar este tipo de interferencia mediante reacción cruzada (245).

Los anticuerpos tipo FR son autoanticuerpos, por lo general de clase IgM, dirigidos contra la porción Fc de la IgG. No se presentan solo en la artritis reumatoidea, sino también en otras enfermedades como el lupus eritematoso sistémico y la hepatitis crónica activa. Además, se encuentran presentes a bajas concentraciones en alrededor de 5% de la población normal (233).

El FR se considera uno de los responsables fundamentales de los FP producidos en los inmunoensayos, ya que reacciona de manera inespecífica con diferentes epitopos de las moléculas de IgG. Los AcM, a pesar de sus innumerables ventajas, no están exentos de las reacciones inespecíficas que causa el FR. Machado y cols., en 2003, determinan que las distintas clases de IgG monoclonales murinas muestran grados de reactividad diferentes frente al FR y en general son menos reactivas que las IgG policlonales (246).

Por otra, también se informa que durante la biotinilación se puede alterar la configuración de los anticuerpos, propiciando la exposición de epitopos a los cuales pueden enlazarse los anticuerpos heterófilos (247).

En el caso de los ensayos para HBsAg, que por lo general emplean la muestra pura, el efecto de estas reacciones inespecíficas se incrementa. En tal sentido, algunos investigadores plantean que, por lo general, las disoluciones empleadas como diluyente de los inmunoreactantes deben contener moléculas con función estabilizante y bloqueadora, de acuerdo con las características y el origen de los reactivos biológicos involucrados en el ensayo (24, 240), por lo que históricamente, los agentes bloqueadores han sido sueros normales, no específicos, procedentes de las mismas especies que participan en el mismo (235). Sin embargo, otros autores señalan que la adición de sueros normales de otras especies diferentes a las representadas en la reacción, puede reducir las interferencias producidas, por reactividad cruzada con los anticuerpos que forman parte del ensayo (239, 248, 249). En 1980, Hunter y cols. sugieren que la adición de suero normal al 1% de una especie animal podría eliminar por completo las interferencias por anticuerpos heterófilos en los ensayos tipo sándwich (250).

Con el objetivo de minimizar al máximo los resultados FP obtenidos en la prueba, se ensayó la adición de SNC al 0,3 y 0,7% (p/v) en el diluyente de los AcB (TRIS con BSA a 10 mg/mL). Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 3.2. Se seleccionó SNC, a pesar de no estar representado en el ensayo, atendiendo a la reactividad cruzada descrita entre anticuerpos de diferentes especies (239, 248, 249), a la disponibilidad del mismo y a que existían evidencias previas sobre el efecto de este suero normal para resolver las interacciones inespecíficas en este tipo de ensayo (233, 251). Por otra parte, no se valoró desde el momento inicial la utilización de SNR por su escasa disponibilidad para ser incluido en procesos productivos de grandes volúmenes.

Tabla 3.2 Efecto, para las muestras falsas positivas, de la adición de SNC en el diluyente de los AcB

Muestras con resultado falso positivo		
Diluyente TRIS-BSA (10 mg/mL)	Diluyente TRIS-BSA (10 mg/mL) SNC 0,3%	Diluyente TRIS-BSA (10 mg/mL) SNC 0,7%
22	9	5

La adición de SNC bloqueó una parte importante de las inespecificidades que tuvieron lugar en el ensayo, permitiendo que se negativizaran 17 muestras (77,3%) con resultado FP, cuando se utilizó al 0,7% (p/v). Concentraciones inferiores (0,3% (p/v)) provocaron la negativización de un número menor de muestras. Se evaluó una concentración intermedia (0,5% (p/v)), para comprobar si esta era suficiente para eliminar las 17 muestras FP negativizadas con la concentración de 0,7% (p/v); pero en este caso solo se negativizaron 15. Por

otra parte se incrementó la concentración de SNC hasta 1% (p/v), pero ello no provocó que se negativizara alguna de las cinco muestras que aún permanecían como FP de la prueba, por lo que se seleccionó la concentración de 0,7% (p/v) de SNC en el diluyente de los AcB.

Resultados similares obtienen otros investigadores, al utilizar SNC para bloquear las interferencias en ensayos que emplean AcM e informan alcanzar una reducción de los FP en un 78% (252). En el año 2002, Levinson y cols., plantean que cuando en los ensayos de tipo sándwich no están presentes los agentes bloqueadores, estos pueden mostrar un rango de interferencias entre 5 y 10% (235).

Para eliminar las muestras que aún seguían con resultado FP en la prueba, se ensayó la adición de SNR al diluyente de los AcB, atendiendo a que los anticuerpos involucrados en el ensayo son de origen murino y las interferencias de tipo HAMA, posiblemente presentes en estas muestras, no se eliminaron mediante la adición del SNC (233-235, 242, 253). Se evaluaron diferentes porcentajes de SNR (0,1; 0,3 y 0,5% (p/v)), tratando de establecer un compromiso entre los resultados y la posibilidad de escalado productivo, teniendo en cuenta que este suero es de más difícil obtención. A partir de 0,3% (p/v) se negativizaron cuatro de las cinco muestras FP (figura 3.7). La muestra que se mantuvo reactiva se negativizó con concentraciones de SNR a partir de 2% (p/v), pero ello fue desestimado debido a su insostenibilidad desde el punto de vista productivo. La composición final del diluyente de los AcB fue de SNC al 0,7% (p/v) y SNR al 0,3% (p/v) en TRIS-BSA (10 mg/mL).

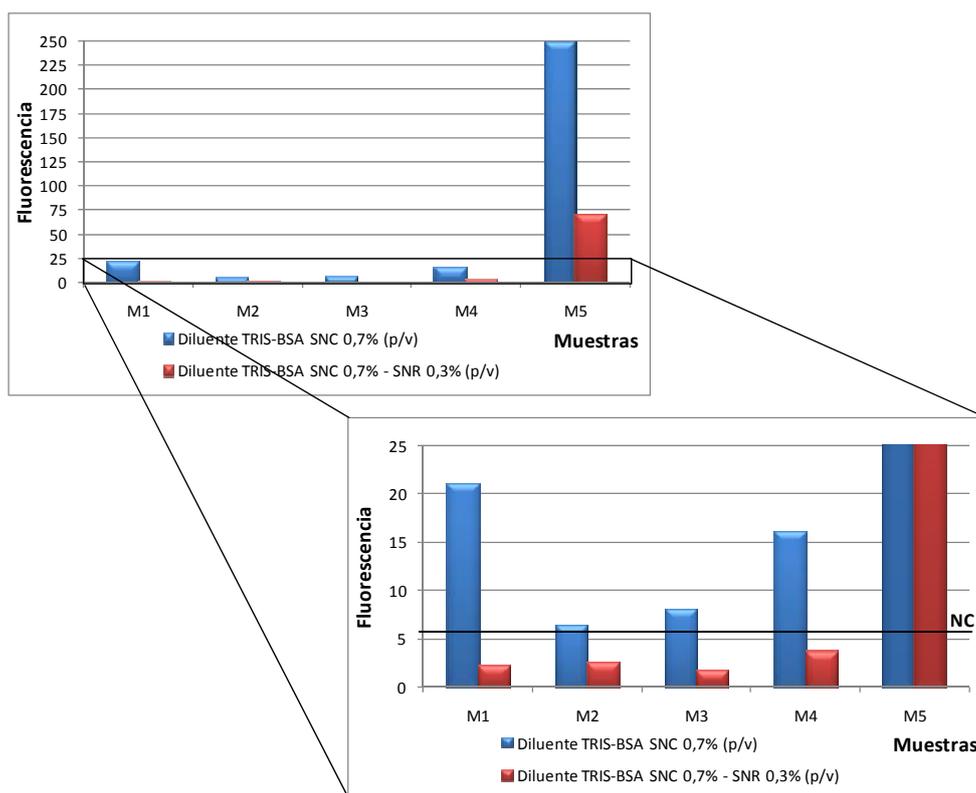


Figura 3.7 Efecto, para las muestras falsas positivas, de la adición de SNR en el diluyente de los AcB

La muestra que resultó FN en la prueba desarrollada, se ensayó en la generación anterior de UMELISA, arrojando resultado positivo, lo cual apuntó a que el HBsAg presente en la muestra fue capturado por los AcM de la fase sólida; pero no reconocido por los AcM biotinilados de la fase líquida en el nuevo ensayo y si por los AcP del conjugado del ensayo precedente. Este resultado indicó que la especificidad de los AcM marcados, empleados en la prueba, resultaba aún insuficiente para disponer de un ensayo con elevada sensibilidad clínica, condición imprescindible para pruebas destinadas al pesquisaje. Por tal motivo y para enriquecer el reconocimiento epitópico del HBsAg presente en las muestras, minimizando de este modo la ocurrencia de resultados FN, se decidió adicionar a la mezcla de AcM biotinilados, diferentes concentraciones de los AcP ovinos (empleados en el conjugado del UMELISA HBsAg), también biotinilados (0,1 y 0,2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

En la figura 3.8 se observa que la concentración de 0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de los AcP biotinilados, fue suficiente para positivizar la muestra FN, no encontrándose un incremento sustancial de su fluorescencia al aumentar la concentración de estos anticuerpos en la mezcla.

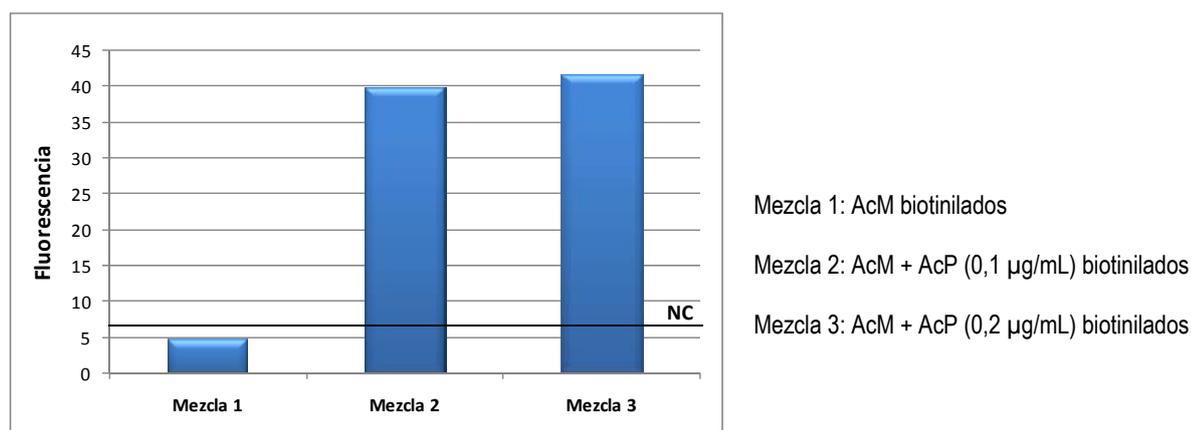


Figura 3.8 Efecto de la inclusión de anticuerpos policlonales biotinilados sobre una muestra falsa negativa

Otros autores encuentran resultados similares al normalizar ensayos para la detección del HBsAg con AcM tanto en la fase sólida como para el revelado de la reacción inmunológica, lo que los conduce a incluir AcP marcados para garantizar la adecuada detección de las diferentes variantes genéticas del VHB (29).

Una vez re-establecidas las condiciones de ensayo, referente a la inclusión de 0,1 µg/mL de AcP biotinilados en la mezcla de anticuerpos marcados, así como de SNC (0,7% (p/v)) y SNR (0,3% (p/v)) en el diluyente de los AcB, se evaluaron de nuevo las 1 997 muestras del estudio de población, alcanzándose muy altos niveles de S (100%) y E (99,95%), con solo un resultado FP, respecto a la prueba de referencia empleada.

### 3.1.6. Determinación del nivel de corte

Dentro de las 1 090 muestras de suero de donantes de sangre evaluadas para determinar el NC de la prueba se encontraron muestras verdaderas positivas (VP) con bajas concentraciones de HBsAg, así como muestras FP y un considerable número de verdaderas negativas (VN), todas ellas contribuyeron en gran medida al establecimiento de un NC que garantizara la adecuada discriminación entre negativos y positivos, preservando la máxima detectabilidad o sensibilidad analítica de la prueba y sin una afectación considerable de su especificidad. Luego de normalizar la fluorescencia de las muestras con respecto al CP, se determinó que 0,03 era el valor de relación que lograba la discriminación adecuada entre las poblaciones en estudio (tabla 3.3). Se encontró que el 99,27% de las muestras evaluadas, correspondiente a los VN, quedó por debajo de este NC, lo que garantizó la especificidad de la prueba. Ocho muestras se encontraron por encima del mismo, de ellas seis VP y dos muestras FP, las cuales fue imposible eliminar por cambios en el NC; ya que ello habría implicado sacrificar la S de la prueba, por lo se prefirió favorecer este parámetro aún a costa de una ligera afectación en la E, teniendo en cuenta la aplicación del ensayo en el pesquisaje. De esta forma, quedó establecido  $0,03(\text{CP-CN}) + \text{CN}$  como NC

del ensayo normalizado, siendo consideradas como positivas todas las muestras cuya fluorescencia fuera igual o superior a este valor.

Tabla 3.3 Distribución de frecuencias para la determinación del nivel de corte del ensayo

Clases	Frecuencia absoluta	Frecuencia absoluta acumulada	Frecuencia relativa acumulada	(M-CN)/(CP-CN)
0	796	796	73,03	
0,01	270	1 066	97,80	
0,02	14	1 080	99,08	
0,03	2	1 082	99,27	
0,04	1	1 083	99,36	VP 0,038
0,05	1	1 084	99,45	VP 0,040
0,06	1	1 085	99,54	FP 0,057
0,07	0	1 085	99,54	
0,08	0	1 085	99,54	
0,09	1	1 086	99,63	FP 0,088
0,1	0	1 086	99,63	
0,2	3	1 089	99,91	VP 0,108; VP 0,154; VP 0,192
0,3	1	1 090	100,00	VP 0,2134

M: Fluorescencia de la muestra      CN: Control negativo      CP: Control positivo

Para algunos investigadores, el NC se determina analizando la S y E del ensayo (24), de esta forma se selecciona aquel valor que establezca una fórmula de compromiso entre ambos parámetros, favoreciendo el que debe ser máximo, de acuerdo a la aplicación de la prueba.

En la anterior generación de UMELISA, así como en la mayoría de los ELISAs comerciales para el HBsAg revisados (23, 31, 227-229), el NC se calcula teniendo en cuenta el valor del CN, que tiene como ventaja la sencillez del tratamiento matemático; pero es más vulnerable a las variaciones en el ensayo, tal como el aumento del fondo de sustrato, lo que pudiera afectar la S de la prueba. No obstante, su mayor limitante radica en la afectación de la E de los ensayos debido a su bajo valor de señal.

### 3.1.7. Determinación de la detectabilidad o sensibilidad analítica del ensayo

En la figura 3.9 se muestran los resultados de la detectabilidad o sensibilidad analítica del ensayo normalizado, para los subtipos *ad* y *ay* del HBsAg de las preparaciones de referencia del PEI. Con el NC previamente establecido, el ensayo fue capaz de detectar como positivas las muestras con concentraciones de HBsAg a partir de 0,1 ng/mL para el subtipo *ad* y muy cercano a este valor (entre 0,1 y 0,2 ng/mL) para el subtipo *ay*. El análisis comparativo de estos resultados respecto a los obtenidos para la generación anterior de UMELISA, cuya

detectabilidad se encontraba entre 0,5 y 1 ng/mL (254), permitió demostrar la superioridad del nuevo ensayo en cuanto a su límite de detección.

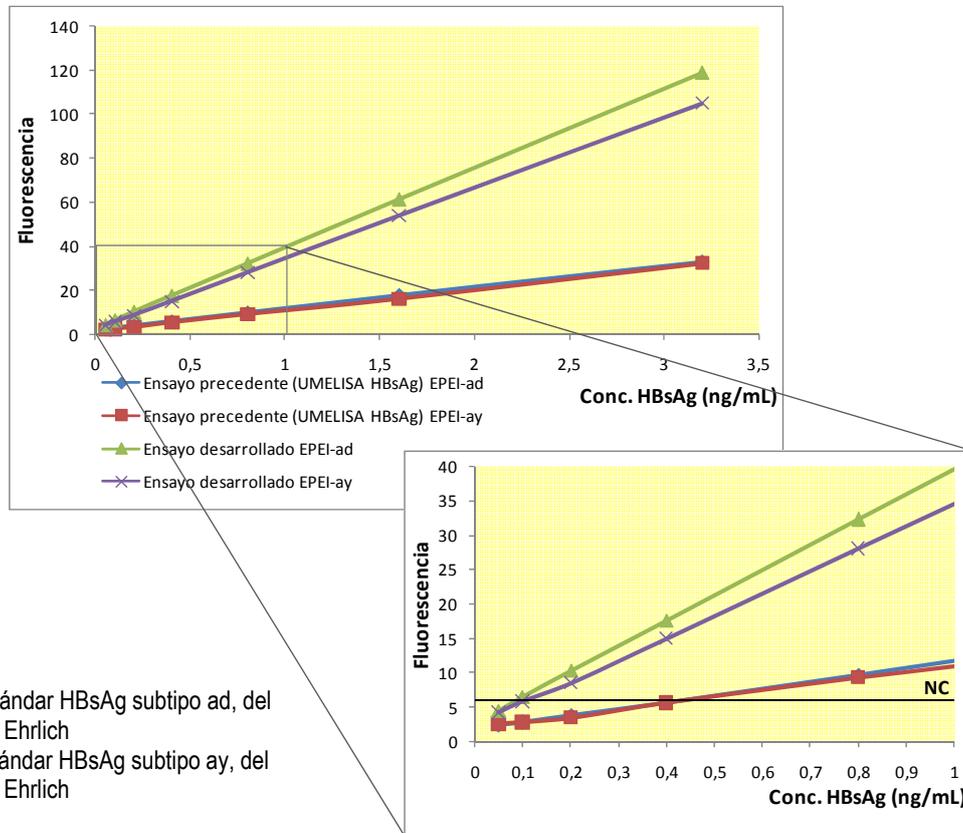


Figura3.9 Detectabilidad del ensayo normalizado respecto al UMELISA precedente

Este resultado da cumplimiento a uno de los principales objetivos del presente trabajo, al lograr la normalización de un ensayo capaz de detectar menores concentraciones de HBsAg, con respecto al utilizado hasta ese momento en la Red Nacional de Laboratorios para la certificación de sangre y la vigilancia epidemiológica de la infección por el VHB y que, a su vez, permitió contar con una prueba más competitiva a nivel internacional.

Duong y cols, en 2006, evalúan la sensibilidad analítica de cinco ensayos comerciales para HBsAg (tabla 3.4, anexo 10): AxSym HBsAg V2, de Abbott (E.U.A.), un EIE automatizado que emplea como fase sólida micropartículas de poliestireno e involucra AcM y AcP; Advia Centaur HBsAg, de Bayer (Alemania), que consiste en un ensayo quimioluminiscente; Liaison HBsAg, de Dia-Sorin (Italia), prueba que también mide quimioluminiscencia y emplea partículas magnéticas; Monolisa HBsAg Ultra, de Bio-Rad (E.U.A.), un ELISA en placas de poliestireno recubiertas con AcM y que usa AcP obtenidos en cabra para el revelado de la reacción inmunológica y Vidas HBsAg Ultra, de Biomérieux (Francia), ensayo automatizado que emplea AcM y AcP

combinados al sistema estreptavidina/biotina. En este estudio se evalúa la detectabilidad de los ensayos mediante un panel de referencia nacional de la Sociedad Francesa de Transfusiones Sanguíneas, que incluye 10 muestras con concentraciones de HBsAg desde 0,04 hasta 2,24 ng/mL (subtipos *adw*<sub>2</sub> y *ayw*<sub>3</sub>) (255).

El nuevo ensayo alcanzó niveles de detectabilidad comparables a los obtenidos por la mayor parte de estos ensayos, de gran prestigio y aceptación a nivel mundial, algunos totalmente automatizados y todos con volúmenes de reacción entre 10 y 15 veces superiores a los empleados en la tecnología SUMA.

Los niveles de detectabilidad logrados se debieron a la inclusión, para el revelado de la reacción, de dos nuevos AcM de alta afinidad, que en combinación con los otros dos AcM, ya usados en la fase sólida desde la generación anterior de UMELISA, también de alta afinidad; permitieron en la mayoría de los casos un reconocimiento certero y reproducible de los diferentes epítomos del HBsAg hacia los cuales están dirigidos. En estos resultados también influyó la extraordinaria amplificación de la señal que se logra con el empleo del sistema estreptavidina/biotina. La combinación de estos dos elementos permitió el desarrollo de un ensayo con un mejor nivel de detección.

Otros investigadores logran también mejorar los niveles de detectabilidad del HBsAg con la inclusión de AcM, el uso del sistema estreptavidina/biotina o la utilización combinada de ambos (29, 256).

Posterior al desarrollo y registro del ensayo, se recibió el 1<sup>er</sup> EI-OMS (código 80/549) para el subtipo *ad* del HBsAg, elaborado con el objetivo de disponer de una herramienta capaz de evaluar internacionalmente y de manera uniforme la detectabilidad de los ensayos para el HBsAg (158); por lo que la sensibilidad analítica de la prueba también se determinó frente a esta preparación de referencia, siendo capaz de detectar muestras con concentraciones de HBsAg a partir de 0,3 UI/mL, según la curva de diluciones empleada para este estudio.

Este nivel de detección es comparable al obtenido por otras pruebas disponibles a nivel mundial para el pesquijaje del HBsAg (20). No obstante, se debe continuar trabajando en la mejora continua de este parámetro. La disponibilidad de un estándar internacional para HBsAg homogeniza los resultados alcanzados por los diferentes ensayos en sus evaluaciones, ya que todos son referenciados frente a una preparación única y mundialmente aceptada como patrón.

En la tabla 3.5 se presentan los resultados del panel de bajo título PHA 105 de BBI, con lo cual se corroboró la detectabilidad, en UI/mL, alcanzada por el ultramicroELISA desarrollado frente al 1<sup>er</sup> EI-OMS.

Tabla 3.5 Resultados del panel de bajo título PHA 105 (BBI) en el ensayo normalizado, en comparación con pruebas de pesquisaje licenciadas por la FDA

Miembro PHA 105	Conc. HBsAg (UI/mL)	RIA HBsAg Abbott Proc.1	EIE HBsAg						
			Abbott Proc.2	Abbott Proc.1	Abbott Proc.3	Abbott IMx	Ortho Proc.2	UMELISA Var.B	UMELISA Var.E
01	0,3	+	+	+	+	-	+	+	+
02	0,8	+	+	+	+	+	+	+	+
03	0,3	+	+	+	+	+	+	+	+
04	0,3	+	+	+	+	+	+	+	+
05	0,3	+	+	+	+	+	+	+	+
06	0,6	+	+	+	+	+	+	+	+
07	0,1	+	-	+	-	-	-	-	+
08	0,2	+	+	+	+	-	+	-	+
09	0,2	+	-	+	-	-	-	-	+
10	0,3	+	+	+	+	+	-	+	+
11	NEG	-	-	-	-	-	-	-	-
12	0,3	+	+	+	+	+	+	+	+
13	0,6	+	+	+	+	+	+	+	+
14	0,2	+	+	+	+	-	+	-	+
15	0,2	+	+	+	+	+	+	-	+

1: Procedimientos que incluyen la incubación de la muestra entre 12 y 20 h

2: Procedimientos con una duración entre 3 y 4 h

3: Procedimiento con una duración de 75-80 min

B: Variante corta (2 h. 30 min) del UMELISA normalizado (acápites 3.1.4.3)

E: Variante larga (muestras 16-24 h) del UMELISA normalizado (acápites 3.1.4.3)

Los resultados de este panel, con la variante corta del ensayo desarrollado (Var.B), confirmaron el nivel de detectabilidad determinado en el estudio correspondiente, ya que todas las muestras con concentración de HBsAg a partir de 0,3 UI/mL se detectaron, no así las que contenían 0,1 y 0,2 UI/mL de HBsAg. Sin embargo, la variante de incubación de las muestras entre 16 y 24 h (Var.E), cuyo límite de detectabilidad se encontró alrededor de 0,08 UI/mL, detectó todas las muestras del panel positivas al HBsAg. Los seis ensayos tomados como referencia por BBI para la evaluación de este panel de bajo título (208), mostraron diferencias en sus resultados, siendo más sensibles la prueba de RIA y el EIE con incubación de las muestras entre 12 y 20 h (Proc.1), ambos de la compañía Abbott, cuyos resultados se correspondieron con la variante larga del UMELISA (Var.E). La prueba IMx, de Abbott, empleada también como referencia, dejó de detectar cinco muestras con concentraciones de HBsAg entre 0,1 y 0,3 UI/mL, resultado similar, en número, al alcanzado por la variante corta del ensayo normalizado (Var.B), que no detectó, en este caso, las cinco muestras con concentraciones entre 0,1 y 0,2 UI/mL, por encontrarse por debajo de su límite de detección.

En una evaluación realizada por la OMS, en 2004, a cinco ensayos tipo ELISA para la detección del HBsAg, tres de estas pruebas detectan todas las muestras positivas del panel PHA 105 (Enzygnost HBsAg 5.0, de DadeBehring Inc.; Genedia HBsAg ELISA 3.0, de Green Cross Life Science Corp. y Murex HBsAg Version 3, de Abbott-Murex), en tanto Equipar HBsAg One Step, de Equipar Diagnostici, solo es capaz de reconocer cuatro muestras positivas correspondientes a aquellas con concentraciones de HBsAg de 0,6 y 0,8 UI/mL, así como una de las seis muestras con concentración de 0,3 UI/mL. Hepalisa, de J. Mitra and Co., por su parte, solo detecta las muestras con concentraciones iguales o mayores a 0,6 UI/mL (20).

Para el panel de título mezclado PHA 204, de BBI, se alcanzaron similares resultados entre la variante B del ensayo desarrollado y los procedimientos 2 y 3 de Abbott, así como su RIA y la prueba de Ortho. Estos ensayos detectaron 22 de las 23 muestras HBsAg positivas, solo dejaron de detectar el miembro 12 del panel, cuya concentración es de 0,1 UI/mL. En el caso de los procedimientos largos, tanto del UMELISA (Var.E), como de Abbott (Proc.1), se detectaron todas las muestras positivas del panel. En ningún caso las dos muestras negativas tuvieron un resultado contrario.

Las muestras negativas, incluidas como control interno de cada panel, se detectaron como tal, lo cual apunta a que la especificidad de la prueba no se afectó con la elevación de la sensibilidad analítica. Los resultados indican que a pesar de lograr la normalización de un ensayo con superior detectabilidad, es necesario continuar trabajando para incrementar aún más este parámetro en un procedimiento técnico factible para las labores de pesquiasaje de la infección por el VHB, el cual debe poseer un tiempo de duración relativamente corto, que permita su aplicación en las tareas de certificación de sangre y vigilancia de la hepatitis viral tipo B.

Todas las muestras del panel de seroconversión PHM 921 se detectaron en ambos procedimientos de la prueba desarrollada, ya que las concentraciones de HBsAg, en todas ellas, se encontraron por encima del nivel de detectabilidad del ensayo.

### 3.1.8. Evaluación de las características funcionales del ensayo

La S, definida como la proporción de muestras positivas correctamente identificadas por la prueba, mostró el nivel máximo en el ensayo normalizado, que fue capaz de detectar las 259 muestras de suero HBsAg positivas involucradas en el estudio de población. Se identificaron dos FP (tabla 3.6), lo cual aporta adecuados valores de E para esta prueba, cuya finalidad es el pesquiasaje, por lo que debe poseer una S máxima sin que ello conlleve una considerable afectación de la E.

Tabla 3.6 Tabla de contingencia para determinar las características funcionales de la prueba desarrollada

UMELISA	Hepanostika		Total
	POS	NEG	
POS	259 (VP)	2 (FP)	261
NEG	0 (FN)	1 082 (VN)	1 082
Total	259	1 084	1 343

S = 100%    E = 99,81%    VPP = 99,23%    VPN = 100%

POS: Muestras positiva  
 NEG: Muestras negativas.  
 VP: Verdaderos Positivos  
 FP: Falsos Positivos  
 FN: Falsos Negativos  
 VN: Verdaderos Negativos

En el análisis paralelo con la anterior generación de UMELISA, este presentó seis resultados FP, para una E de 99,44% y dejó de detectar tres muestras VP cuyas concentraciones de HBsAg se encontraban por debajo de su límite de detección, mostrando una S de 98,84%, lo cual corroboró la afirmación de que, generalmente, la S clínica de los ensayos para el HBsAg tiene una estrecha relación con el nivel de detectabilidad de los mismos (19, 61).

Los VPP y VPN del nuevo ensayo mostraron también altos porcentajes, lo cual aumenta la probabilidad que tiene un individuo de ser realmente positivo, o negativo, cuando el resultado de la prueba es reactivo o no reactivo, respectivamente, así como un alto índice de eficacia (99,85%), definida como su capacidad para detectar correctamente todos los positivos y los negativos. Además, se obtuvo muy buena concordancia entre sus resultados y los de la prueba de referencia empleada, con un K de 0,993.

Las 1 121 muestras pareadas de suero y plasma procedentes de donantes de sangre mostraron igual comportamiento en el ensayo, resultando 39 muestras positivas y 1 082 negativas. Este resultado permite la aplicación del ensayo para ambos tipos de muestras, lo cual se corroboró con el adecuado funcionamiento de la prueba para las muestras de plasma correspondientes a los paneles de BBI empleados en el análisis de la detectabilidad.

Al graficar las distribuciones de frecuencias de la población estudiada respecto al valor de relación obtenido de normalizar la fluorescencia de las muestras contra el CP del ensayo  $(M-CN)/(CP-CN)$  (figura 3.10, anexo 10), se observó una definida separación entre las poblaciones de positivos y negativos, encontrándose esta última por debajo del valor de relación seleccionado como NC (0,03).

Al analizar la distribución de frecuencias respecto a la fluorescencia de las 1 078 muestras coincidentemente negativas en este estudio, tanto en la anterior generación de UMELISA, como en el nuevo ensayo desarrollado, se evidenció que este último posee un menor nivel de fondo, ya que la mayoría de las muestras negativas presentaron valores inferiores a 4 UF, en tanto para el ensayo anterior estas muestras se movieron entre 1 y 8 UF. Esta disminución de los fondos está descrita para pruebas que emplean el sistema amplificador estreptavidina/biotina (25, 225, 226). La combinación de este sistema con anticuerpos de alta afinidad, permite trabajar los reactivos biológicos que participan en la reacción a bajas concentraciones, lo cual disminuye el potencial de interferencias que estos puedan provocar en su interacción entre sí y con la muestra, que al ser empleada sin dilución puede incrementar en gran medida la ocurrencia de interacciones inespecíficas (233, 242). Los resultados de S y E alcanzados con la prueba normalizada superaron a los informados por otros autores. Un ensayo similar al de esta tesis, desarrollado en Irán en el año 2010, muestra niveles de S y E de 98,98% y 99,6%, respectivamente, al compararse con Hepanostika (29). Ismail y cols., en 2004, realizan una evaluación al inmunoensayo quimioluminiscente para el HBsAg, completamente automatizado, de Ortho (ECi ensayo) y encuentran 100% de E, sin embargo, su S clínica no rebasa el 97,4 % (257).

La E del ensayo normalizado fue, sin embargo, muy similar a la que informa la prueba de referencia (Hepanostika HBsAg) utilizada en el estudio (99,8%) (258), así como, a la del ensayo quimioluminiscente Autobio, de Diagnostics Co., LTD (China), que reporta una E de 99,88% en la evaluación de 10 000 muestras de donantes de sangre (259).

### 3.1.9. Estudio de especificidad analítica

La especificidad es uno de los más importantes requerimientos de los inmunoensayos. Por consiguiente, su evaluación es un paso vital en la optimización de estas pruebas (260). La magnitud en que las sustancias que provocan interferencia afectan un ensayo depende de numerosos factores: su concentración relativa respecto al analito, su afinidad relativa por los sitios del anticuerpo y el diseño del ensayo (261).

Un problema fundamental en el análisis de los componentes presentes en los materiales biológicos, es el efecto de la compleja y variable mezcla de proteínas, carbohidratos, lípidos, pequeñas moléculas y sales que constituyen las muestras (262). Ochoa y cols., en el año 2008, abordan la interferencia que puede tener, sobre los resultados de los inmunoensayos, componentes de la muestra como la hemoglobina, los lípidos y anticoagulantes, así como anticuerpos que reaccionen con los reactantes, como los de tipo FR e inmunoglobulinas dirigidas contra otros antígenos (24).

En este estudio, las muestras que más influyeron, de manera negativa, en la especificidad del ensayo fueron las hemolíticas, estas presentaron 10,3% de resultados FP y las muestras con FR, de las cuales tres fueron FP, de las diez evaluadas en la prueba (figura 3.11). Es necesario tener en cuenta que para este grupo se evaluaron muy pocas muestras, por lo que sería necesario estudiar un mayor número para arribar a conclusiones definitivas. No obstante, otros autores abordan la afectación que el FR pueden provocar en los ensayos tipo ELISA, aspecto discutido en el acápite 3.1.5 (233, 246).

En la anterior generación de UMELISA las muestras hemolíticas también fueron las que mayor afectación trajeron a la especificidad y aunque algunos autores plantean que la hemólisis causa menos interferencia en los inmunoensayos (233); otros, como Wenk, en 1998, la consideran una fuente importante de interferencia para este tipo de pruebas (263). Sin embargo, las muestras con íctero no presentaron reactividad en ninguno de los dos ensayos, lo que coincidió con lo descrito en la literatura (233).

Por otra parte, Webber y cols., plantean, en 1990, que la lipemia podría causar interferencias (248) y aunque en el ensayo desarrollado no hubo reactividad falsa para este grupo, el anterior UMELISA si presentó un FP. La especificidad de este ELISA también se afectó para las muestras con altas concentraciones de inmunoglobulinas, a diferencia del ensayo normalizado. Las altas concentraciones de inmunoglobulinas en el suero se reconocen como una fuente de interferencias, debido a que precipitan, aumenta la viscosidad de este o pueden provocar uniones inespecíficas (264).

Se plantea que en las mujeres multíparas es muy común la presencia de anticuerpos que pueden provocar resultados adversos en los ensayos (265). Sin embargo, el grupo evaluado no presentó falsa reactividad en la prueba desarrollada, ni su generación anterior.

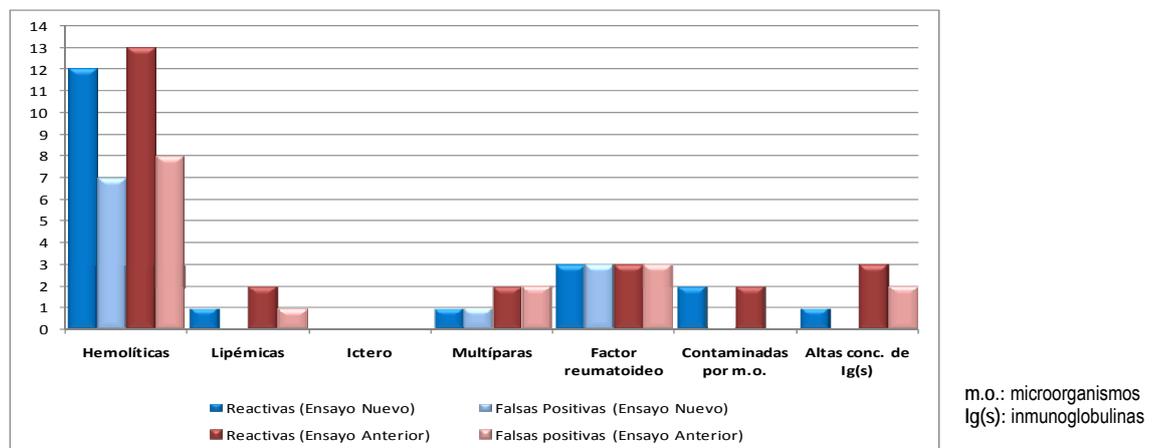


Figura 3.11 Evaluación de la especificidad analítica del ensayo desarrollado, respecto al UMELISA anterior

La evaluación de la especificidad analítica de una prueba, definida según la regulación 47-2007 del CECMED, como la capacidad del método de medir el analito para el cual está diseñado sin que interfieran otros componentes de la muestra examinada (220), permite conocer el comportamiento del ensayo y su vulnerabilidad respecto a las muestras con determinadas características. Esto posibilita un mayor conocimiento acerca de los aspectos sobre los cuales es necesario continuar trabajando, así como advertir a los usuarios sobre el riesgo que puede conllevar, para los resultados, la evaluación de determinados tipos de muestras. Por ello, se recomienda a los fabricantes de pruebas para diagnóstico, el estudio del efecto de sustancias interferentes en sus ensayos (264), ya que los resultados FP pueden traer consecuencias adversas para los pacientes, como por ejemplo, una innecesaria intervención clínica basada en un resultado no real (252).

#### 3.1.10. Establecimiento de la zona gris

En las figuras 3.12 y 3.13 (anexo 11) se graficó la zona gris del ensayo, definida como aquella donde los resultados no pueden clasificarse con certeza como positivos o negativos, o son claros pero no reproducibles. El ancho de la zona gris define la precisión de un ensayo cualitativo, que será mayor a medida que sea más estrecha (24) y se halló entre 0,078-0,122 ng/mL de HBsAg según el EPEI-ad y de 0,2 a 0,261 UI/mL de HBsAg de acuerdo al 1<sup>er</sup> EI-OMS. El valor de discriminación de la prueba, parámetro que no debe confundirse ni con el límite de detección de los ensayos, ni con el NC, fue 0,092 ng/mL y 0,232 UI/mL, según el estándar empleado.

La determinación de la zona gris permitió establecer de manera más rigurosa el nivel de detectabilidad del ensayo, de 0,125 ng/mL y 0,28 UI/mL, según la preparación de referencia utilizada en el estudio. Estas concentraciones de HBsAg se detectaron la totalidad de las veces que se evaluaron y demostraron la correspondencia entre el 1<sup>er</sup> EI-OMS y la preparación de referencia del PEI (acápites 2.1.1.1 y 2.1.1.2).

#### 3.1.11. Estudio de reproducibilidad

Teniendo en cuenta que este ensayo es cualitativo, ya que expresa sus resultados en forma binaria (positivo/negativo), la precisión se calculó en términos de reproducibilidad tal y como lo expresa la Regulación 47-2007 sobre los requisitos para la evaluación del desempeño de los diagnosticadores (220).

Las muestras evaluadas presentaron elevados porcentajes de reproducibilidad todas las veces que se analizaron (tabla 3.7), lo que avaló la confiabilidad del ensayo para los fines del pesquiasaje y el diagnóstico de hepatitis B, que se trazaron con su normalización. El valor ideal para este parámetro es 100% y depende del ancho de la zona gris de la prueba (220), lo cual quedó demostrado, ya que la muestra correspondiente a 0,1 ng/mL de

HBsAg, que se encuentra dentro de la zona gris del ensayo, fue la única que no alcanzó 100% de reproducibilidad. No obstante, sus porcentajes se situaron muy cercanos a esta cifra.

Tabla 3.7 Reproducibilidad del ensayo

Muestras (ng/mL de HBsAg)	Reproducibilidad por día (%)					Reprod. Interdías (%)
	1	2	3	4	5	
CP (3)	100	100	100	100	100	100
CN (0)	100	100	100	100	100	100
M1 (0,1)	92,5	100	95,2	94,8	91,4	94,8
M2 (0,4)	100	100	100	100	100	100
M3 (0,8)	100	100	100	100	100	100

CP: Control positivo M1: Muestra 1  
CN: Control negativo M2: Muestra 2  
M3: Muestra 3

### 3.1.12. Estudios de estabilidad de los componentes y el diagnosticador

La evaluación de la estabilidad de anaquel para los tres lotes del diagnosticador en condiciones de almacenamiento entre 2-8 °C (tabla 3.8, anexo 12), mostró porcentajes de recuperación de las UF del CP superiores a 90% durante todo el estudio, lo que se encontró dentro de los límites permitidos para este tipo de ensayo (24, 221, 222, 266) y posibilitó la obtención de un tiempo de vida útil de 15 meses a partir de su fecha de producción.

La detectabilidad de la prueba, en cada lote de diagnosticador evaluado, se mantuvo en el valor previamente determinado (0,125 ng/mL) durante los 18 meses de estudio, así como la señal óptima del CN, lo cual constituyó otra evidencia de que el estuche mantuvo sus características funcionales estables durante el tiempo analizado.

Se determinó la estabilidad del diagnosticador en condiciones anormales de almacenamiento, para investigar la influencia que los cambios en las condiciones de temperatura de conservación provocaban sobre el desempeño de la prueba y la estabilidad de sus reactivos. Como se observa en la figura 3.14, los estuches conservados entre 30 y 35 °C mostraron una significativa disminución de su estabilidad desde la primera semana de estudio, que decreció a cifras inferiores a 80% de recuperación de la señal fluorescente del CP, inhabilitando el empleo de los diagnosticadores almacenados en estas condiciones, que, además, tampoco fueron capaces de mantener el nivel de detectabilidad del ensayo. Por el contrario, los resultados indican que los diagnosticadores pueden permanecer hasta 15 días conservados a 20-25 °C sin afectación de su estabilidad. A partir de la tercera semana de evaluación, la recuperación decayó hasta valores menores de 80% y no se alcanzó el nivel de detección de la prueba. Este estudio persiguió el objetivo de localizar aquellos factores relacionados, en este caso, con el

almacenamiento y transportación del diagnosticador, que necesitan una atención especial, en tanto originan variaciones significativas en el desempeño de la prueba.

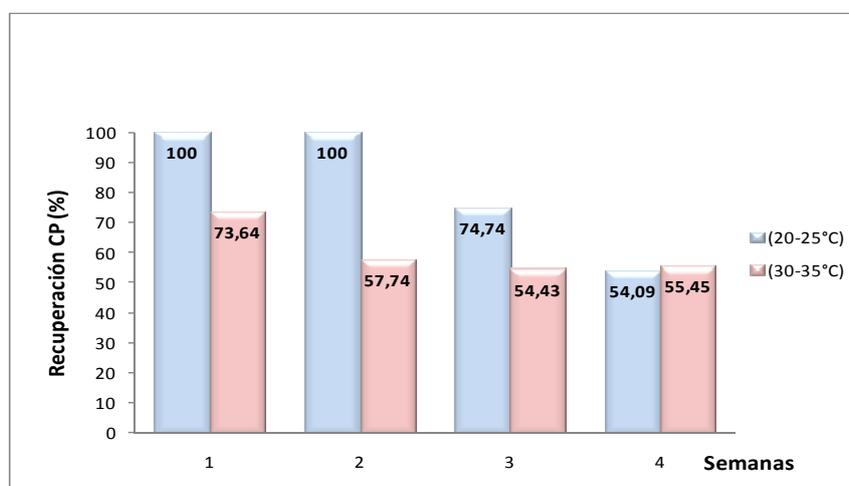


Figura 3.14 Estabilidad del diagnosticador en condiciones anormales de almacenamiento

La estabilidad de los diferentes lotes de componentes, evaluada durante 24 meses, mostró en todos los casos porcentajes de recuperación superiores a 80% para la señal del CP, respecto al tiempo inicial. Estos porcentajes en los lotes de placas recubiertas, conjugado y CP evaluados, osciló entre 93,12 y 100%. En el caso de los AcB, se encontraron entre 84,6 y 97,8%. El CN se mantuvo entre 1 y 4 UF durante los 24 meses de estudio y la detectabilidad de la prueba, ensayada con los diferentes reactivos en evaluación, arrojó el valor esperado. Estos resultados permitieron asignar a los reactivos evaluados un tiempo de vigencia de 18 meses a partir de su fecha de elaboración.

Según los resultados de las pruebas de estabilidad de reutilización aplicadas a los componentes que se presentan listos para el uso (tabla 3.9, anexo 12), todos los reactivos evaluados pueden ser utilizados reiteradamente durante dos meses sin afectación de su estabilidad, siempre y cuando se cumpla con las precauciones establecidas para su manipulación.

### 3.1.13. Evaluación externa del ensayo normalizado

Esta evaluación tuvo como objetivo valorar el comportamiento técnico y de desempeño del ensayo durante la rutina de trabajo de un laboratorio SUMA de certificación de sangre, así como determinar sus características funcionales y realizar un análisis de la reactividad en esta población de estudio, dada la mejor detectabilidad del ensayo sometido a evaluación, respecto al que se empleaba hasta ese momento.

De las 1 278 muestras analizadas, 17 fueron reactivas en el nuevo ensayo y 16 en la prueba de referencia utilizada, por lo que el ensayo en evaluación tuvo un resultado FP (tabla 3.10), en tanto, en la anterior generación de UMELISA se encontró una muestra más con reactividad falsa y dejó de detectar tres muestras cuyas concentraciones de HBsAg se encontraban por debajo de su límite de detección.

Tabla 3.10 Tabla de contingencia del ensayo desarrollado y de la generación anterior de UMELISA frente a la prueba de referencia

UMELISA anterior UMELISA desarrollado	Hepanostika			Total	
	POS		NEG		
POS	13 16	(VP)	2 1	(FP) 17	15
NEG	3 0	(FN)	1 260 1 261	(VN)	1 263 1 261
Total	16		1 262		1 278

POS: Muestras positiva  
 NEG: Muestras negativas.  
 VP: Verdaderos Positivos  
 FP: Falsos Positivos  
 FN: Falsos Negativos  
 VN: Verdaderos Negativos

La E del UMELISA precedente y del ensayo desarrollado se comportó de manera muy similar: 99,84% y 99,92%, respectivamente. No obstante, la S máxima alcanzada por el nuevo ensayo demostró su superioridad cualitativa respecto a la prueba que se utilizaba hasta ese momento.

El ensayo normalizado alcanzó VPP y VPN de 94,1% y 100%, respectivamente. El VPP estuvo influenciado por el pequeño número de muestras VP involucrado en este estudio (16 muestras) y no por la mayor ocurrencia de resultados FP. Esto quedó evidenciado al comparar los resultados con los presentados en el acápite correspondiente a la evaluación de las características funcionales del ensayo (3.1.8), donde se estudiaron 259 muestras VP y el VPP fue de 99,23%. Según el índice de eficacia obtenido (99,92%), la prueba tuvo una alta capacidad para detectar correctamente todas las muestras positivas y negativas, con solo un resultado falso entre 1 278 muestras estudiadas. La concordancia de sus resultados con los de la prueba de referencia fue muy buena (K= 0,97).

A pesar del menor número de muestras positivas en este estudio, respecto a las negativas, los resultados de desempeño de la prueba fueron similares a los obtenidos en la evaluación interna de las características funcionales del ensayo, presentados previamente (acápites 3.1.8). Esto indicó que el proceso de normalización de la prueba fue adecuado, así como el NC establecido, ya que todas las muestras VP se detectaron y el número de resultados FP fue mínimo.

Respecto a la prueba precedente, con el nuevo ensayo se constató un ligero incremento de la reactividad al HBsAg en la población de donantes de sangre estudiada; pero este incremento fue real, debido a su superior detectabilidad y no al aumento de los resultados FP. Mientras que el nuevo ensayo detectó 17 muestras reactivas (1,33%), el UMELISA anterior tuvo una reactividad de 1,17 % al determinar 15 muestras reactivas, de ellas dos FP y no fue capaz de detectar tres VP, con concentraciones de HBsAg inferiores a 0,5 ng/mL.

Las muestras analizadas en el estudio de reproducibilidad mostraron 100% de resultados reproducibles, evidenciando que el NC establecido fue adecuado. La muestra de menor concentración empleada en este estudio (0,125 ng/mL HBsAg), correspondiente al límite de detección del ensayo, se identificó todas las veces.

Los resultados alcanzados demostraron la superioridad funcional y de desempeño del nuevo UMELISA respecto a la generación precedente, que no solo mostró un mayor nivel de S, motivado por su mayor detectabilidad, sino que esto se logró sin afectación de la E, parámetro que se comportó a niveles muy altos a pesar de tratarse de una prueba para pesquiasaje. El ensayo desarrollado presentó, además, una excelente reproducibilidad de sus resultados en la evaluación externa realizada. Este diagnosticador se registró en el mes de julio del año 2000, bajo el nombre UMELISA HBsAg PLUS (anexo 6).

#### 3.1.14. Estudio piloto con el UMELISA HBsAg PLUS

De las 30 727 muestras de donantes de sangre evaluadas en el estudio piloto, 398 resultaron reactivas (1,3%) (figura 3.15, anexo 13), cifra similar a la obtenida durante la evaluación externa de la prueba. De estas 398 muestras reactivas, 324 se analizaron en el Laboratorio de Hepatitis Virales, del CIE, 74 no se sometieron a esta reevaluación debido a su insuficiente volumen, por lo que se excluyeron del estudio.

En la tabla 3.11 se muestran los resultados de las 324 muestras analizadas en el CIE por ambos ensayos (UMELISA HBsAg y UMELISA HBsAg PLUS), las cuales se clasificaron mediante el Hepanostika HBsAg y su prueba confirmatoria. El UMELISA HBsAg no detectó 39 muestras que fueron positivas por el UMELISA HBsAg PLUS, así como por la prueba de referencia y su confirmatorio, todas con valores de fluorescencia correspondientes a concentraciones de HBsAg por debajo del límite de detección de esta prueba. No se observó ningún resultado FN en el UMELISA HBsAg PLUS, que tuvo cuatro muestras FP. La generación anterior de UMELISA tuvo igualmente cuatro FP, que no coincidieron con los encontrados en el nuevo ensayo.

Tabla 3.11 Evaluación de las muestras reactivas del estudio piloto

Muestras evaluadas	UMELISA HBsAg		UMELISA HBsAg PLUS		MicroELISA Hepanostika		Confirmatorio Hepanostika	
	Reac.	No Reac.	Reac.	No Reac.	Reac.	No Reac.	Conf.	No Conf.
324	222	102	261	63	257	67	259	0

En el caso del UMELISA HBsAg PLUS, 19,4% de las muestras reactivas en los laboratorios SUMA de los bancos de sangre participantes en este estudio piloto, no tuvieron similares resultados en el CIE al evaluarse en el mismo ensayo. Se realizó un análisis retrospectivo de las corridas de estas muestras en los bancos de sangre y se comprobó que se trataba de FP no repetibles, todos debidos a contaminación por arrastre, fenómeno que está descrito para este tipo de ensayo y del cual se previene a los usuarios en el instructivo de la técnica. La contaminación por arrastre ocurre cuando muestras con altas concentraciones de HBsAg contaminan las muestras negativas que se encuentran en los pocillos adyacentes, por efecto de un arrastre mecánico durante el procedimiento.

Se realizó un estudio pormenorizado de las cuatro muestras con resultado FP en el ensayo desarrollado, ya que algunas presentaron valores de absorbancia muy cercanos al NC en la prueba de referencia (tabla 3.12, anexo 13), encontrándose que la muestra 2 (M2) fue positiva a otros marcadores de la infección por el VHB (anti-HBc total y anti-HBc IgM) (267, 268), lo que apuntó a que este donante estaba realmente infectado. En el caso de la muestra 4 (M4), se localizó al donante y se le realizó una extracción de sangre, previo consentimiento, un mes después de la primera prueba, resultando otra vez reactivo en el UMELISA HBsAg PLUS, con una señal de fluorescencia superior a la de la prueba inicial. Esta segunda muestra del donante M4 fue también reactiva en el microELISA de referencia y se confirmó como positiva en su prueba confirmatoria.

Ante estos resultados, se realizó el confirmatorio de referencia a las cuatro muestras positivas por el nuevo ensayo y negativas en el Hepanostika HBsAg, hallándose que las muestras M3 y M4 cumplían las dos condiciones de positividad del Hepanostika Confirmatory, por lo que se confirmaron como positivas por este ensayo de neutralización, aún cuando presentaron resultado negativo en su prueba de pesquisaje.

Esto puede deberse a la forma de interpretación de los resultados en la prueba confirmatoria, donde la positividad no se establece tomando como referencia los controles del ensayo, sino comparando los resultados de una muestra contra ella misma, en iguales condiciones de dilución; pero diferentes condiciones de tratamiento

(neutralizada y no neutralizada). Por tanto, puede ser que una muestra con concentraciones de HBsAg en el entorno del nivel de corte, no sea detectada por la prueba de pesquisaje y si por su ensayo confirmatorio.

Por otra parte, es probable que estas muestras se encontraran en la zona gris del ensayo normalizado (0,078-0,122 ng/mL) (acápite 3.1.10), que abarca entre 5 y 95% de positividad, por lo que pudieron dar positivas en la prueba en un determinado porcentaje, en dependencia de la calidad del montaje, aún cuando se encontraran por debajo del límite de detectabilidad establecido (0,125 ng/mL), el cual corresponde a una concentración de HBsAg que está por encima de la zona gris y por tanto será detectada el 100% de las veces que se evalúe. Hepanostika HBsAg informa una detectabilidad de 0,08 ng/mL de HBsAg (258), pero no se conoce si este valor de concentración se encuentra dentro de su zona gris o por encima de ella y de ser una concentración correspondiente a la zona gris del ensayo, estará sujeta a diferentes porcentajes de positividad.

La reactividad al HBsAg en la población estudiada mostró un incremento de 0,12% (tabla 3.13) en el UMELISA HBsAg PLUS, respecto a la anterior generación de ultramicroensayo, lo cual se debió a su elevado nivel de detectabilidad, que permitió la identificación de 39 muestras VP no detectadas en el ensayo precedente debido a que se encontraban por debajo de su límite de detección, mostrando la prueba desarrollada 100% de S.

Tabla 3.13 Reactividad en donantes de sangre para el UMELISA HBsAg PLUS, respecto al UMELISA anterior

Donantes estudiados	UMELISA HBsAg		UMELISA HBsAg PLUS	
	Reactivos	Porcentaje	Reactivos	Porcentaje
30 727	222	0,72	261	0.84

Los excelentes resultados alcanzados durante el estudio piloto con el UMELISA HBsAg PLUS, así como su superior sensibilidad y detectabilidad, respecto al ensayo precedente, demostraron el buen desempeño de esta prueba, así como su mejor adecuación a los requerimientos internacionales para ser utilizada en la certificación de la sangre, la vigilancia epidemiológica y el diagnóstico de la hepatitis B (157, 160). Con el desarrollo de este ensayo se puso a disposición del sistema de salud cubano una prueba de mejores características funcionales para el diagnóstico y pesquisaje de la hepatitis B.

Luego de la obtención de estos resultados, se llevó a cabo la introducción de la prueba en todos los laboratorios SUMA para la certificación de sangre y la vigilancia epidemiológica de la hepatitis B en Cuba. Asimismo, con esta finalidad, comenzó la comercialización internacional del producto en Colombia, Venezuela, Brasil, Bolivia, Argentina, Perú y México.

## 3.2. Normalización de una prueba confirmatoria para el HBsAg en muestras de suero o plasma

### 3.2.1. Selección del principio de la prueba confirmatoria

Para la selección del principio de ensayo se tuvo en cuenta la información existente en la literatura y en los métodos empleados por las compañías que producen esta prueba (20, 269, 270). Se consideraron también las características técnicas del método a seleccionar, su facilidad de ejecución, así como el tiempo y los pasos de la reacción.

La neutralización de los antígenos virales por anticuerpos específicos es un método aceptado desde hace mucho tiempo para demostrar la presencia de un antígeno determinado (185, 188-190) y se puede establecer de diferentes formas, como son: (a) el establecimiento de una competencia por los epítomos del HBsAg, previamente capturado en la fase sólida, entre los anticuerpos neutralizantes y los anticuerpos marcados que forman parte del conjugado, cuando ambos se aplican simultáneamente (185); (b) el efecto bloqueador que pueden ejercer los anticuerpos neutralizantes al ocupar los epítomos del HBsAg que ya reaccionó en la fase sólida, cuando se aplican en un paso previo a los anticuerpos del conjugado y (c) la neutralización en fase líquida, cuando se somete la muestra a una preincubación con los anticuerpos neutralizantes, los cuales, al encontrarse en exceso, ocuparán todos o la mayoría de los determinantes antigénicos presentes en ella, impidiendo que posteriormente el HBsAg sea capturado por los anticuerpos en la fase sólida y, por consiguiente, no se unan los anticuerpos del conjugado (185, 269, 270). Todas estas variantes de neutralización presuponen la realización de la prueba confirmatoria empleando como base el ensayo de pesquisaje, cuya utilización evidencia la reacción antígeno-anticuerpo, permitiendo llegar a conclusiones definitivas sobre la muestra a confirmar.

La prueba confirmatoria desarrollada en este trabajo, se basó en la tercera variante de neutralización y complementa el juego de reactivos UMELISA HBsAg PLUS. Se seleccionó esta variante atendiendo a que su ejecución e interpretación es relativamente más simple, se debe lograr una mayor capacidad inhibitoria al propiciar la neutralización en fase líquida, mediante un tiempo de preincubación de la muestra con la disolución de anti-HBsAg y no implica la inclusión de pasos adicionales a la prueba de pesquisaje, por lo que es adaptable a cualquier principio del ensayo base.

### 3.2.2. Reactivos control y neutralizante

Se seleccionó el conejo para la obtención de los reactivos de la prueba confirmatoria, pues se recomienda que los mismos procedan de una especie animal diferente de las fuentes de obtención de los inmunoreactantes que participan en el ensayo base. Los conejos de la raza Chinchilla, empleados en este trabajo, fueron excelentes

respondedores. Se comenzaron a explotar a los cinco meses de edad y a los dos meses y medio de iniciado el esquema de inmunización, alcanzaron un título de anti-HBsAg de 1:256, por CIEF. Otros ensayos confirmatorios, con un principio similar al de este trabajo, utilizan esta especie como fuente de sus reactivos, con resultados satisfactorios (271).

Los sueros seleccionados para la elaboración de ambos reactivos fueron transparentes, sin agregados, ni signos de hemólisis. No presentaron actividad frente a SNH, ni SNR, en los estudios electroforéticos, lo cual aseguró que no reconocieran elementos de la muestra, ni tuvieran reacción cruzada con las proteínas de ratón, atendiendo a la representatividad de los AcM murinos en el ensayo base.

Los SNCo empleados para la elaboración del Rc no fueron positivos a las pruebas de detección de HBsAg, ni anti-HBsAg, cumpliendo de esta forma con las condiciones requeridas para su uso. Asimismo, los sueros hiperinmunes utilizados en la preparación del Rn, fueron negativos al HBsAg y capaces de inhibir en más de 50% la señal fluorescente de la muestra de 500 ng/mL de HBsAg, sin diluir, evaluada.

#### 3.2.2.1. Selección de la concentración de trabajo del reactivo neutralizante

El Rn debe tener una concentración de anti-HBsAg tal que se encuentre en exceso cuando se enfrente a altos títulos de antígeno, sin necesidad de emplear grandes volúmenes de reactivo, lo cual conllevaría a una dilución excesiva, no deseada, de la muestra. Es por ello que se fijó como condición que fuera capaz de inhibir, al menos al 50%, la fluorescencia de una muestra sin diluir, con concentración de 500 ng/mL HBsAg.

El título menor del Rn capaz de neutralizar esta muestra fue 1:4, determinado por CIEF (tabla 3.14), con el cual se logró inhibir a 84,3% la señal fluorescente de la muestra evaluada. Este título correspondió a 100 000 UI/L de anti- HBsAg, determinado en el UMELISA anti-HBsAg (223). Otras pruebas confirmatorias de similar principio, como Enzygnost HBsAg Confirmatory, de Dade Behring Inc. y Enzymun Confirmatory de Boehringer Mannheim, utilizan concentraciones de anticuerpos en el reactivo neutralizante de 40 000 y 45 000 UI/L, respectivamente (272).

Tabla 3.14 Capacidad inhibitoria del reactivo neutralizante, según su título por contraimmunoelectroforesis

Título del Rn (CIEF)	Inhibición (%)
1:256	98,2
1:128	97,6
1:64	98,4
1:32	96,5
1:16	94,1
1:8	93,3
1:4	84,3
1:2	48,7

Rn: Reactivo neutralizante  
CIEF: Contraimmunoelectroforesis

Este resultado permitió realizar seis diluciones doble seriadas a los sueros hiperinmunes que conformaron el Rn, cuyo título de anticuerpos, por CIEF, era de 1:256. Este proceso de dilución, que se realizó con SNC<sub>o</sub>, es necesario e importante, ya que por una parte elimina el efecto matriz y por otra, permite ahorrar recursos al incrementar los volúmenes de este reactivo específico, facilitando su escalado industrial.

### 3.2.3. Selección de las condiciones del ensayo

#### 3.2.3.1. Selección de la proporción de mezcla óptima de la muestra con los reactivos control y neutralizante

Con las tres proporciones de mezcla de la muestra con los Rc y Rn ensayadas, se lograron porcentajes de inhibición de la señal fluorescente superiores a 85%; pero la proporción 4:1 se desestimó, ya que su volumen total de mezcla (40 µL de muestra + 10 µL de Rc y Rn), resultó insuficiente para realizar todas las operaciones técnicas concernientes a la prueba confirmatoria. Por tanto, se escogió 5:1 como proporción óptima, ya que fue la menor proporción a la cual se alcanzaron los resultados deseados y su volumen fue suficiente para ejecutar el procedimiento de ensayo.

Se trabajó en base a la menor proporción teniendo en cuenta, por una parte, que la muestra sufriera la menor dilución posible con el Rc, de modo que aquellas con bajas concentraciones de HBsAg, cercanas al límite de detección de la prueba de pesquisaje, no se negativizaran en el confirmatorio por efecto de la dilución y por otra, que la concentración final de anti-HBsAg presente en la mezcla fuera suficiente para neutralizar una muestra pura, de 500 ng/mL de antígeno. Otros ensayos comerciales para la confirmación del HBsAg emplean proporciones similares a la seleccionada en este estudio, para mezclar la muestra con los reactivos de confirmación (269-271).

Se decidió evaluar todas las muestras puras y diluidas 1:100, debido a que en la prueba de pesquisaje un número importante de ellas tuvieron valores saturados de fluorescencia, lo cual es proporcional a su concentración de

HBsAg y esto podría provocar que los anti-HBsAg presentes en el Rn no fueran suficientes para neutralizar tales concentraciones de antígeno, provocando que hubiera que repetirle la prueba confirmatoria a un número considerable de muestras.

La mayoría de las pruebas confirmatorias para el HBsAg, disponibles comercialmente, recomiendan diluir solo aquellas muestras que presenten valores de absorbancia superiores a 2,0 en la prueba de pesquiasaje (20, 269-272). Sin embargo, en la literatura se refiere la ocurrencia del “efecto de gancho” en los ensayos tipo sándwich (233, 273), lo cual trae como consecuencia que muestras con concentraciones excesivamente altas de antígeno, se manifiesten débilmente positivas en las pruebas. Esto se debe a que en presencia de una alta cantidad de antígeno, se producen uniones débiles a sitios secundarios de interacción (uniones no específicas) con el anticuerpo de captura, provocando que el antígeno no se fije de manera eficiente y se desprenda eventualmente durante los pasos de reacción. Por consiguiente, el anticuerpo marcado se unirá pobremente al complejo de la fase sólida y la señal fluorescente resultante no será proporcional a la concentración de antígeno presente en la muestra.

En este sentido, Fernando y Wilson, en 1992, estudian la naturaleza del efecto de gancho en los ensayos tipo sándwich de dos pasos y lo atribuyen a la desorción del analito unido, debido a cambios conformacionales después de la reacción de los anticuerpos de captura con varios epítopos del antígeno adsorbido (274). Selby, en 1999, plantea que a pesar de los múltiples intentos en cuanto al diseño de los ensayos, para reducir o eliminar el efecto de gancho; el método más confiable es el análisis de todas las muestras sin diluir y a una dilución adecuada (233).

Estos criterios también se tuvieron en cuenta para tomar la decisión de evaluar todas las muestras en forma pura y diluida, como un modo de prevenir la ocurrencia de resultados FN en la prueba confirmatoria.

### 3.2.3.2. Tiempo y temperatura de reacción de la muestra con los reactivos control y neutralizante

Para el establecimiento de estos parámetros se tuvo en cuenta que el ensayo confirmatorio se utiliza como un complemento de la prueba de pesquiasaje, así como la dinámica y organización del trabajo en los laboratorios SUMA que emplean el UMELISA HBsAg PLUS para la pesquisa de la infección por el VHB, considerando que de sus resultados depende la realización de la prueba confirmatoria. De esta forma, durante el día, los laboratorios realizarían el pesquiasaje y aquellas muestras repetidamente reactivas se mezclarían posteriormente con los reactivos de la prueba confirmatoria, poniéndose a reaccionar de un día para otro, para entonces evaluarse en la siguiente jornada.

Se seleccionó la temperatura de 20 a 25 °C, considerando que el tiempo de reacción era prolongado (16-24 h) y por tanto, sería innecesario introducir pasos de incubación que requirieran temperaturas más altas.

La mayoría de los ensayos confirmatorios revisados utilizan similares condiciones para la preincubación de las muestras con los reactivos de confirmación (269-272), aunque otros utilizan un tiempo menor (189).

#### 3.2.4. Determinación del nivel de corte de la prueba confirmatoria

Todos los cocientes resultantes de la relación de fluorescencia de la muestra de 0,125 ng/mL tratada con el Rn, respecto a la tratada con el Rc (Mn/Mc) se encontraron por debajo de 0,7. Estos valores de relación correspondieron a porcentajes de inhibición de la fluorescencia de la muestra neutralizada, respecto al control, superiores a 30%. La muestra evaluada se confirmó 58% de las veces con porcentajes de inhibición entre 40 y 50% y 38% de las veces sufrió una inhibición de su señal fluorescente entre 50 y 60%. No obstante, en cuatro ocasiones se confirmó con valores entre 30 y 40% de inhibición. Teniendo en cuenta estos resultados, se estableció que el NC de la prueba debía garantizar, al menos, 30% de inhibición de las UF de la muestra neutralizada, con respecto a la control, lo cual se logra si se cumple la siguiente condición:  $Mn \leq 0,7 Mc$ .

La mayoría de las pruebas confirmatorias disponibles establecen como NC 50% de inhibición (269, 270). Sin embargo, existen otras como la de la firma Sorin Biomedica que, al igual que en este estudio, reportan 30% de inhibición como indicativo de positividad (275).

#### 3.2.5. Evaluación de la detectabilidad del ensayo confirmatorio

De acuerdo al NC establecido para la prueba confirmatoria, la totalidad de las muestras evaluadas con concentraciones de HBsAg de 0,125 ng/mL se confirmaron con un promedio en los porcentajes de inhibición de 49% (figura 3.16). Esto garantizó que el ensayo fuera capaz de confirmar todas las veces la presencia de HBsAg en las muestras cuya concentración de este analito se halló al nivel de detección de la prueba de pesquisaje, a pesar de que, en este caso, las muestras sufren una pequeña dilución cuando se mezclan con los reactivos de confirmación. Al evaluar muestras con concentraciones de HBsAg por debajo de 0,125 ng/mL (0,0625 y 0,1 ng/mL), la primera no cumplió en ningún caso la condición de positividad, en tanto la muestra de 0,1 ng/mL fue confirmada 81 de las 90 veces evaluada, lo que representó 90% de resultados confirmados.

Estos resultados en la detectabilidad del ensayo pueden estar relacionados con el procedimiento de interpretación de la prueba confirmatoria, el cual se basa en el establecimiento de una comparación entre los valores de una misma muestra cuando es tratada con el Rn y como referencia, con el Rc. La positividad se establece en base a la relación entre ambos replicados y no como referencia al CP del ensayo, ya que el objetivo

de su uso se limita a garantizar la calidad de la prueba y no a establecer un NC. Es decir, una muestra se compara con ella misma a iguales condiciones de dilución, pero a diferentes condiciones de tratamiento (neutralizada y no neutralizada). De esta manera se minimiza, en gran medida, el efecto que sobre la sensibilidad analítica del ensayo pudiera tener la dilución de la muestra.

Respecto a los paneles de bajo título PHA 105, de título mezclado PHA 204 y de seroconversión PHM 921, de BBI, la prueba fue capaz de confirmar las 9, 22 y 6 muestras, respectivamente, que la prueba de pesquisaje detectó como reactivas (acápite 3.1.7).

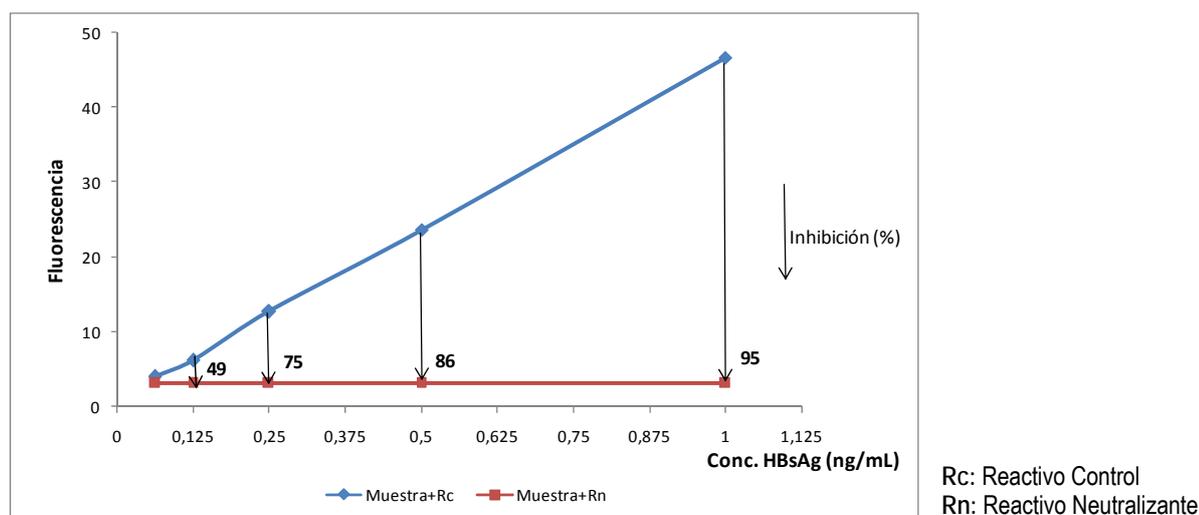


Figura 3.16 Detectabilidad del ensayo confirmatorio

### 3.2.6. Coincidencia de los resultados con la prueba de referencia

No hubo resultados discordantes con la prueba de referencia, lo cual representó 100% de coincidencia entre ambas pruebas. De las 273 muestras evaluadas, 244 confirmaron la presencia de HBsAg tanto por el ensayo en evaluación, como por el de referencia (tabla 3.15), quedando 29 muestras negativas, en las que no se confirmó el HBsAg por ninguno de los dos ensayos.

Tabla 3.15: Resultados de la prueba confirmatoria desarrollada en comparación con el ensayo de referencia

Resultado	Nº de muestras
Confirmadas por ambas pruebas	244
No confirmadas por ambas pruebas	29
Solo confirmadas por SUMA	0
Solo confirmadas por la referencia	0
Total	273

Todas las muestras se analizaron puras y diluidas 1:100 en la prueba confirmatoria desarrollada. De las 244 muestras confirmadas como positivas para el HBsAg, 208 presentaron valores saturados de fluorescencia en la prueba de pesquisaje y de ellas, 97 no fueron neutralizadas puras, sino diluidas 1:100. Por otra parte, se encontraron dos muestras que presentaron efecto de gancho, con valores entre 20 y 30 UF tanto con el Rc, como con el Rn cuando se evaluaron en forma pura; por lo que solo se confirmaron en la variante diluida. Estos resultados apoyan la decisión tomada en cuanto al análisis simultáneo de las muestras tanto sin diluir, como diluidas.

Nueve muestras presentaron valores de fluorescencia cercanos al NC en la prueba de pesquisaje y se neutralizaron en forma pura. Las restantes se confirmaron lo mismo en la variante pura, que en ambas variantes, de acuerdo a su título de HBsAg. Para una mejor comprensión, en la tabla 3.16 (anexo 14) se presentan ejemplos de estos resultados.

De las 261 muestras positivas en el UMELISA HBsAg PLUS, procedentes del estudio piloto, 259 se confirmaron en la prueba de referencia, en tanto, el ensayo desarrollado confirmó la totalidad de estas muestras, por lo que hubo dos resultados discordantes entre ambas pruebas. No obstante, una de estas dos muestras tenía indicios de infección por el VHB, ya que presentaba anti-HBc total e IgM, por lo que probablemente el paciente se encontraba en período de ventana inmunológica de la infección y contenía el HBsAg a muy bajas concentraciones.

Estos resultados avalan la calidad funcional de la prueba desarrollada, así como el adecuado proceso de normalización llevado a cabo, destacándose el establecimiento de su NC. Además, permitieron corroborar que la proporción de mezcla de la muestra con los Rc y Rn seleccionada, fue la adecuada, encontrándose en exceso los anticuerpos neutralizantes en la totalidad de las mezclas realizadas, ya que todas las muestras positivas al HBsAg se neutralizaron, ya fuera puras o diluidas 1:100.

La prueba de referencia utilizada en este estudio goza de gran prestigio, avalado por su empleo para similares fines en diferentes estudios a nivel internacional, por ejemplo, fue el ensayo confirmatorio utilizado por la OMS en el programa para la evaluación del desempeño de las pruebas comerciales disponibles para la detección del HBsAg, realizado entre 2001 y 2004 por parte del Departamento de Tecnologías Esenciales de Salud de esta organización internacional (20, 187).

### 3.2.7. Estudios de estabilidad

La evaluación de la estabilidad de anaquel para los tres lotes del diagnosticador mostró porcentajes de recuperación de la señal fluorescente del CP tratado con el Rc superiores a 91%, lo cual arrojó promedios de este parámetro por encima de 95% durante los 30 meses de estudio (figura 3.17, anexo 14). En todas las evaluaciones realizadas se pudo constatar, además, que la muestra de 500 ng/mL de HBsAg fue neutralizada, en forma pura, con valores de inhibición de su señal fluorescente superiores a 82%, esto evidenció que el RN mantuvo su título de trabajo, de anticuerpos anti-HBsAg, durante todo el tiempo de evaluación. Los resultados alcanzados permitieron obtener un tiempo de vida útil del estuche confirmatorio, de 24 meses a partir de su fecha de producción.

Los resultados de las pruebas de estabilidad de reutilización mostraron que todos los reactivos evaluados pueden ser utilizados reiteradamente durante ocho semanas sin afectación de su estabilidad, siempre y cuando sean cumplimentadas las precauciones establecidas para su manipulación. En la prueba de reutilización del Rn, este fue capaz de inhibir en más de 80% la señal fluorescente de la muestra, sin diluir, de 500 ng/mL de HBsAg durante las ocho semanas de estudio. Igualmente, el CP mezclado con el Rc mostró porcentajes de recuperación de su señal por encima de 90%.

### 3.2.8. Evaluación externa de la prueba confirmatoria

Con esta evaluación se cumplimentó el objetivo de valorar el comportamiento técnico y de desempeño del ensayo durante la rutina de trabajo de un laboratorio SUMA de vigilancia epidemiológica, así como determinar la coincidencia de sus resultados respecto a la prueba de referencia.

De las 400 muestras repetidamente reactivas en el UMELISA HBsAg PLUS, 336 se confirmaron positivas al HBsAg en el ensayo desarrollado y en 64 muestras no se confirmó la presencia del HBsAg, por lo que se consideraron FP de la prueba de pesquiasaje. Estos resultados tuvieron 100% de coincidencia con los obtenidos en la prueba de referencia empleada.

Solo cuatro muestras mostraron valores de fluorescencia cercanos al NC en la prueba de pesquiasaje y se confirmaron como positivas por ambos ensayos. Se encontraron dos muestras con efecto de gancho, que cumplieron la condición de positividad de la prueba confirmatoria cuando se ensayaron diluidas 1:100. Se detectó una muestra que fue necesario diluir por encima de 1:100, ya que su elevada concentración de HBsAg impidió confirmarla por primera vez, pero esta posibilidad se expresa en el instructivo de la técnica y se maneja en el programa de interpretación y procesamiento de resultados, de modo que el usuario recibe la orientación de lo que

debe hacer ante esta situación. En general, en el ensayo desarrollado todas las muestras positivas al HBsAg se neutralizaron puras o diluidas.

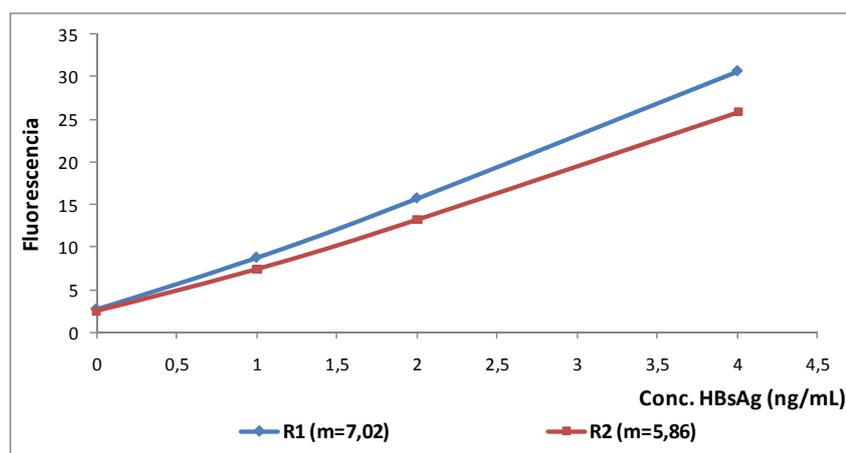
### 3.3. Evaluación del UMELISA HBsAg PLUS para su aplicación a la detección del HBsAg en muestras de sangre seca sobre papel filtro

#### 3.3.1. Selección de las condiciones de elución de las muestras

El volumen de elución empleado fue de 40  $\mu$ L, pues fue el menor volumen aplicado al disco de 5 mm de diámetro, que lo embebió e hizo posible extraer hasta 20  $\mu$ L del eluato para llevar a cabo la reacción. No se ensayaron volúmenes mayores, ya que ello implicaría una mayor dilución del HBsAg presente en la muestra, lo cual reduciría aún más la probabilidad de detectarlo cuando se encontrara a bajas concentraciones.

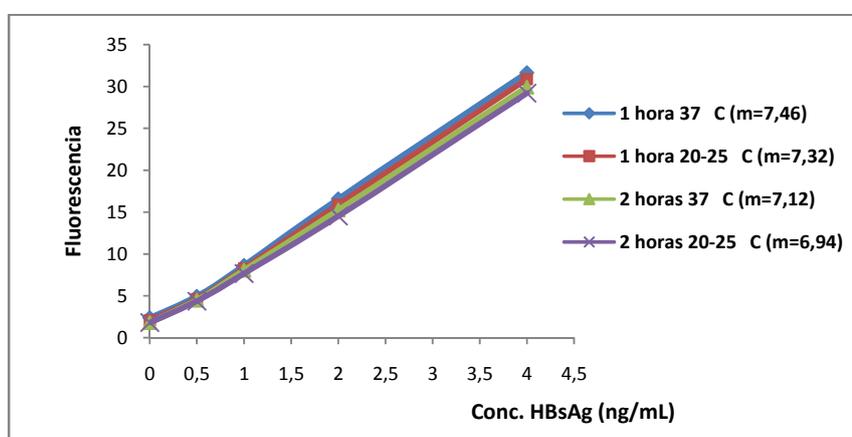
Para seleccionar la disolución eluente a emplear, las muestras de sangre seca utilizadas para este estudio se eluyeron con las dos disoluciones descritas previamente (acápite 2.2.6.2), durante 2 h, entre 20 y 25 °C. La mayor pendiente de la curva estándar se obtuvo para el R1 (figura 3.18). En cuanto a los tiempos y temperaturas de elución, en la figura 3.19 se observa que las curvas estándar tuvieron el mismo comportamiento, independientemente de la condición de elución empleada, mostrando pendientes similares, por lo que se seleccionó 1 h como tiempo de elución por ser el menor de los tiempos evaluados y la temperatura de 20 a 25 °C por ser más aplicable para el trabajo en el laboratorio, al no requerir equipamiento para la incubación en este paso del procedimiento.

Lee y cols., en el 2011, describen un método para la detección del HBsAg en papel de filtro, eluyendo el analito entre 20 y 25 °C. Ellos plantean que este método es particularmente útil para los lugares donde no se puede controlar la temperatura (203). Otros autores, sin embargo, llevan a cabo este paso a 4 °C, alargando el tiempo de elución de las muestras (205). Lo más conveniente es optimizar el tiempo de realización del ensayo y que los pasos introducidos no conlleven el empleo de un equipamiento adicional (refrigeradores o estufas) siempre que sea posible.



R1: Disolución reguladora de lavado del UMELISA HBsAg PLUS  
 R2: Disolución NaCl 0,85% (p/v)  
 m: Pendiente de la curva estándar

Figura 3.18 Evaluación de diferentes disoluciones para la elución de las muestras de sangre seca



m: Pendiente de la curva estándar

Figura 3.19 Evaluación de diferentes condiciones de tiempo y temperatura para la elución de las muestras de sangre seca

El procedimiento técnico del ensayo se mantuvo sin cambio, fue el mismo tanto para las muestras de SSPF, como para las de suero o plasma. Solo fue necesario introducir un paso inicial, correspondiente a la elución de la muestra de sangre seca (figura 3.20, anexo15). Sin embargo, Villar y cols., en 2011, realizan la evaluación de un método para la detección de varios marcadores del VHB, entre ellos el HBsAg, en muestras de SSPF y plantean que fue necesario modificar el ELISA empleado para poder llevar a cabo la evaluación de este tipo de muestra (204).

### 3.3.2. Evaluación del nivel de corte del ensayo

Para determinar el NC del ensayo en las muestras de SSPF, fue necesario tener en cuenta la clasificación recibida por sus homólogas en suero luego de evaluarlas en el ensayo comercial de referencia. De las 1 053 muestras de suero analizadas con el Heparostika HBsAg, 1 045 se clasificaron como negativas y 8 fueron

positivas. Estos resultados se consideraron como verdaderos, a partir de la prueba de referencia utilizada en el estudio.

Procedimientos de análisis similares se aplican por Lee y cols. y Villar y cols., en el año 2011, así como por Forbi y cols., en 2010. Estos autores toman también como referencia los resultados de las muestras homólogas en suero para realizar la evaluación y determinar la aplicabilidad de sus ensayos en muestras de SSPF (203-205).

Al realizar la distribución de frecuencias de la fluorescencia de las muestras de SSPF, normalizada con respecto al CP del ensayo, se observó que 99,43% de la población estudiada se encontraba por debajo del NC establecido para las muestras de suero o plasma  $0,03(CP-CN)+CN$  (tabla 3.17) y seis muestras se encontraron por encima de este valor, las cuales eran homólogas de seis de las ocho muestras de suero previamente clasificadas como VP. Los otros dos VP que no quedaron por encima de este NC, se encontraron entre 0,02 y 0,03 del valor de relación de la distribución.

Tabla 3.17 Distribución de frecuencias para la determinación del nivel de corte del ensayo en papel de filtro

Clases	Frecuencia absoluta	Frecuencia absoluta acumulada	Frecuencia relativa acumulada	(M-CN)/(CP-CN)
0	397	397	37,70	
0,01	613	1 010	95,92	
0,02	32	1 042	98,96	
<b>0,03</b>	<b>5</b>	<b>1 047</b>	<b>99,43</b>	VN(0,022) VN(0,024) FN(0,025) FN(0,027) VN(0,027)
0,04	<b>1</b>	1 048	99,53	<b>VP(0,034)</b>
0,05	0	1 048	99,53	
0,06	0	1 048	99,53	
0,07	0	1 048	99,53	
0,08	0	1 048	99,53	
0,09	<b>1</b>	1 049	99,62	<b>VP(0,081)</b>
0,1	0	1 049	99,62	
0,2	0	1 049	99,62	
0,4	0	1 049	99,62	
0,6	0	1 049	99,62	
0,8	0	1 049	99,62	
1	0	1 049	99,62	
2	0	1 049	99,62	
3	<b>4</b>	1 053	100,00	<b>VP(2,388) VP(2,902)</b> <b>VP(2,902) VP(2,650)</b>

M: Fluorescencia de la muestra

CN: Control negativo

CP: Control positivo

La disminución del NC a 0,02, para las muestras de SSPF, permitiría la detección de estos dos VP; pero con este NC se observó una menor discriminación de las poblaciones de negativos y positivos, lo cual implicaría una afectación importante de la especificidad de la prueba para este tipo de muestra, por lo que se decidió mantener el NC establecido en las muestras de suero o plasma (0,03 (CP-CN) + CN).

La determinación del NC de un ensayo es un parámetro de gran importancia para los resultados futuros de este y se establece tomando en cuenta la S y E que se pretende alcanzar, según los propósitos de la prueba (24). Es por ello que en la determinación del NC se deben usar muestras clasificadas por una prueba de referencia, que preferentemente sea de reconocido prestigio, como la empleada en este estudio. En la selección del NC se debe tener en cuenta, además, que exista una adecuada discriminación entre las muestras positivas y negativas, de modo que garantice la no elevación de los resultados falsos positivos en subsiguientes estudios.

En los ensayos, como el de este trabajo, destinados al pesquisaje y el diagnóstico, se pretende que el valor de S sea el máximo posible, aspecto que por lo general se logra sacrificando la E en cierta medida; pero este sacrificio de la E no debe ser considerable, ya que un ensayo con un número excesivo de resultados FP tampoco es recomendable para las labores de pesquisaje y diagnóstico.

De haber tomado 0,02 como NC para las muestras de SSPF, la S de la prueba no se habría afectado en este estudio y la E tendría una ligera afectación, con tres FP; pero en este valor de relación no se observó una buena discriminación entre las poblaciones de positivos y negativos, hubo 32 muestras VN muy cercanas a 0,02 (tabla 3.17), que potencialmente podrían incrementar el número de FP de la prueba en evaluaciones posteriores, trayendo como consecuencia una afectación importante de su E, por lo que resulta imprescindible hacer un balance integral de estos dos parámetros en el establecimiento del NC.

Por otra parte, desde la propia concepción de la prueba, se conocía que el ensayo para muestras de SSPF tendría afectación de la S, con respecto a las muestras de suero o plasma, debido a la dilución que sufren las primeras para extraer el analito de interés, lo cual afectaría en especial a aquellas con bajas concentraciones de HBsAg y las dos muestras VP que quedaron por debajo del NC que se estableció para SSPF, mostraron valores de absorbancia muy cercanos al NC de la prueba de referencia, lo cual indicó su baja concentración de HBsAg, por lo que el efecto de la dilución en papel de filtro provocó que no se detectaran.

Contrario a estos resultados, otros investigadores pueden variar el NC de la prueba, para su aplicación en el análisis de las muestras de SSPF (203, 204).

3.3.3. Determinación de la detectabilidad del ensayo para muestras de sangre seca sobre papel de filtro El UMELISA HBsAg PLUS, con el valor de corte establecido, fue capaz de detectar concentraciones de HBsAg a partir de 1 ng/mL, según la curva estándar en SSPF elaborada a partir de los EPEI-ad y ay (figura 3.21) y de 2 UI/mL, para aquella preparada por diluciones seriadas del 1<sup>er</sup> EI-OMS (figura 3.22). En ambos casos estas muestras se detectaron todas las veces evaluadas. Estos niveles de detectabilidad para SSPF demostraron la equivalencia informada entre el 1<sup>er</sup> EI-OMS y las preparaciones de referencia del PEI (acápites 2.1.1.1 y 2.1.1.2).

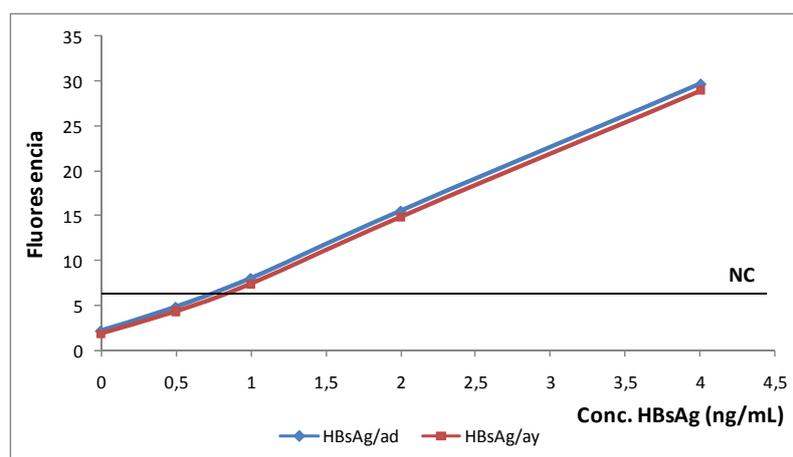


Figura 3.21 Detectabilidad del ensayo en papel de filtro, según los patrones internacionales HBsAg *ad* y *ay* del Instituto Paul Ehrlich

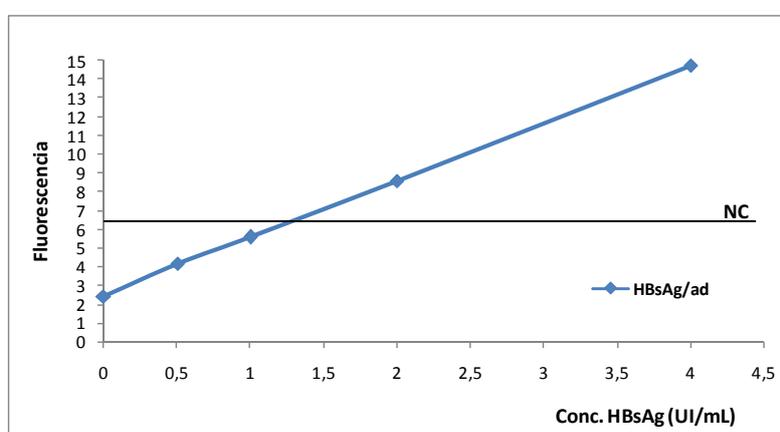


Figura 3.22 Detectabilidad del ensayo en papel de filtro, según el 1<sup>er</sup> Estándar Internacional de la OMS

El diferente nivel de detectabilidad que alcanzó el ensayo para las muestras de SSPF, respecto a las de suero o plasma (0,125 ng/mL y 0,28 UI/mL), se debió a la dilución que es necesario aplicar al disco de sangre seca en el paso de elución, para extraer el HBsAg contenido en él, lo cual influyó directamente sobre la detectabilidad del

ensayo para este tipo de muestra. Este parámetro se mantuvo al máximo nivel posible en el caso de las muestras de suero o plasma, ya que se ensayan sin diluir.

Los resultados de Parkinson y cols., en 1996, coinciden con los presentados en este estudio, referente a que la detección del HBsAg en muestras de SSPF es menor cuando se compara con el plasma (38). También Lee y cols., en 2011, plantean la imposibilidad de detectar, en la modalidad de papel de filtro, muestras con bajas concentraciones del HBsAg (203).

### 3.3.4. Evaluación de las características funcionales del UMELISA HBsAg PLUS para muestras de sangre seca sobre papel de filtro

De las 1 053 muestras de suero evaluadas en el UMELISA HBsAg PLUS, 9 fueron positivas y 1 044 negativas (Tabla 3.18). En la prueba de referencia, se encontraron ocho muestras positivas, por lo que el UMELISA en suero presentó un resultado FP, para 99,9% de E y 100% de S. En las muestras de SSPF el ensayo fue capaz de detectar solo seis de las ocho VP, lo que representó una S de 75%. Sin embargo, en este grupo de muestras la E fue 100%, pues no se encontró ningún FP.

Tabla 3.18 Tabla de contingencia para determinar las características funcionales de la prueba en papel de filtro

UMELISA HBsAg	Hepanostika		Total Suero Sangre Seca
	POS	NEG	
<b>POS Suero</b>	<b>8</b>	<b>1</b>	<b>9</b>
POS Sangre Seca	6 (VP)	0 (FP)	6
<b>NEG Suero</b>	<b>0</b>	<b>1 044</b>	<b>1 044</b>
NEG Sangre Seca	2 (FN)	1 045 (VN)	1 047
<b>Total Suero</b>	<b>8</b>	<b>1 045</b>	<b>1 053</b>
Sangre Seca	8	1 045	1 053

POS: Muestras positivas  
 NEG: Muestras negativas  
 VP: Verdaderos positivos  
 FP: Falsos positivos  
 VN: Verdaderos negativos  
 FN: Falsos negativos

La S que se alcanzó para sangre seca se encuentra íntimamente relacionada con el nivel de detectabilidad del ensayo para este tipo de muestra, que es más alto respecto a las de suero o plasma. Los dos FN en SSPF correspondieron a muestras con concentraciones de HBsAg por debajo de 1 ng/mL. El bajo porcentaje de S también pudo estar influenciado por el reducido número de muestras positivas involucrado en el estudio, que procedían en su totalidad de donantes de sangre, donde la prevalencia de la infección por el VHB es baja. Rodríguez y cols., en 1998 informan, al estudiar muestras de SSPF para la detección de anticuerpos IgM contra el virus de la hepatitis A, una afectación de la S por efecto de la dilución aplicada a este tipo de muestra (276).

El hecho de que la muestra FP en el suero, fuera negativa en sangre seca, se pudo deber también al efecto de la dilución que se aplica a este tipo de muestra. Otros estudios para la detección del HBsAg en muestras de SSPF tampoco detectan resultados FP (37).

A pesar de que el pesquiasaje del HBsAg en muestras de sangre seca no está dirigido a la población de donantes de sangre, sino destinada a estudios epidemiológicos, fue imposible extender la evaluación a población de riesgo bajo vigilancia epidemiológica, por lo engoroso que resultó coleccionar las muestras pareadas de suero y sangre seca en este grupo poblacional, lo cual debía realizarse en las unidades de atención primaria, como policlínicos y médicos de familia. Por tanto, constituye un objetivo de trabajo futuro la evaluación de las características funcionales de la prueba para muestras de SSPF procedentes de los grupos de riesgo. Estudios realizados en donantes de sangre y pacientes seleccionados, de la ciudad de Bombay, donde utilizan este tipo de muestra, evidencian que la prevalencia de portadores del HBsAg en el primer grupo es baja (6%), mientras que, en los pacientes seleccionados el porcentaje es 57% (277).

En el estudio realizado por Forbi y cols., en 2010, sobre la aplicación de muestras de SSPF para la detección del HBsAg en Nigeria, país hiperendémico para el VHB, se evalúan 300 muestras pareadas de suero y papel de filtro, procedentes de una población de riesgo. Se detectan 88 muestras positivas en SSPF, de las 112 que tuvieron este resultado en suero, para una S de 78,6%, cifra similar a la obtenida en este trabajo, a pesar de tratarse de diferentes grupos poblacionales. La E informada por Forbi y cols., también se encuentra afectada (88,6%), contrario a los resultados de este estudio (205).

Otros investigadores obtienen, en estudios de muestras pareadas de suero y sangre seca para la detección del HBsAg, valores de S y E, para este último grupo de muestras, que oscilan entre 96,5-97,6% y 96,7-97,8%, respectivamente (203, 204).

A pesar de la afectación en la S de la prueba para las muestras de SSPF respecto a las de suero, se alcanzaron altos niveles de VPP y VPN, de 100 y 99,8%, respectivamente. Esto significa que la probabilidad de que un individuo sea realmente positivo o negativo es alta, cuando el ensayo en sangre seca da un resultado reactivo o no reactivo, respectivamente. Se obtuvo también muy buena concordancia de los resultados con la prueba de referencia ( $K = 0,85$ ).

Para mejorar la sensibilidad del UMELISA HBsAg PLUS aplicado a las muestras de SSPF sería necesario incrementar aún más la detectabilidad para las muestras de suero o plasma, de modo que la dilución que sufre la muestra en papel de filtro afecte en menor grado la detectabilidad del ensayo para esta variante. Se podrían

ensayar también otras alternativas de elución que incluyan la disminución del volumen, el aumento del número de discos a utilizar o introducir la agitación de las muestras durante el tiempo de elución, entre otras.

A pesar de que el ensayo presentó una menor detectabilidad y por consiguiente, fue menos sensible para las muestras de SSPF, que para las de suero o plasma, es innegable que su aplicación en SSPF tiene la ventaja de constituir un instrumento útil para la realización de estudios epidemiológicos en zonas de difícil acceso o en condiciones de escasos recursos instrumentales o carencia de personal adiestrado para la colecta de las muestras de suero o plasma, por lo que queda a elección de los usuarios de la prueba el tipo de muestra a emplear, de acuerdo con los objetivos del estudio, la disponibilidad de los recursos y las características de la población a investigar.

Otros investigadores que trabajan esta temática, coinciden en las ventajas que desde el punto de vista técnico y económico, tiene el empleo de muestras de SSPF para la detección del HBsAg, las cuales constituyen un método ideal para la realización de estudios masivos en aquellas regiones del mundo con limitados recursos y poco acceso a facilidades para el diagnóstico. Plantean que esto se debe fundamentalmente a las bondades que brinda esta variante para la obtención de la muestra, que al ser un método menos invasivo y que requiere de poca cantidad de sangre, permite una mayor cooperación de los individuos. Por otra parte, los costos de transportación y almacenamiento disminuyen, dado por la estabilidad de este tipo de muestra, que puede permanecer varios días a la temperatura ambiente y necesita de un menor espacio para almacenarse, respecto a las de suero o plasma. (203-205, 278, 279). Manikkavasagan, en 2012, en el Reino Unido, emplea este tipo de muestra para el diagnóstico de hepatitis B en las embarazadas y sus contactos, pudiendo ampliar la cobertura de pesquijaje de 57 a 100%, debido a la mayor cooperación de los individuos, que aceptan someterse al estudio gracias a la forma de obtención de la muestra (278).

No obstante estos criterios, las principales pruebas comerciales disponibles para la detección del HBsAg no ofertan una variante de realización para este tipo de muestra.

### 3.3.5. Evaluación de la estabilidad del HBsAg en muestras de sangre seca sobre papel de filtro

Se obtuvieron 12 tarjetas en sangre seca para cada una de las concentraciones del HBsAg en cada variante (VI y V2) de T y HR a las que se secaron. Los resultados de la media de la fluorescencia para cada muestra y la desviación estándar en el tiempo cero o inicial (2 h después de secadas), se exponen en la tabla 3.19 (anexo 15).

Muchos materiales biológicos son susceptibles a disociaciones inducidas por cambios en la temperatura, por lo que es necesario conocer el efecto que esta puede provocar en su estabilidad, para tomar las precauciones

requeridas en la preparación, transportación y almacenamiento de los mismos. De ahí la importancia de conocer la estabilidad del HBsAg en las muestras de SSPF y los factores que la afectan, ya que puede mediar tiempo desde la toma de la muestra hasta su análisis en la prueba.

La variante de realización del ensayo para este tipo de muestras, constituye una alternativa del mismo recomendada para estudios epidemiológicos en condiciones de limitados recursos de equipamiento e instrumental en la toma de muestra (279), por lo que se hace necesario dotar a los usuarios de la prueba de la información necesaria acerca de la estabilidad del analito contenido en dichas muestras. Por ello, las variantes de temperatura y humedad que se consideraron para el secado de las muestras incluyeron una variante ideal (V1), que no se asemeja a las condiciones imperantes en el terreno generalmente, sino, más bien a las de un laboratorio y una variante ambiental (V2) (en este caso propia de Cuba), seleccionada con el objetivo de observar su influencia en la estabilidad del HBsAg en las muestras de SSPF, tomando en cuenta que condiciones parecidas a esta, serían las imperantes en los estudios de campo para los cuales se recomienda el empleo de muestras de SSPF.

Asimismo, el almacenamiento de las tarjetas de SSPF bajo las cuatro diferentes condiciones de temperatura evaluadas, persiguió el objetivo de aportar la información necesaria, de modo que los usuarios de la prueba conozcan el marco de flexibilidad en que se mueven para la conservación de las muestras y puedan determinar el momento apropiado para su evaluación en los centros de estudio, de acuerdo a las condiciones en que han estado conservadas (204).

En la figura 3.23 (anexo 16) se observa el comportamiento de la estabilidad del HBsAg en cada muestra estudiada, las cuales se conservaron durante seis meses en diferentes condiciones de temperatura, para cada variante de secado empleada (V1 y V2). Para ambas variantes, las tres muestras de concentración conocida se mantuvieron estables durante cinco meses cuando se almacenaron entre 2-8 °C y a -20 °C. Asimismo, las muestras almacenadas de 20 a 25 °C mantuvieron los porcentajes de recuperación de sus UF por encima de 80% hasta los dos meses almacenamiento a esa temperatura, para cualquiera de las dos variantes de secado estudiadas.

Sin embargo, las muestras que se almacenaron entre 30-34 °C mostraron diferentes tiempos de estabilidad en dependencia de las condiciones del secado. Aquellas que se secaron bajo las condiciones de la V1, fueron estables hasta los 30 días de almacenamiento a esa temperatura, en tanto, las que se secaron a 30 °C y 89% de HR, mantuvieron la recuperación de su señal fluorescente por encima de 80%, durante 15 días. El análisis

estadístico realizado mostró diferencias significativas entre ambos grupos de valores de acuerdo con la variante de secado empleada ( $p < 0,05$ ).

Para todas las variantes se observó que durante los períodos de tiempo en que las muestras evaluadas se mantuvieron estables, se detectaron como positivas en el UMELISA HBsAg PLUS independientemente de su temperatura de conservación y sus condiciones de secado. Sin embargo, cuando los porcentajes de recuperación disminuyeron por debajo de 80%, se hicieron indetectables en el ensayo, cualesquiera fuera su concentración de HBsAg.

De acuerdo con estos resultados, las temperaturas de 2 a 8 °C y -20 °C fueron las óptimas para la conservación de este tipo de muestras, lo que coincide con lo reportado por Villa y cols., en 1981, cuando conservan muestras HBsAg positivas a estas temperaturas y observan mejores resultados, con respecto a las conservadas a la temperatura ambiente (37). Resultados similares se obtienen también por Villar y cols., en 2011, donde estudian la estabilidad del HBsAg en SSPF durante seis meses y detectan que las muestras almacenadas entre 20 y 25 °C son estables durante 63 días, en tanto, para las almacenadas a -20 °C observan un tiempo mayor de estabilidad (204).

No obstante, una de las principales utilidades del estudio fue poder determinar la estabilidad del HBsAg en este tipo de muestra, almacenada fuera de condiciones de refrigeración, dato que sin dudas podrá tomarse en cuenta para los estudios de terreno que se decida realizar con esta variante del UMELISA HBsAg PLUS. Así, quedó establecido que el tiempo máximo para conservar las muestras de SSPF a una temperatura ambiente de 30 a 34 °C, sin que el HBsAg contenido en ellas pierda sus propiedades, no debe ser superior a 15 días. Pasado este tiempo, es muy probable que las muestras conservadas a esa temperatura no sean útiles para su evaluación en el ensayo.

#### 3.4. Evaluaciones realizadas a las pruebas desarrolladas. Sus aplicaciones

Los resultados de las evaluaciones internacionales llevadas a cabo al UMELISA HBsAg PLUS se presentan en la tabla 3.20 (anexo 17). En las mismas se alcanzaron niveles de S y E similares a los obtenidos durante las pruebas de normalización del ensayo y en los estudios desarrollados en Cuba, lo que la hace apropiada para los fines que se persiguieron con su normalización, al ser aplicable a las labores de pesquisaje de la infección por el VHB.

Esta nueva generación de UMELISA se incluyó en la evaluación de 70 ensayos comerciales de todo el mundo, dentro de los cuales se encontraron varios de gran prestigio y probada calidad a nivel internacional, que fue

realizada en el Instituto Paul Ehrlich, de Alemania, en el año 2006 y dirigida por el ICBS (280). Esta evaluación de las características funcionales de los ensayos, se caracterizó por un alto nivel de exigencia y en ella se emplearon paneles de muestras procedentes de casi todos los continentes, que abarcaron seis, de los ocho genotipos del virus, así como siete, de los nueve subtipos e incluyeron mutantes del VHB.

En la tabla 3.21 (anexo 18) se presentan los resultados de S y E alcanzados en esta evaluación por algunos de los ensayos comerciales participantes en el estudio. El UMELISA mostró muy buenos resultados, comparables con algunas de las principales pruebas reconocidas internacionalmente. Solo obtuvo un FN y, por el contrario, la E se mantuvo en 100%, por encima de la alcanzada por prestigiosas firmas, como Bio-Rad, Biomérieux y Biokit, entre otras. En general, 17 ensayos alcanzaron una S clínica de 100% y siete tuvieron, al igual que el UMELISA, 99,32%, los restantes obtuvieron valores inferiores de este parámetro. En cuanto a la especificidad, 68,6% de los EIE evaluados alcanzaron valores de 100%.

El UMELISA tuvo una detectabilidad de 0,115 y 0,5 UPEI/mL para los subtipos *ad* y *ay* del PEI, respectivamente y detectó a partir 0,208 UI/mL el subtipo *adw*<sub>2</sub>, del genotipo A, que es el predominante en Cuba. Para los otros genotipos y subtipos evaluados, la detectabilidad osciló entre 0,317 y 1,613 UI/mL, excepto para el subtipo *ayw*<sub>3</sub>, del genotipo D, para el cual se informó una detectabilidad superior a 5 UI/mL (280). Veintitrés EIE tuvieron una sensibilidad analítica promedio igual o inferior a 0,13 UI/mL, lo cual representa el estado del arte actual en la Unión Europea para el pesquijaje de los donantes de sangre (281-283) y un EIE no fue capaz de detectar ninguna de las concentraciones de HBsAg evaluadas. De las 19 pruebas rápidas, 13 no detectaron ninguna de las muestras de concentración conocida de HBsAg y las otras seis tuvieron una detectabilidad entre 1,5 y 4 UI/mL.

Estos resultados, a pesar de ser favorables en sentido general, indican que es necesario seguir trabajando en la mejora continua de la sensibilidad y detectabilidad de la prueba, así como caracterizarla adecuadamente en cuanto a su capacidad para el reconocimiento de mutantes, requisitos que cada vez son evaluados con criterios más estrictos por los organismos internacionales (157, 160, 280).

En la tabla 3.22 (Anexo 18) se presentan evaluaciones de desempeño realizadas en Cuba a la prueba confirmatoria. El diferente porcentaje de confirmación observado entre el total de laboratorios de la Red Nacional respecto a los de Santiago de Cuba, se debe a que en el primer caso están incluidas las labores de desempeño de más de 250 laboratorios. No obstante, estos resultados se ajustan a lo esperado, ya que concuerdan con los datos que se obtuvieron en los estudios realizados durante la fase de normalización y evaluación de la prueba.

En el anexo 19 se presentan algunas de las evaluaciones de desempeño realizadas en laboratorios nacionales a las pruebas cuyo desarrollo se presenta en este trabajo.

Tanto el UMELISA HBsAg PLUS, como su prueba confirmatoria, son los ensayos empleados actualmente en Cuba para la realización de pesquisajes masivos encaminados a la certificación de sangre y la vigilancia epidemiológica de la hepatitis B (284-286). Estos ensayos se aplicaron para apoyar diversos estudios, tanto en Cuba como en otros países, dentro de los cuales se pueden citar: la evaluación de la prevalencia de la hepatitis B en seropositivos al VIH, en hemodializados, así como en trabajadores de la salud (287-291); estudios de inmunogenicidad, seguridad y selección de esquemas de aplicación de la vacuna cubana contra la hepatitis B Heberbiovac HB (292, 293); la certificación de placentas (294); estudios de incidencia de la hepatitis B en pacientes sometidos a tratamiento con citostáticos (295) y en embarazadas venezolanas(296), así como otros grupos de riesgo en este país (297, 298). Estas pruebas se aplicaron también para determinar la frecuencia de hepatitis viral tipo B en adultos y niños con hemopatías malignas (299, 300), así como para la evaluación de la actividad antiviral frente al VHB en plantas medicinales (301).

### 3.5. Consideraciones generales finales

Como resultado de este trabajo, el Sistema Nacional de Salud cubano puede contar con un ensayo basado en la tecnología SUMA (33, 34), que presenta características funcionales acordes a los requerimientos internacionales (157, 160), por lo cual puede ser utilizado para el diagnóstico y vigilancia de la hepatitis B en los donantes de sangre y los grupos de riesgo, empleando muestras de suero o plasma. En este ensayo se introdujeron mejoras que le confirieron mayores niveles de sensibilidad y detectabilidad, con respecto a la generación precedente de ultramicroELISA, manteniendo elevados índices de especificidad. En la tabla 3.23 se resumen las características funcionales y tecnológicas del UMELISA HBsAg PLUS, que lo hacen cualitativamente superior a la generación anterior de UMELISA.

Tabla 3.23 Características funcionales y tecnológicas del UMELISA HBsAg PLUS, respecto a la generación anterior de ensayo ultramicroanalítico

Característica	UMELISA HBsAg	UMELISA HBsAg PLUS
Sistema estreptavidina/biotina	No	Si
AcM de detección	No	Si
Detectabilidad	0,5-1 ng/mL	0,125 ng/mL
Sensibilidad clínica	81,25 - 98,84%	100% (99,32%)
Especificidad clínica	99,44 - 99,84%	99,81 - 99,95%
Nivel de fondo	↑ (<8UF)	↓ (<4 UF)
Incubación sustrato	37 °C	20-25 °C
Uso de muestra de SSPF	No	Si

Los niveles superiores de detectabilidad y sensibilidad clínica de la prueba desarrollada se debieron en gran medida a la introducción, por primera vez en un ensayo de la tecnología SUMA, del sistema amplificador estreptavidina/biotina, combinado con AcM de detección, que sustituyeron mayoritariamente a los AcP usados en la anterior generación de ensayo e independientemente que no abarcaron todas las especificidades necesarias para el reconocimiento de la totalidad de las muestras HBsAg positivas, fueron los responsables de la mejora ostensible en la detectabilidad de la prueba, con respecto al UMELISA precedente. El sistema estreptavidina/biotina, con su capacidad amplificadora, también contribuyó a este resultado, tal y como se informa por otros autores que lo emplean para sus ensayos de HBsAg (26, 29, 31). La utilización de este sistema amplificador propició, además, la disminución de los fondos en el UMELISA HBsAg PLUS, ya que, junto a la elevada especificidad y afinidad por el antígeno ( $K_{af} \sim 10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ ), aportadas por los AcM involucrados en el ensayo, permitió utilizar los reactivos (AcB y conjugado Estrep./FA) a mayores diluciones de trabajo.

La incubación del sustrato entre 20 y 25 °C se introdujo como una mejora operacional del UMELISA HBsAg PLUS, con respecto a la anterior generación de UMELISA, para homogeneizar los procedimientos de los ensayos ultramicroanalíticos empleados para la certificación de sangre y los programas de vigilancia epidemiológica, lo cual evitaría errores al personal que las realiza simultáneamente.

La detectabilidad del nuevo ensayo resultó comparable a la de pruebas comerciales reconocidas internacionalmente, como son: Auszyme monoclonal, de Abbott y Genetic Systems EIA, de Bio-Rad, que informan niveles de detectabilidad entre 0,2-0,7 y 0,1-0,2 ng/mL de HBsAg, respectivamente, en dependencia del

procedimiento de ensayo empleado y utilizan AcM tanto para la captura, como para la detección del HBsAg. Otros ensayos, como el Hepanostika HBsAg Uni-Form II y el Hepanostika HBsAg Ultra, ambos de Biomérieux, que emplean AcM para el recubrimiento; pero el revelado de la reacción es a través de AcP conjugados, reportan una detectabilidad de 0,08 y 0,12 ng/mL de HBsAg, respectivamente. Por otra parte, el Vidas HBsAg Ultra, un ensayo totalmente automatizado, también de Biomérieux, que usa AcM y AcP combinados con el sistema estreptavidina/biotina, informa 0,09 ng/mL de HBsAg como límite de detección (23, 227, 229, 255, 258).

En el 2<sup>do</sup> Reporte del Departamento de Tecnologías Esenciales de Salud, de la OMS, publicado en el año 2004, se plantea que en algunos países el nivel mínimo de detección obligatorio que deben tener los ensayos empleados en la certificación de la sangre es 0,5 ng/mL de HBsAg (20). Sin embargo, en estos momentos la mayor parte de los ensayos comerciales tienen un mejor desempeño, con niveles de detectabilidad alrededor de 0,15 ng/mL (19, 256). Esto repercute en la mejora de la S clínica de los mismos, capaces de reducir el período de ventana inicial de la infección, donde los niveles de HBsAg son muy bajos. De ahí la importancia de contar con pruebas de pesquisaje como la propuesta en este estudio, que es capaz de detectar menores concentraciones de HBsAg, lo cual contribuye al perfeccionamiento del diagnóstico y prevención de la hepatitis B en Cuba.

Por otra parte, en este 2<sup>do</sup> Reporte de la OMS, se informan los datos de S y E alcanzados por cinco ELISAs comerciales disponibles para la detección del HBsAg, durante la evaluación de un panel de 276 muestras de suero procedentes de Asia, África, Europa y América del Sur, caracterizadas en los ELISAs Hepanostika HBsAg Uni-Form II, de Biomérieux y Monolisa HBsAg Plus, de Bio-Rad. Los cinco ensayos (Enzygnost HBsAg 5.0, de Dade Behring; Genedia HBsAg ELISA 3.0, de Green Cross Corp.; Murex HBsAg Version 3, de Abbott-Murex; Equipar HBsAg One Step, de Equipar Diagnostici y Hepalisa HBsAg, de J. Mitra and Co.) son apropiados para aplicarse a las labores de pesquisaje, con niveles de S de 100% y la E entre 98,3 y 100% (20), resultados comparables a los que se obtuvieron en esta investigación.

Los niveles de S y detectabilidad alcanzados con el UMELISA HBsAg PLUS para muestras de suero o plasma, permitieron su aplicación al estudio de muestras de SSPF, lo cual lo convierte en una herramienta útil para la realización de estudios epidemiológicos en zonas de difícil acceso y escasos recursos (203-205, 278, 279), alternativa bien acogida y aplicada en diversos países de la región, donde se comercializa esta prueba.

Por otra parte, el desarrollo y aplicación de una prueba confirmatoria para el HBsAg, permite la implementación de un algoritmo de diagnóstico más seguro y garantiza mayor certeza en los datos epidemiológicos de la infección por el VHB en el país.

Los ensayos de la tecnología SUMA, cuya normalización, evaluación y aplicación se abordaron en este trabajo, fueron empleados como pruebas de referencia para la evaluación del estuche comercial ImmunoLISA, de Orgenics (Israel), así como su prueba confirmatoria. Esta evaluación se llevó a cabo en el año 2008, por el Instituto de Investigaciones Biomédicas, de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y el INDRE, de la Secretaría de Salud de este país (302). El hecho de que estas pruebas hayan sido seleccionadas como referencia por prestigiosas instituciones de salud de México, avala la confiabilidad en sus resultados y desempeño.

La introducción del UMELISA HBsAg PLUS y su ensayo confirmatorio a la Red Nacional de Laboratorios SUMA, permitió el perfeccionamiento del pesquisaje de la infección por el VHB en los donantes de sangre y los grupos de riesgo, como una de las principales acciones para prevenir la transmisión de la hepatitis B en el país y garantizar mayor seguridad en los datos epidemiológicos sobre esta infección.

---

**CONCLUSIONES**

- 1- Se normaliza un ultramicroELISA de nueva generación para la detección del HBsAg en muestras de suero o plasma, basado en la tecnología SUMA, con niveles de sensibilidad y detectabilidad superiores a los ensayos utilizados hasta el momento y resultados similares a los obtenidos con la prueba comercial de referencia empleada, lo cual posibilita incrementar la eficiencia en el diagnóstico y vigilancia de la hepatitis B.
- 2- La prueba confirmatoria normalizada es útil para corroborar los resultados verdaderos positivos y de esta forma establecer un diagnóstico definitivo, con las implicaciones preventivas y terapéuticas que se derivan de esto.
- 3- El procedimiento para la detección del HBsAg en muestras de sangre seca sobre papel de filtro es factible para el pesquisaje de este marcador y puede aplicarse para la realización de estudios epidemiológicos en las zonas de difícil acceso.
- 4- Las características funcionales de las pruebas desarrolladas, determinadas en la fase de normalización, se mantienen durante las evaluaciones externas nacionales e internacionales.
- 5- El registro e introducción del UMELISA HBsAg PLUS y su prueba confirmatoria a la Red Nacional de Laboratorios SUMA, propician, desde 2001, una mejora en el pesquisaje de la infección por el VHB.

---

**RECOMENDACIONES**

- 1- Continuar trabajando en el mejoramiento de la detectabilidad del UMELISA HBsAg PLUS a través de la obtención de nuevos anticuerpos monoclonales para su utilización tanto en la fase sólida, como para la futura sustitución de los anticuerpos policlonales biotinilados y realizar la caracterización epitópica de los anticuerpos monoclonales utilizados en el ensayo.
- 2- Trabajar en el incremento de la detectabilidad de la prueba para muestras de sangre seca sobre papel de filtro, dadas las ventajas del empleo de las mismas y evaluar las características funcionales del ensayo para papel de filtro en muestras de grupos de riesgo de infección por el VHB.
- 3- Determinar la capacidad del UMELISA HBsAg PLUS para el reconocimiento de mutantes del VHB, mediante la evaluación de paneles internacionales comercializados para tales efectos.
- 4- Atendiendo a la experiencia acumulada, valorar la factibilidad de desarrollar, validar e introducir al Sistema Nacional de Salud, un ensayo para la cuantificación del HBsAg, de utilidad en la evaluación de la respuesta al tratamiento.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA. Hepatitis Viruses. In: Jawetz, Melnick, Adelberg, editors. *Medical Microbiology*. 25 ed. International Edition: McGraw-Hill; 2010.
2. World Health Organization. Office of Health Communications and Public Relations. Hepatitis B. rev. October 2008. ed. Geneva: World Health Organization; 2008.
3. Gish RG, Locarnini S. Chronic Hepatitis B: Current Testing Strategies. *Clinical Gastroenterology and hepatology*. 2006; 4:666-676.
4. Report on Carcinogens Background Document for Hepatitis B Virus, 2003.
5. "Hepatitis B". World Health Organization (WHO). Retrieved 2009-09-19. "FAQ about Hepatitis B". Stanford School of Medicine. 2008-07-10. Retrieved 2009-09-19.
6. Terrault N, Roche B, Samuel D. Management of the hepatitis B virus in the liver transplantation setting: a European and an American perspective. *Liver Transpl*. 2005; 11(7):716–32.
7. Bell SJ, Nguyen T. The management of hepatitis B. *Aust. Prescr*. 2009; 23(4):99–104.
8. Vildózola H, Salinas JL. Historia natural de la infección crónica por el virus de la hepatitis B. *Rev. Gastroenterol Perú*. 2009; 29-2:147-157.
9. Nguyen V, Dore G. Chapter 1: Prevalence and epidemiology of hepatitis B. In: Matthews G y Robotin M, editors. *All you wanted to know about hepatitis B: a guide for primary care providers*. Australasian Society for HIV Medicine; 2008. p. 13-23.
10. Marcelin P. Hepatitis B and hepatitis C in 2009. *Liver Int*. 2009; 29(1):1-8.
11. Bonino F, Piratvisuth T, Brunetto MR, Liaw YF. Diagnostic markers of chronic hepatitis B infection and disease. *Antiviral Therapy*. 2010; 3 Suppl 15:35-44.
12. Blumberg BS. The discovery of the hepatitis B virus and the invention of the vaccine: a scientific memoir. *J Gastroenterol Hepatol*. 2002; 17 Suppl 17:S502-3.
13. Lau G, Marcellin P, Peters M. Chronic hepatitis B: a global health problem requiring coherent worldwide treatment strategies. *Hepatol Int*. 2007; 1(2):316-25.
14. Elgouhari HM, Tamimi TAR, Carey WD. Hepatitis B virus infection: Understanding its epidemiology, course, and diagnosis. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*. 2008; 75(12):881-889.

15. Yugi H, Mizui M, Tanaka J, Yoshizawa. Hepatitis B Virus (HBV) screening strategy to ensure the safety of blood for transfusion through a combination of immunological testing and nucleic acid amplification testing- Japanese experience. *Journal of Clinical Virology*. 2006; 36 Suppl 1:856-864.
16. Chevaliez S, Pawlostsky K. Virological techniques for the diagnosis and monitoring of hepatitis B and C. *Annals of Hepatology*. 2009; 8(1):7-12.
17. Locamini S, Hatzakis A, Heathcote J. Management of antiviral resistance in patients with chronic hepatitis B. *Antiviral Ther*. 2004; 9:679-693.
18. Mahoney FJ. Update on diagnosis, management, and prevention of hepatitis B virus infection. *Clin Microbiol Rev*. 1999; 12:351-366.
19. Mühlbacher A, Weber B, Bürgisser, Eiras A, Cabrera J, Tiller F, et al. Multicenter study of a new fully automated HBsAg screening assay with enhanced sensitivity for the detection of HBV mutants. *Med Microbiol Immunol*. 2008; 197:55-64.
20. World Health Organization. Hepatitis B surface antigen assays: Operational characteristics (Phase I), Report 2, 2004.
21. Acosta C, Rodríguez M, Baluja I, Brito, A, Feal S, Bencomo F, et al. Impact of the introduction of high-affinity specific monoclonal antibodies in the improvement of sensitivity and specificity parameters of UMELISA HBsAg PLUS and UMELISA TSH immunoenzymatic techniques. *Hybrid Hybridomics*. 2003; 22(6):389-392.
22. Weber B, Dengler T, Berger, A, Wilhelm, H, Rabenau. Evaluation of Two New Automated Assay for Hepatitis B Virus Surface (HBsAg) Detection: IMMULITE HBsAg and IMMULITE 2000 HBsAg. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003; 41(1):135-143.
23. Biomérieux, MicroELISA system Heparostika HBsAg Ultra, Biomérieux, Boseind 15, 5281 RM, The Netherlands, Ed. 04-2007
24. Ochoa, RF. Bases metodológicas para la evaluación de anticuerpos en ensayos clínicos de vacunas mediante técnicas inmunoenzimáticas. 2da edición ampliada. Finlay Ediciones, 2008.
25. Adler-Storh K, Kendall C, Kennedy RC, Henkel RD, Dreesman GR. Biotin-Avidin-Amplified Enzyme Immunoassay for Detection of Herpes Simplex Virus Antigen in Clinical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 1983; 18(6):329-334.
26. Liu YS, Green A. A monoclonal-antibody Enzyme Immunoassay for detection of Hepatitis B Surface Antigen with Use of a Biotin-Avidin System. *Clin. Chem*. 1985; 31(2):202-205.

27. Pujol FH, Rodríguez I, Devesa M, Rangel-Aldao, R, Liprandi F. A Double Sandwich Monoclonal Enzyme Immunoassay for Detection of Hepatitis B Surface Antigen. *Journal of Immunoassay*. 1993; Issue 1-2, (14):21-31.
28. Tijssen P. Chapter 3: Non-immunologic molecular recognition systems used in immunoassays. In: Burdon RH, van Knippendber PH, editors: *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*. 1st ed. London, Elsevier; 1993. p. 21-37.
29. Yazdani Y, Roohi A, Khoshnoodi J, Shokri S. Development of a Sensitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Hepatitis B surface Antigen Using Novel Monoclonal Antibodies. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*. 2010; 2(4):207-214.
30. Chen D, Kaplan LA. Performance of a New-Generation Chemiluminescent Assay for Hepatitis B Surface Antigen. *Clinical Chemistry*. 2006; 52(8):1592-1598.
31. Weber B, Bayer A, Kirch P, Schlüter V, Schlieper D, Melchior W. Improved Detection of Hepatitis B Virus Surface Antigen by a New Rapid Automated Assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999; 37:2639-2647.
32. Yang J, Kim JH, Kim Y. Comparison of nine different qualitative HBsAg assay kits. *Korean J Lab Med*. 2010; 30(2):178-84.
33. Fernández JL, Bencomo F, Robaina R. El aporte del SUMA a la Salud Pública Cubana. Premio Nacional de Salud. Ciudad de La Habana, 2002.
34. Fernández JL. Generating Appropriate Technologies for Health Equity. *MEDICC Review*. 2009; 23-25.
35. TecnoSUMA. Control de enfermedades infecciosas. [Último acceso diciembre, 2012]. [URL://www.tecnosuma.com/programas\\_nacionales](http://www.tecnosuma.com/programas_nacionales).
36. World Health Organization. Expert Committee on Biological Standardization. WHO Working Group on Hepatitis and HIV Diagnostic Kits, 2003.
37. Villa E, Cartoli R, Bellentani S, Rivasi P, Casolo G, Manenti F. Hepatitis B virus markers on dried blood spots. A new tool for epidemiological research. *J Clin Pathol*. 1981; 34:809-812.
38. Parkinson AJ, McMahon BJ, Zanis L, Lanier AP, Wainwright RB. Detection of alpha-fetoprotein and hepatitis-B surface antigen in blood spotted on filter paper: use as a screen for hepatocellular carcinoma in Alaska Natives. *Arctic Med Res*. 1996; 55(3):123-128.
39. Delahanty A. UltramicroELISA para la detección de HBsAg en muestras de sangre seca sobre papel de filtro [Tesis de Maestría]. Ciudad de La Habana: Universidad de La Habana, Facultad de Biología; 2003.

40. Seeger C, Zoulim F, Mason WS. Hepadnaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Field's Virology*. 5th ed. Philadelphia - New York: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 2979-3028.
41. Harrison T. *Desk Encyclopedia of General Virology*, Boston: Academic Press; 2009. p. 455.
42. Yousry E, Ashor E. Overview on Hepatitis B virus. *Nature and Science*. 2011; 9(3):31-34.
43. Kay A, Zoulim F. Hepatitis B virus genetic variability and evolution. *Virus research*. 2007; 127(2):164-176.
44. Muzio V, Pentón E. El virus de la hepatitis B. En: Padrón G, editor, *Bases moleculares para el estudio de las hepatitis virales*. Ciudad de La Habana: Elfos Scientiae; 1998. p. 119-160.
45. Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B Virus Immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol*. 1995; 13:26-60.
46. Takahashi K, Machida A, Funatsu G. Immunochemical structure of hepatitis B e antigen in the serum. *J. immunol*. 1983; 130:903-2907.
47. World Health Organization. Hepatitis B Fact sheet No 204, 2000 [Last accessed September 2006]; Available from: <http://www.who.int/media centre/factsheets/fs204/en/print.html>
48. Ganem D, Prince AM. Mechanisms of disease. Hepatitis B Virus Infection-Natural History and Clinical Consequences. *The New England Journal of Medicine*. 2004; 11:1118-1129.
49. Li W, Miao X, Qi Z, Zeng W, Liang J, Liang Z. Hepatitis virus X protein upregulates HSP90alpha expression via activation of c-Myc in human hepatocarcinoma cell line, HeG2. *Virology Journal*. 2010; 7:1-45.
50. Ganem D, Schneider RJ, Hepadnaviridae: the viruses and their replication. In Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*, 4<sup>th</sup> ed. Vol. 2. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 2923-69.
51. Zoulim F, Saputelli J, Seeger C. Wood-chuck hepatitis virus X protein is required for viral infection *in vivo*. *Journal Virology*. 1994; 68:2026-30.
52. Pollack JR, Ganem D. Site-specific RNA binding by a hepatitis B virus reverse transcriptase initiates two distinct reactions: RNA packaging and DNA synthesis. *J Virol*. 1994; 68:5579-87.
53. Karayiannis P, Thomas HC. Hepatitis B Virus: General Features. In: Mahy BWJ, Regenmortel MHV, editors. *Encyclopedia of Virology*. Oxford: Academic Press; 2008. p. 350-60.
54. Vyas G, Benedict TS. Hepatitis B virus. Biology, Pathogenesis, Epidemiology, Clinical Description and Diagnosis. In: Specter S, editor. *Viral Hepatitis. Diagnosis, Therapy and Prevention*. Totowa, New Jersey, USA: Humana Press Inc; 1999. p. 35- 63.
55. Klingmüller U, Schaller H. Hepadnavirus infection requires interaction between the viral pre-S domain and a specific hepatocellular receptor. *J Virol*. 1993; 67:7414-22.

56. Gerlish W. Hepatitis B Surface Proteins. *J. Hepatol.* 1991; 13 Suppl 4:S90-S92.
57. Coursaget P, Buisson Y, Bourdil C, Yvonet B, Molinié. Antibody Response to Pre-S1 in Hepatitis B Virus Induced Liver Disease and after Immunization. *Res. Virol.* 1990; 141: 563-570.
58. Gitlin N. Hepatitis B: diagnosis, prevention, and treatment. *Clinical Chemistry.* 1997; 43:8B:1500-1506.
59. Günther S. Genetic variation in HBV infection: genotypes and mutants. *Journal of Clinical Virology.* 2006; 36 Suppl 1:S3-S11.
60. Schaefer S. Hepatitis B virus: significance of genotypes. *J Viral Hepat.* 2005; 12(2):111-24.
61. Scheiblaue H, Nageh EI, Díaz S, Nick S, Zeichhardt H Grunert H, et al. Performance evaluation of 70 hepatitis B virus (HBV) surface antigen (HBsAg) assay from around the world by a geographically diverse panel with an array of HBV genotypes and HBsAg subtypes. *Vox Sanguinis.* 2010; 98:403-414.
62. Ljunggren KK, Miyakawa Y, Kidd AH. Genetic variability in hepatitis. *Journal of General Virology.* 2002; 83:1267-1280.
63. Prince AM, Ikram H, Hopp TP. Hepatitis B virus vaccine: identification of HBsAg/a and HBsAg/d but HBsAg/y subtype antigenic determinants on a synthetic immunogenic peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1982; 70:579-582.
64. Bhatnagar PK, Papas HE, Blum DR, Milich D, Nitecki M. Immune response to synthetic peptide analogues of hepatitis B surface antigen specific for the a determinant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1982; 79: 4400-4404.
65. Norder H, Courouce AM, Magnius LO. Complete genomes, phylogenic relatedness and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology.* 1994; 198(2): 489-503.
66. Shibayama T, Masuda G, Ajisawa A, Hiruma K, Tsuda F, Nishizawa T, et al. Characterization of seven genotypes (A to E, G and H) of hepatitis B virus recovered from Japanese patients infected with human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Medical Virology.* 2005; 76(1):24-32.
67. Schaefer S. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World Journal of Gastroenterology.* 2007; 13(1):14-21.
68. Allain JP. Epidemiology of hepatitis B and genotypes. *Journal of Clinical Virology.* 2006; 32 Suppl 1:36: 812-817.
69. Lindh M, Andersson AS, Gusdal A. Genotypes, variants, and geographic origin of hepatitis B virus large-scale analysis using a new genotyping method. *J Infect Dis.* 1997; 175:1494-7.

70. Danta M. Chapter 3: Hepatitis B virus testing and interpreting tests results. In: All you wanted to know about hepatitis B: a guide for primary care providers. Matthews G, Robotin M, editors. Australasian Society for HIV Medicine, 2008. p. 31-39
71. Kramvis A, Kew M, François G. Hepatitis B virus genotypes. *Vaccine*. 2005; 23(19):2409–23.
72. Summers J, Mason WS. Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell*. 1982; 29:403-15.
73. Chisari FV, Ferrari C. Viral Hepatitis. In Nathanson N, editor. *Viral Pathogenesis*. Philadelphia: Lippincott-Rave; 1997. p. 745-778.
74. Will H, Reiser W, Weimer T. Replication strategy of human hepatitis B virus. *J Virol*. 1987; 61:904-11.
75. Gerlich WH, Lu X, Heerman R. Studies on the attachment and penetration of hepatitis B virus. *J. Hepatol*. 1994; 17:S10-S14.
76. Wang GH, Seeger C. Novel mechanism for reverse transcription in hepatitis B viruses. *J Virol*. 1993; 67:6507-12.
77. Beck J, Nassal M. Hepatitis B virus replication. *World J. Gastroenterol*. 2007; 13(1):48–64.
78. Bruss V. Hepatitis B virus morphogenesis. *World J. Gastroenterol*. 2007; 13(1):65–73
79. Guidotti LG, Chisari FV. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annu Rev Pathol*. 2006; 1:23–61.
80. Wieland S, Thimme R, Purcell RH, Chisari FV. Genomic analysis of the host response to hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101:6669–74.
81. Chisari F, Isogawa M, Wieland SF. Pathogenesis of Hepatitis B Virus Infection. *Pathol Biol (Paris)*. 2010; 58(4):258–266.
82. Chang JJ, Lewin SR. Immunopathogenesis of hepatitis B virus infection. *Immunol Cell Biol*. 2007; 85(1):16-23..
83. Ratnam D, Visvanathan K. New concepts in the immunopathogenesis of chronic hepatitis B: the importance of the innate immune response. *Hepatol Int*. 2008; 2 Suppl.1:12-8.
84. Fairley CK, Read TR. Vaccination against sexually transmitted infections. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2012; 25 (1):66–72.
85. Hepatitis B – the facts: IDEAS-Victorian Government Health Information, Australia. State of Victoria. 2009-07-28. Retrieved 2009-09-19.

86. Alter HJ, Purcell RH, Gerin JL, London WT, Kaplan PM, McAuliffe VJ, et al. Transmission of hepatitis B to chimpanzees by hepatitis B surface antigen-positive saliva and semen. *Infect Immun.* 1977; 16(3):928-33.
87. Gane E, Calder L. Transmission of HBV from patient to healthcare worker. *N Z Med J.* 2008; 15(12):87-8.
88. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Hepatitis B Information for Health Professionals. Atlanta; 2010 [updated 2010; cited 2011 Nov 25]; Available from: <http://www.cdc.gov/hepatitis/HBV/index.htm>.
89. Custer B, Sullivan SD, Hazlet TK, Iloeje U, Veenstra DL, Kowdley KV. Global epidemiology of hepatitis B virus. *J. Clin. Gastroenterol.* 2004; 38(10 Suppl 3):S158–68.
90. Coopstead, Lee-Ellen C. *Pathophysiology.* Missouri: Saunders; 2010. p. 886–887.
91. Hollinger FB, Liang TJ. Hepatitis B Virus. In Knipe DM, editor. *Fields Virology*, 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia - New York: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 2971-3036.
92. Shi Z, Yang Y, Wang H, Ma L, Schreiber A, Li X, et al. Breastfeeding of Newborns by Mothers Carrying Hepatitis B Virus: A Meta-analysis and Systematic Review. *Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine.* 2011; 165(9):837–846.
93. Buddeberg F, Schimmer BB, Spahn DR. Transfusion-transmissible infections and transfusion-related immunomodulation. *Best Practice & Research. Clinical Anesthesiology.* 2008; 22(3) 503–17.
94. Hughes RA. Drug injectors and the cleaning of needles and syringes. *European Addiction Research.* 2000; 6(1):20–30.
95. Sleisenger, MH; Feldman M, Friedman LS. *Fordtran's gastrointestinal and liver disease: pathophysiology, diagnosis, management (8<sup>th</sup> ed).* Philadelphia: Saunders, 2006.
96. Kidd-Ljunggren K, Holmberg A, Bläckberg J, Lindqvist B. High levels of hepatitis B virus DNA in body fluids from chronic carriers. *The Journal of Hospital Infection.* 2006; 64(4):352–7.
97. Redd JT, Baumbach J, Kohn W, Nainan O, Khristova M, Williams I. Patient-to-patient transmission of hepatitis B virus associated with oral surgery. *J. Infect. Dis.* 2007; 195(9):1311–4.
98. de la Osa JA. Protegida la población menor de 31 años contra la hepatitis B aguda. *Granma.* 14 enero 2012; Sect. 1.
99. Ministerio de Salud Pública de Cuba (MINSAP). *Anuario Estadístico de Salud 2010.* La Habana: Ministerio de Salud Pública; 2011.
100. Ministerio de Salud Pública de Cuba (MINSAP). *Anuario Estadístico de Salud 2011.* La Habana: Ministerio de Salud Pública; 2012.

101. Mahoney FJ, Kane M. Hepatitis B vaccine: In Plotkin SA, Orenstein WA, editors. *Vaccines*, 3rd. ed. Philadelphia, W.B. Saunders Company; 1999. p. 158-182.
102. D'Souza R, Foster, GR. Diagnosis and treatment of chronic hepatitis B. *Journal of the Royal Society of Medicine*. 2004; 97:318-321.
103. Pedroso P. Aportes a la evaluación de la vacuna recombinante cubana contra la Hepatitis B [Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Médicas]. La Habana: IPK; 2009.
104. Longo DL, Fauci AS, Harrison TR, Langford CA. *Harrison's gastroenterology and hepatology*. New York: McGraw-Hill Medical; 2010.
105. Fauci AS, Harrison TR. *Harrison's manual of medicine*. 17<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill Medical; 2009.
106. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Chronic Hepatitis B Virus: 2011 Case Definition. Atlanta; 2011 [updated 2011; cited 2011 Nov 25]; Available from: [http://www.cdc.gov/osels/ph\\_surveillance/nndss/casedef/hepatitisbcurrent.htm](http://www.cdc.gov/osels/ph_surveillance/nndss/casedef/hepatitisbcurrent.htm).
107. Lok ASF, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology*. 2007; 45(2):507-39.
108. Sanchez-Tapias JM, Vilar JH, Costa J. Natural history of chronic persistent hepatitis B. Relationship between hepatitis B virus replication and the course of the disease. *J Hepatol*. 1984; 1:15-27.
109. Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, Leu ML, Stevens CE, Szmuness W, et al. Incidence of Hepatitis B virus infections in preschool children in Taiwan. *J Infect Dis*. 1982; 146:198-204.
110. Hyams, K. C. Risk of chronicity following acute hepatitis B virus infection. *Clin. Infect. Dis*. 1995; 20:992-1000.
111. Raimondo G, Pollicino T, Squadrito G. What is the clinical impact of occult hepatitis B virus infection? *Lancet*. 2005; 365:638-40.
112. Fattovich G. Natural history of hepatitis B. *J Hepatol*. 2003; 39:S50-S58.
113. Beasley, RP. Hepatitis B virus. The major etiology of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1988; 61:1942-1956.
114. Liaw, YF, Tai DI, Chu CM, Chen TJ. The development of cirrhosis in patients with chronic type B hepatitis: a prospective study. *Hepatology*. 1988; 8:493-496.
115. Bosch FX, Ribes J, Borrás J. Epidemiology of primary liver cancer. *Semin Liver Dis*. 1999; 19(3):271-85.

116. Yim HJ, Lok AS. Natural history of chronic hepatitis B virus infection: what we knew in 1981 and what we know in 2005. *Hepatology*. 2005; 43:S173-S181.
117. Guirgis M, Zekry A. Chapter 4: Natural history of chronic hepatitis B virus infection. In: Matthews G, Robotin M, editors. *All you wanted to know about hepatitis B: a guide for primary care providers*. Australasian Society for HIV Medicine, 2008. p.40-45.
118. Lai KN, Li PK, Lui SF. Membranous nephropathy related to hepatitis B virus in adults. *The New England Journal of Medicine*. 1991; 324 (21):1457–1463.
119. Gocke DJ, Hsu K, Morgan C, Bombardieri S, Lockshin M, Christian CL. Association between polyarteritis and Australia antigen. *Lancet*. 1970; 2(7684): 1149–53.
120. Liang TJ. Hepatitis B: the virus and disease. *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 2009; 49 Suppl 5: S13–21.
121. Mills J. Viral Infections. In: Parslow TG, Stites DP, Terr AI, Imboden JB, editors. *Medical Immunology*. 10<sup>th</sup> ed. San Francisco: McGraw-Hill; 2001. p. 628-31.
122. Wilkins T, Zimmerman D, Schade RR. Hepatitis B: Diagnosis and Treatment. *American Family Physician*. 2010; 81(8):965-972.
123. Aggarwal R, Ranjan P. Preventing and treating hepatitis B infection. *BJM*. 2004; 529:1080-1086.
124. Dienstag JL. Hepatitis B Virus Infection. *The New England Journal of Medicine*. 2008; 359(14):1486-1500.
125. World Health Organization. Dept. of Immunization Vaccines and Biologicals. *Documenting the impact of Hepatitis B immunization: best practices for conducting a serosurvey*. Geneva: World Health Organization; 2011.
126. Beasley RP, Hwang LY, Stevens CE, Lin CC, Hsieh FJ, Wang KY, et al. Efficacy of hepatitis B immune globulin for prevention of perinatal transmission of the hepatitis B virus carrier state: final report of a randomized double-blind, placebo-controlled trial. *Hepatology*. 1983; 3:135–141.
127. World Health Organization. Office of Information. *Hepatitis B vaccine set for introduction into national immunization programmes*. Geneva: World Health Organization; 1992.
128. Galban E, Bravo JR, Castañeda C, Toledo G, Gonzalez A, Delgado MG. Field trial of the Cuban recombinant vaccine against hepatitis B (Heberbiovac HB). Study in newborn infants born to AgsHB+ mothers. *Rev Cubana Med Trop*. 1992; 44(2):149-57.
129. Gonzalez M, Cinza Z, Ortega A, Gali MM, Santoyo ME, Garcia G, et al. A comparative study between different regimens for administering 2 doses of the Cuban anti-hepatitis B vaccine. *Rev Cubana Med Trop*. 1998; 50(3):218-20.

130. Ochoa RF. Inmunoepidemiología y estrategias de vacunación. Segunda ed. Ciudad de la Habana: Finlay Ediciones; 2008.
131. Schaefer S. Hepatitis B virus genotypes in Europe. *Hepatol Res.* 2007; 37 Suppl 1:S20-S26.
132. Alter MJ. Epidemiology and prevention of hepatitis B. *Seminars in liver disease* 2003; 23(1):39–46.
133. Zuckerman AJ. Effect of hepatitis B virus mutants on mutants on efficacy of vaccination. *Lancet.* 2000; 355:1382-1384.
134. Ljunggren KK, Miyakawa Y, Kidd AH. Genetic variability in hepatitis B viruses. *Journal of general Virology.* 2002; 83:1267-1280.
135. Comunicación personal: Dr. Héctor Vega, Instituto Nacional de Gastroenterología, 2008.
136. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Hepatitis B, Acute: 2011 Case Definition. Atlanta; 2011 [updated 2011; cited 2011 Nov 25]; Available from: [http://www.cdc.gov/osels/ph\\_surveillance/nndss/casedef/hepatitisB\\_AcuteCurrent.htm](http://www.cdc.gov/osels/ph_surveillance/nndss/casedef/hepatitisB_AcuteCurrent.htm).
137. Chen CJ, Yang H, Iloeje, UH. Reveal-HBV Study Group. Hepatitis B virus and levels and outcomes in chronic hepatitis B. *Hepatology.* 2009; 49 Suppl 5:S72-S84.
138. Hui CK, Leung N, Yuen ST. Natural history and disease progression in Chinese chronic hepatitis B patients in immune-tolerant phase. *Hepatology.* 2007; 46:395-401.
139. Papatheodoridis GV, Manesis EK, Manolakopoulos FH. Is there a meaningful serum hepatitis B virus DNA cutoff level for therapeutic decisions in hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B virus infection? *Hepatology.* 2008; 48:1451-1459.
140. Liaw YF, Chu CM. Hepatitis B virus infection. *Lancet.* 2009; 373:582-592.
141. Hiris KR, Dighe AS. Laboratory Testing for Viral Hepatitis. *Am. J. Clin. Pathol.* 2002; 118 Suppl 1:S18-S25.
142. Japhet MO, Adesina OA, Donbraye E, Adewumi MO. Hepatitis B Core IgM antibody (anti-HBcIgM) among hepatitis B Surface antigen (HBsAg) negative blood donors in Nigeria. *Virology.* 2011; 8:513.
143. Niederau C, Heintges T, Lange S, Goldmann G, Niederau CM, Mohr L, et al. Long-term follow-up of HBeAg-positive patients treated with interferon alfa for chronic hepatitis B. *N Engl J Med.* 1996; 334(22):1422-7.
144. Kudesia G, Wreghitt T. Hepatitis B and D viruses. In: *Clinical and Diagnostic Virology.* New York: Cambridge University Press; 2009.
145. Ouchterlony O. Diffusion in gel methods for immunological analysis. *Prog Allergy.* 1958; 5:1.

146. Margni RA. Capítulo 10: Reacción antígeno-anticuerpo *in vitro*. Interacción secundaria. En: Margni RA, editor. Inmunología e Inmunoquímica, 4ta edición, Editorial Médica Panamericana S.A.; 1989. p. 213-253.
147. Schable CA, Maynard R. Serodiagnosis of acute hepatitis B virus infection by a modified competitive binding radioimmunoassay. *Journal of Clinical Microbiology*. 1982; 16(5):973-975.
148. Yalow RS, Berson SA. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature*. 1959; 184:1648-1649.
149. Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay for immunoglobulin G. *Immunochem*. 1971; 8:871-874.
150. Van Weemen, BK, Schuurs, AHW. Immunoassay using antigen enzyme conjugates, *FEBS Letters*. 1971; 15,232-236.
151. Pico MC, Geraldino IG, Otero A. *Inmunología Experimental*. La Habana: Editorial Félix Varela; 1997.
152. World Health Organization. Hepatitis B surface antigen assays: Operational characteristics (Phase I), Report 1, 2001.
153. Navarro D, García A, Orta N. Diagnóstico de la infección por el virus de la hepatitis B: Reactividad Aislada del antígeno de superficie. *Control de Calidad, SEIMC*, 2008.
154. Gerken G, Gerlich WH, Bréchet C, Thomas H, Bonino F. Biological Standards for Hepatitis B Virus Assay. *J. Hepatol*. 1992; 15:251-255.
155. Parry Y, Kulit T, Bayer EA, Wilchek M, Livnah O. Ligand exchange between proteins-Exchange of biotin and biotin derivated between avidin and streptavidin. *J Biol Chem*. 2002; 277(34):30 892-30 900.
156. Laitinen OH, Hytonen VP, Ahlroth MK, Pentikainen OT, Gallagher C, Nordlund HR, et al. Chicken avidin-related proteins show altered biotin-binding and physico-chemical properties as compared with avidin. *Biochemical Journal*. 2002; 363(Pt 3):609-617.
157. Directive 98/79/EC of European Parliament and the Council of commission decision of 27 November 2009 amending Decision 2002/EC on common technical specification for *in vitro* diagnostic medical devices. *Official Journal of the European Union L318/25*, 2009.
158. WHO Consultation on Global Measurement Standard and their use the *in vitro* Biological Diagnostic Field, Report, Geneva, Switzerland, 7-8 June 2004.

159. Ferguson M, Seagroatt V, Schild K. Proposed International Reference preparation for hepatitis B surface antigen. World Health Organization. Expert Committee on biological Standardization (WHO/BS/85.1476 Rev. 1), Geneva, 12-18 November 1985.
160. Development of WHO Biological Reference Preparations for Blood Safety-related *in vitro* Diagnostic Tests. Report of the 2<sup>nd</sup> meeting with the WHO Collaborating Centers for Biological Standards and Standardization, 17-18 February 2009.
161. Ferguson M, Health A, Lelie N, Nubling M, Nick S, Gerlich W, et al. WHO Working Group on Hepatitis and HIV Diagnostic Kits : report of a collaborative study to 1) assess the suitability of candidate replacement international standard for HBsAg and a reference panel for HBsAg and 2) to calibrate the candidate standard in IU. Geneva: World Health Organization; 2003.
162. Budkowska A, Dubreuil P, Gerlich WH. Occurrence of pre-S1 antigen in viremic and nonviremic carriers of hepatitis B surface antigen. J Med Virol. 1988; 26:217-225.
163. Min J, Hoon S. Quantification of HBsAg: Basic virology for clinical practice. World Journal Gastroenterology. 2011; 17(3):283-289.
164. Ma H, Yang RF, Wei L. Quantitative serum HBsAg and HBeAg are strong predictors of sustained HBeAg seroconversion to pegylated interferon alfa-2b in HBeAg-positive patients. J Gastroenterol Hepatol. 2010; 25(9):1498-506.
165. Kohmoto M, Enomoto M, Tamori A, Habu D, Takeda T, Kawada N, et al. Quantitative detection of hepatitis B surface antigen by chemiluminescent microparticle immunoassay during lamivudine treatment of chronic hepatitis B virus carriers. J Med Virol. 2005; 75(2):235-9.
166. Yu ML, Lee CM, Chuang WL, Lu SN, Dai CY, Huang JF, et al. HBsAg profiles in patients receiving peginterferon alfa-2a plus ribavirin for the treatment of dual chronic infection with hepatitis B and C viruses. J Infect Dis. 2010; 202(1):86-92.
167. Cai W, Xie Q, An B, Wang H, Zhou X, Zhao G, et al. On-treatment serum HBsAg level is predictive of sustained off-treatment virologic response to telbivudine in HBeAg-positive chronic hepatitis B patients. J Clin Virol. 2010; 48(1):22-6.
168. Manesis EK, Hadziyannis ES, Angelopoulou OP, Hadziyannis SJ. Prediction of treatment-related HBsAg loss in HBeAG-negative chronic hepatitis B: a clue from serum HBsAg levels. Antivir Ther. 2007, 12(1):73-82.

169. Ozaras R, Tabak F, Tahan V, Ozturk R, Akin H, Mert A, et al. Correlation of quantitative assay of HBsAg and HBV DNA levels during chronic HBV treatment. *Dig Dis Sci*. 2008; 53(11):2995-8.
170. Brunetto MR. A new role for an old marker, HBsAg. *J Hepatol*. 2010; 52(4):475-7.
171. Chan HL, Thompson A, Martinot-Peignoux M, Piratvisuth T, Cornberg M, Brunetto MR, et al. Hepatitis B surface antigen quantification: why and how to use it in 2011 - a core group report. *J Hepatol*. 2011; 55(5):1121-31.
172. Blood Products Advisory Committee, 100<sup>th</sup> Meeting, April 28, 2011, Gaithersburg. MD.
173. Carman WF, Zanetti AR, Karayiannis P, Waters J, Manzillo G, Tanzi E, et al. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet*. 1990; 336:325-329.
174. Weber B. Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact. *J Clin Virol*. 2005; 32:102-112.
175. Zanetti AR, Tanzi E, Manzillo G, Maio G, Sbreglia C, Caporaso N, et al. Hepatitis B variant in Europe. *Lancet*. 1998; ii:1132-1133.
176. Gunther S, Fischer L, Pult I, Sterneck M, Will H. Naturally occurring variants of hepatitis B virus. *Adv Virus Res*. 1999; 52:25-137.
177. Ocana S, Casas ML, Buhigas I, Lledo JL. Diagnostic strategy for occult hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol*. 2011; 17(12):1553-1557.
178. Urbani S, Fagnoni F, Missale G, Franchini M. The role of anti-core antibody response in the detection of occult hepatitis B virus infection. *Clin Chem Lab Med*. 2010; 48:23-29.
179. Hollinger FB, Sood G. Occult hepatitis B virus infection: a covert operation. *J Viral Hepat*. 2010; 17:1-15.
180. González R, Torres P, Castro E, Barbolla L, Candotti D, Koppelman M, et al. Efficacy of hepatitis B virus (HBV) DNA screening and characterization of acute and occult HBV infections among blood donors from Madrid, Spain. *Transfusion*. 2010; 50:221-230.
181. Hodinka RL. Chapter 8: Diagnosis of viral hepatitis. In: Steven Specter, editor. *Viral Hepatitis: Diagnosis, Therapy, and Prevention*. Totowa, New Jersey: Human Press; 1999. p. 238-247
182. Durgadevi S, Dhodapkar R, Pirija SC. Serological and molecular diagnosis of hepatitis B virus. *BMC Infection Disease*. 2012; 12 Suppl 1:31.
183. Valsamakis A. Molecular Testing in Diagnosis and Management of Chronic Hepatitis B. *Clinical Microbiology Reviews*. 2007; 20(3):426-439.

184. Liu J, Chen L, Xu J, Guo JX, Song YJ. Establishment of confirmatory test for HBsAg in serum of coexistence of hepatitis B surface antigen and antibodies to HBsAg. Chinese journal of experimental and clinical virology. 2011; 25 (6):492-494.
185. Orgel M, Yaari A, Sarov B, Bar-Shany S, Karakis I. HBsAg confirmation: an experimental test Clinical and Diagnostic Virology. Aug 1996; 6(2-3):155-162.
186. Ling CM, Decker RH, Foemmel RS, Overby LR. Comparison of confirmation methods for hepatitis-B antigen and the nature of false-positives detected by 125I-immunoglobulins. J Lab Clin Med. 1975; 86(4):690-9.
187. Sangaré L, Sombié R, Ouedraogo T, Sanou I, Bambara A. Importance of the confirmatory assay for the detection of the HBsAg in the epidemiological studies and in the diagnosis of the viral hepatitis B. Afr J Clin Exper Microbiol. 2011; 12(1):44-48.
188. Chu FY, Su FH, Cheng SH, Lin YS, Li CY. Hepatitis B surface antigen confirmatory testing for diagnosis of hepatitis B virus infection in Taiwan. Journal of medical virology. 2011; 83(9):514-1521.
189. Halbert SP, Anken M. Detection of hepatitis B surface antigen (HBsAg) with use of alkaline phosphatase-labeled antibody to HBsAg. The Journal of infectious diseases. 1977; 136 Suppl 1:318-323.
190. Ly D, Yee HF, Brezina M, Martin P, Gitnick G. Hepatitis B surface antigenemia in chronic hemodialysis patients: effect of hepatitis B immunization. The American journal of gastroenterology. 2002; 97(1):138-141.
191. González A. Antígeno de Australia y anticuerpos: características, importancia de su estudio en nuestro país. Metodología de obtención. Trabajo presentado en la Primera Exposición Nacional de Forjadores del Futuro, La Habana, 1976.
192. Castro Z. Obtención de inmunoseros xenógenos anti HBsAg mediante diferentes preparaciones inmunogénicas [Trabajo de Terminación de Residencia]. Ciudad de La Habana, ISCMH, ICBP "Victoria de Girón", Departamento de Inmunología, 1985.
193. Vingut JL. Determinación del antígeno de superficie del virus productor de la hepatitis viral B (HBsAg) en muestra de sangre desecada, por ELISA, en el personal trabajador de círculos infantiles de Ciudad Habana. [Trabajo de Terminación de Residencia]. Ciudad de La Habana, ISCMH, ICBP "Victoria de Girón", Departamento de Inmunología, 1983.
194. Prevalencia del antígeno de superficie de la hepatitis viral tipo B (HBsAg), en trabajadores de los servicios estomatológicos de la provincia de Ciudad de La Habana, 1982. [Trabajo de Terminación de Residencia]. Ciudad de La Habana, ISCMH, ICBP "Victoria de Girón", Departamento de Inmunología, 1983.

195. Guntiñas MV. Normalización de ELISA para la determinación en suero del antígeno de superficie del virus productor de la hepatitis B. [Trabajo de Terminación de Residencia]. Ciudad de La Habana, ISCMH, ICBP "Victoria de Girón", Departamento de Inmunología, 1985.
196. Regulación No. 20-2004: Buenas Prácticas de Fabricación para Diagnosticadores, CECMED, 2004.
197. Valdivia I, Silva C, Fajardo E, Trujillo J, Kautzman M, Melchor A, et al. UltramicroELISA monoclonal para la detección del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (Póster BSA-1). Resúmenes de la II Jornada Nacional de Laboratorios de Diagnóstico SUMA, Las Tunas, Cuba, 6 al 9 de junio de 1990.
198. Behets F, Kashamuka M, Pappaioanou M, Green TA, Ryder R, Batter V, et al. Stability of human immunodeficiency virus type 1 antibodies in whole blood dried on filter paper and stored under various tropical conditions in Kinshasa, Zaire. *J Clin Microbiol.* 1992; 30(11):1179-1182.
199. Gupta BP, Jayasuryan N, Jameel S. Detection of hepatitis B virus from dried blood spots by polymerase chain reaction amplification. *J Clin Microbiol.* 1992; 30(8):1913-1916.
200. Bond WW, Favero MS, Petersen NJ, Gravelle CR, Ebert JW, Maynard JE. Survival of Hepatitis B Virus After Drying and Storage for One Week. *Lancet.* 1981; 1:550-551.
201. Farghaly AM, Kotkat AM. Study of the sensitivity of blood spotted on filter paper in the detection of HBsAg and anticore using ELISA technique. *J Egypt Public Health Assoc.* 1990; 65(3-4):391-400.
202. Farzadegan H; Noori KH, Ala F. Detection of hepatitis B surface antigen in blood and blood products dried on filter paper. *Lancet.* 1978; i:362-363.
203. Lee CE, Ponnampalavanar S, Syed OSF, Mahadeva S, Ong LY, Kamarulzaman A. Evaluation of the dried blood spot (DBS) collection method as a tool for detection of HIV Ag/Ab, HBsAg, anti-HBs and anti-HCV in a Malaysian tertiary referral hospital. *Ann Acad Med Singapore.* 2011; 40(10):448-453.
204. Villar LM, de Oliveira JC, Cruz HM, Yoshida CFT, Lampe E, Lewis-Ximenez LL. Assessment of dried blood spot samples as a simple method for detection of hepatitis B virus markers. *J. Med. Virol.* 2011; 83:1522-1529.
205. Forbi JC, Obagu JO, Gyar SD, Pam CR, Pennap GR, Agwale SM. Application of dried blood spot in the sero-diagnosis of hepatitis B infection (HBV) in an HBV hyper-endemic nation. *Ann Afr Med.* 2010; 9:44-5.
206. Fathy N, Abadeer M, El-Taher S. Hepatitis B virus DNA can be amplified directly from dried blood spot on filter paper. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology.* 2012; 8(2):143-149.

207. PNO-08-009: Procedimiento para la reconstitución del Estándar Internacional y la producción del Estándar secundario de referencia para el ensayo UMELISA HBsAg Plus, Edición No. 1, 05/2005.
208. Boston Biomedica, Inc. PHA105: HBsAg Low Titer Performance Panel. 375 West Street, West Bridgewater, MA 02379, USA, September 1998; P1.
209. Boston Biomedica, Inc. PHA204: HBsAg Mixed Titer Performance Panel. 375 West Street, West Bridgewater, MA 02379, USA, September 1998; P1.
210. Almagro I, Agraz A, Fernández de Cossio ME, Lugo V, Duarte CA. Purificación del AgsHB-r por cromatografía de inmutofinidat. Estudio de los AcMs CB-HEP-1 y CB-HEP-3. *Bioteconología Aplicada*. 1994; 11(2):175-179.
211. Pentón E, Muzio V, González M. The hepatitis B (HBV) infection and its prevention by a recombinant-DNA viral surface antigen (rec-HBsAg) vaccine. *Bioteconología Aplicada*. 1994; 11(1):1-11.
212. Kautzman M, Melchor A, Fajardo E, Valdivia I, Victor O. Purificación del virus de la hepatitis B a partir de suero humano para la obtención de antisueros específicos (Póster BIO-03). Resúmenes de la II Jornada Nacional de Laboratorios de Diagnóstico SUMA, Las Tunas, Cuba, 6 al 9 de junio de 1990.
213. Fredriksson UB, Fägerstam LG, Cole AWG, Waldén E. Automated Protein A Sepharose CL-4B affinity purification of IgG monoclonal antibodies from mouse ascites. Poster 787 presented at "The 6<sup>th</sup> International Congress of Immunology", Toronto, July 6-11, 1986, Canada.
214. Melchor A, Kautzman M, Fajardo E, Valdivia I, Victor O. Purificación de anticuerpos contra el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) por cromatografía de afinidad (Póster BIO-02). Resúmenes de la II Jornada Nacional de Laboratorios de Diagnóstico SUMA, Las Tunas, Cuba, 6 al 9 de junio de 1990.
215. Beatty J, Beatty B, Vlahos W. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay. *J Immunol Methods*. 1987, 100:173-179.
216. Roohi A, Khoshnoodi J, Zarnani AH, Shorkri F. Epitope Mapping of Recombinant Hepatitis B Surface Antigen by Murine Monoclonal Antibodies. *Hybridoma*. 2005, 24(2):71-77.
217. PNO II-01-04: Procedimiento para la producción del Control Negativo del UMELISA HBsAg PLUS, Edición 2, CIE, 2009.
218. PNO II-01-05: Procedimiento para la producción del Control Positivo del UMELISA HBsAg PLUS, Edición 2, CIE, 2009.
219. Avrameas S, Ternynck T. *Immunochemistry*. 1969; 6, 43.

220. Regulación No. 47-2007. Requisitos para la evaluación del desempeño de los diagnósticos, República de Cuba, MINSAP, CEDMED, 2007.
221. Norma cubana (NC-EN 13640): Estudios de estabilidad de diagnosticadores. República de Cuba, MINSAP, CEDMED, 2004.
222. Regulación No. 8-2001: Requisitos generales para el registro de los diagnosticadores. República de Cuba, MINSAP, CEDMED, 2001.
223. Rodríguez L, Balmaseda A, Bravo J Trujillo J. Validation of a ultramicroELISA for detecting antibodies against hepatitis B surface antigen. *Rev Cubana de Med Trop.* 1996; 48(1):45-49.
224. Lee RG. Anemia: A diagnostic strategy. In: Williams & Wilkins, editors. *Wintrobe's Clinical Hematology*. 10th. ed. Baltimore; 1998. p. 908-940..
225. Davidson I, Malkinson M, Strenger C, Becker Y. An improved ELISA method, using a streptavidin-biotin complex, for detecting Marek's disease virus antigens in feather tips of infected chickens. *J Virol Methods*. 1986; 14:237-241.
226. Egnund KM, Kjeldsberg E. Improved ELISA for the detection of adenovirus antigen in feces extracts by the biotin/streptavidin interaction. *J Virol Methods*. 1986;14:57-63.
227. Abbott Laboratories, AUSZYME® Monoclonal, 69-4878/R11: AUSZYME monoclonal, Diagnostic Division, Abbott Park, IL 60064, USA, 2001.
228. Abbott Laboratories, AxSYM® HBsAg (V2), 56-4127/R10, Diagnostic Division, Abbott Park, IL 60064, USA, August 2005.
229. Bio-Rad Laboratories, Genetic Systems™ HBsAg EIA 3.0, Bio-rad Laboratories, Redmond, WA 98052, USA, March 2006.
230. Yücel F, Manav A, Basalp A. Production and characterization of monoclonal antibodies against hepatitis B viruses and application of a quick sandwich ELISA. *Hybridoma and Hybridomics*. 2003; 22(3):173-177.
231. Ochoa R, Martínez JC, Ferriol X, García AM, Estrada E, Blanco R. Sensibilización de placas para ensayos inmunoenzimáticos con antígenos vacunales. *VacciMonitor*. Octubre-Diciembre 2003; Año 10, 3:14-17.
232. Growther J. *The ELISA guidebook*. New Jersey: Human Press Inc.;2010.
233. Selby C. Interference in immunoassay. *Ann Clin Biochem*. 1999; 36:704-721.
234. Kricka LJ. Human Anti-Animal Antibody Interferences in Immunological Assays. *Clinical Chemistry*. 1999; 45(7):942-956.

235. Levinson S, Miller J. Towards a better understanding of heterophile (and the like) antibody interference with modern immunoassays. *Clinica Chimica Acta*. 2002; 325:1–15.
236. Jeffcoate WJ, Selby C, Powell RJ. Radioimmunoassay artifact associated with circulating anti-rabbit antibodies. *Clin Endocrinol*. 1988; 28:39-43.
237. Thompson RJ, Jackson AP, Langlois N. Circulating antibodies to mouse monoclonal immunoglobulins in normal subjects. Incidents, species specificity, and effect on a two site assay for creatine kinase-MB isoenzyme. *Clin Chem*. 1986; 32:476– 81.
238. Boerman OC, Segers MFG, Poels LG, Kenemans P, Thomas CMG. Heterophilic antibodies in human sera causing falsely increased results in the CA 125 immunofluorometric assay. *Clin Chem*. 1990; 36:888–91.
239. Boscato LM, Stuart MC. Incidence and specificity of interference in two-site immunoassays. *Clin Chem*. 1986; 32:1491-5.
240. Marks V. False-Positive Immunoassay Results: A Multicenter Survey of Erroneous Immunoassay Results from Assays of 74 Analytes in 10 Donors from 66 Laboratories in Seven Countries. *Clinical Chemistry*. 2002; 48(11):2008-2016.
241. Kricka L, Schmerfeld-Pruss SM, Goodman DBP, Kaladas P. Interference by human anti-mouse antibody in two-site immunoassays. *Clin Chem*. 1990; 36:892-4.
242. Roche Applied Science Immunology. Interference-Eliminating Proteins for the Diagnostic Industry. Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Nonnenwald 2 82372 Penzberg, Germany, 2002.
243. Madry N, Auerbach B, Schelp C. Measures to overcome HAMA interferences in immunoassays. *Anticancer Res*. 1997; 17:2883-6.
244. Jager W, Zoller O. Human anti-mouse antibodies against OC 125 do not interfere in a CA 125 assay that uses OC and M11 antibodies. *Clin Chem*. 1993; 39:556-7.
245. Boscato LM, Stuart MC. Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. *Clin Chem*. 1998; 34:27–33.
246. Machado L, Giralдино I, Dávalos L. Reacción de inmunoglobulinas de distintas especies con el factor reumatoideo en inmunoensayos de látex aglutinación. *Rev Cubana Farm*. 2003; 37(3):5-11.
247. Bjerner J, Nustad K, Norum LF, Olsen KH, Børmer OP. Immunometric Assay Interference: Incidence and Prevention. *Clinical Chemistry*. 2002; 48(4):613–621.

248. Webber TH, Kapyaho KI, Tanner P. Endogenous interference in immunoassays in clinical chemistry. A review. *Scand J Clin Lab Invest.* 1990; 2 Suppl 201:77-82.
249. Zweig MH, Csako G, Benson CC, Weintraub BD, Kahn BB. Interference by anti-immunoglobulin G antibodies in immunoradiometric assays of thyrotropin involving mouse monoclonal antibodies. *Clin Chem.* 1987; 33:840–4.
250. Hunter WM, Budd PS. Circulating antibodies to ovine and bovine immunoglobulin in healthy subjects: a hazard or immunoassays. *Lancet* 1980; ii:1136.
251. Flourié F, Parant F, Pénès MC, Alcaraz-Galvain D. Falsely Increased Thyroid-stimulating Hormone Concentrations attributable to Interference from Human Antimouse Antibodies [Letter]. *Clin Chem.* 2002; 48(12):2289.
252. Kricka LJ. Interferences in Immunoassay—Still a Threat (Editorial). *Clin Chem.* 2000; 46(8):1037-38.
253. Vico C, Enriori P, Vulfovich R, Fuertes A, Reggiani V. Enfermedad trofoblástica gestacional. Detección de anticuerpos heterófilos. Asociación Argentina de Ginecología Oncológica. [Publicado/actualizado: 23 de agosto de 2002]; Disponible en <http://www.aaginonc.org.ar>.
254. TecnoSUMA S.A. UMELISA HBsAg, Código UM 2003, TecnoSUMA S.A. ave 25 y calle 134, apartado postal 6945, La Habana, Cuba, marzo 1999.
255. Duong Ly T, Servant-Delmas A, Bagot S, Gonzalo S, Férey M-P. Sensitivities of Four New Commercial Hepatitis B Virus Surface Antigen (HBsAg) Assays in Detection of HBsAg Mutant Forms *Clin. Microbiol.* 2006; 44(7):2321.
256. Buddhirakkul N, Buddhirakkul P, Balachandra K, Suttichoke J. Development of one-step enzyme linked immunosorbent assay for hepatitis B surface antigen utilizing monoclonal antibodies. *Thai J Hlth Resch.* 2000; 14(1): 19-26.
257. Ismail N, Fish GE, Smith MB. Laboratory evaluation of a fully automated chemiluminescence immunoassay for rapid detection of HBsAg, antibodies to HBsAg, and antibodies to hepatitis C virus. *J Clin Microbiol* 2004; 42(2):610-617.
258. Organon Teknika SA. MicroELISA system Hepanostika HBsAg Uni-form II (1.2), Organon Teknika, NL-5281 RM Boxtel, The Netherlands, Edición 05/99.

259. AutoBio Diagnostic Co. Ltd. Hepatitis B surface antigen (HBsAg) chemiluminiscence immunoassay kit, AutoBio Diagnostic Co. Ltd, No. 87 Jingbei Yi Road, National Eco & Tech Development Area, Zhengzhou, China 450016, Ed. 02-2009.
260. Kroll MH, Elin RJ. Interference with clinical laboratory analyses. *Clin Chem*. 1994; 40:1996-2005.
261. Ekins RP. Immunoassay design and optimization. In: Price CP, Newman DJ, editors. *Principles and Practice of Immunoassay*. New York: Stockton Press; 1991. p. 96-153.
262. Wood WG. Matrix effects in immunoassays. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 1991; 205:102-12.
263. Wenk RE. Mechanism of interference by hemolysis in immunoassays and requirements for sample quality. *Clin Chem* 1998; 44:2554.
264. Granouillet R, Rasclé F, Chamson A, Frey J, Perier C. Monoclonal IgM interference during measurement of reactive protein C and ferritin by immunonephelometry. *Ann Biol Clin* 1998; 56:485–6.
265. Hawkins BR, Saueracker GC, Dawkins RL, Davey MG, O'Connor KJ. Population study of heterophile antibodies. *Vox Sang* 1980; 39:339–42.
266. Buttner J. Recommendation on Quality Control in Clinical Chemistry. Part 2, Assessment of analytical methods for routine use. *Cinical Chemistry Acta*. 1979; 98:145F-162F.
267. Registro Sanitario en Cuba del UMELISA anti-HBc, No. D9909-09, CEDMEC, 1999.
268. Registro Sanitario en Cuba del UMELISA anti-HBcIgM, No.D0210-42, CEDMEC, 2002.
269. Biomérieux, Hepanostika HBsAg Ultra Confirmatory, Biomérieux, Boseind 15, 5281 RM, The Netherlands, Ed. 02-2008
270. Abbott Laboratories, Antibody to hepatitis B surface antigen (human). HBsAg Confirmatory Neutralization of AUSZYME® Monoclonal Repeatedly Reactive Specimens, Diagnostic Division, Abbott Park, IL 60064, USA, 2001.
271. Ani Labsystems Ltd . HBsAg Confirmatory Test, Ani Labsystems Ltd. Oy, Tiilitie 3, FIN-01720 Vantaa, Finland, [www.anilabsystems.com](http://www.anilabsystems.com), Edition May 28, 2007.
272. Behring Dade, Enzygnost HBsAg Confirmatory test Dade Behring Marburg GmbH, Emil-von-Behring-Str. 76,D-35041 Marburg,[www.dadebehring.com](http://www.dadebehring.com), Edition, May 2009.
273. Akhtar K, Sherwani RK, Ahmad L, Sharma A, Singh P. Hook's effect — a rare. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2009; 25(1):27–29.

274. Fernando SA, Wilson GS. Multiple epitope interactions in the two-step sandwich immunoassay. *J Immunol Methods*. 1992; 151:67-86.
275. Sorin Biomedica. Hepatitis surface antigen Confirmatory Test. Especificaciones del Juego Comercial. Sorin Biomedica. Italia, 1986.
276. Rodríguez LA, Ribas MA, Díaz B, Roque A, Aragón U, Martínez R et al. Toma de muestra en papel de filtro para la detección de anticuerpos IgM antiviral de la hepatitis A. *Rev Cubana Med Trop*. 1998; 50(1):42-47.
277. Das PC, de Vries AH, McShine RL, Sibinga CT. Dried sera for confirming blood-borne virus infections (HCV, HTLV-1, HIV & HBsAg). *Transfus Med*. 1996; 6:319-323.
278. Manikkavasagan G. The use of dried blood spot testing in a community setting to improve screening and management of household contacts of hepatitis B infected pregnant women. Available from: <http://www.ukifellowshipprogramme.com/supported-programmes/2010/the-use-of-dried-blood-spot-testing>. 000/UK/12-11/NMAR/1036, Date of preparation: December 2012.
279. Lira R, Maldonado A, Rojas O, Ruiz M, Ibarra R. Use of dried blood samples for monitoring hepatitis B virus infection. *Virology Journal*. 2009; 6:153.
280. International Consortium for Blood Safety (ICBS), New York, USA & ICBS-Europe, Düsseldorf, Germany: HBV test kit evaluation results; <http://www.icbs-web.org/page31.html>.
281. Nick S, Scheiblauer H. Sensitivities of CE-Marked HIV, HCV and HBsAg Assays. *J Med Virol*. 2007; 79:S59–S64.
282. Scheiblauer H, Soboll H, Nick S. Evaluation of 17 CE-marked HBsAg assays with respect to clinical sensitivity, analytical sensitivity and hepatitis B virus mutant detection. *J Med Virol*. 2006; 78(S1):S66–S70.
283. European Union: Commission Decision of 3 February 2009 on common technical specifications for *in vitro*-diagnostic medical devices 2002/364/EC. *Official Journal of the European Communities* 2009; L39/34–L39/49.
284. Sánchez P, Fariñas AT, Rojo N, Hernández S. Diseño de un sistema de vigilancia para infecciones transmitidas por transfusión de sangre en Cienfuegos. *Rev Cubana Salud Pública*. 2011; 37(2):8-14.
285. Rodríguez L, Delgado G, Bello M, Montalvo MC, Sariago S, Gutiérrez A. Vigilancia de las hepatitis virales: resultados de laboratorio. Cuba, 1992-2004. *Rev Cubana Med Trop*. 2006; 58(2):45-53.

286. Pereira M, Noda A, Hernández A, Muy L, Martínez J, Rego R. Comportamiento de marcadores serológicos en donantes de sangre del territorio de Colón, 1998-2007. *Rev Med Electrón.* 2012; 34(1), versión On-line ISSN 1684-1824.
287. Bello M, González I, Rodríguez LA, Montalvo MC, Sariego S. Marcadores virales de las hepatitis B y C en niños con VIH. *Rev Enfer Infec Pediatr.* 2010; 23.24 (91):80-86.
288. Rodríguez L, Collado F, Aragón U, Díaz B, Rivero J. Hepatitis B virus exposure in human immunodeficiency virus seropositive cuban patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2000; 95(2):243-245.
289. Martínez Z, Peña N. Prevalencia de anticuerpos anti-VHC y del antígeno de superficie de la hepatitis B en pacientes tratados con hemodiálisis. *Rev Cubana de Med.* 2008; 47(1), versión On-line ISSN 1561-302X.
290. Lizarzabal M, Romero G, Rangel R, Fernández J, Añez. Características seroepidemiológicas y factores de riesgo de infección por virus hepatitis B y C: en personal de salud y población general HUM 2000.GEN. 2002; 6(2):84-94.
291. Bello M, Rodríguez LA, Gutiérrez A, Sariego S, Montalvo MC, Sánchez A. Detección de marcadores de hepatitis B y C en pacientes VIH positivos, 2000-2004. *Rev Cubana Med Trop.* 2005; 57(3):27-31.
292. Cinza Z, Aguilar A, Muzio V, Figueroa N, Valenzuela C. Immunogenicity and safety assessment of the Cuban recombinant hepatitis B vaccine in healthy adults. *Biologicals.* 2007; 35(2):115-122.
293. Hernández F, Aguilar A, Aljovin V, Aria G, Valenzuela C. Comparison of four recombinant hepatitis B vaccines applied on an accelerated schedule in healthy adults. *Hum Vacc.* 2011; 7(10):1026-36.
294. Torrente R, Torrente ID, Riccardi Y, Torrente N, Rodríguez S. Nuevo diseño del programa de trazabilidad de la placenta humana en la inspección de entrada, muestreo y viral en el Centro de Histoterapia Placentaria. III Taller de Calidad del Polo Científico, Habana, Cuba, 2008.
295. Neningen E, Veldes P, del Castillo C. Incidencia de infección por el virus de la hepatitis B y C. *Revista Cubana de Medicina.* 2010; 40(1), versión On-line ISSN 1561-302X.
296. Lizarzabal M, Márquez A, Gómez M. Marcadores serológicos de hepatitis B y C en embarazadas del estado Zulia, Venezuela. *Revista de la Sociedad Venezolana de Gastroenterología.* 2010; 64(1):19-20.
297. Sánchez M, Manrique EA. Comportamiento de la seroprevalencia del antígeno de superficie para la hepatitis B durante un año. CMDAT "Francisco de Miranda". Publicado: 29/07/2011, Disponible en: Revista electrónica portales médicos.com.

298. Piñol F, Clavería N, Piñol O, Martínez A, Cuesta M. Seropositividad del antígeno de superficie de la hepatitis B (Ags HVB) en pacientes atendidos en el Centro Médico del Alta Tecnología "Divina Pastora". Publicado en: 12/11/2012, Disponible en: Revista electrónica portales médicos.com.
299. Ustáriz C, Rodríguez LA, Delgado G, Ávila O, Gautier H. Frecuencia de hepatitis B y C en adultos con hemopatías malignas. Rev Cubana Inmunol Hemoter. 2005; 21(1), versión On-line ISSN 1561-2996.
300. Ustáriz C, Rodríguez LA, Delgado G, Alfaro A, Gautier H. Frecuencia de hepatitis B y C en niños con hemopatías malignas. Rev Cubana Inmunol Hemoter. 2006; 22(2), versión On-line ISSN 1561-2996.
301. González R, Roque, Morier L, Rodríguez LA. Evaluación de la actividad antiviral de plantas medicinales frente al virus de la hepatitis B (VHB) en células PLC/PRF/5. Rev Cubana Trop. 2006; 58(2) versión On-line ISSN 1561-2996.
302. Basualdo-Sigales MC, Alcántara-Pérez PA, Soler-Claudín C. Evaluación del estuche de diagnóstico ImmunoLISA TM HBsAg 1 step fabricado por Orgenics LTD para la detección del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B. Bioquímica. 2008; 33(3):122-127.

# ANEXOS

## Anexo 1

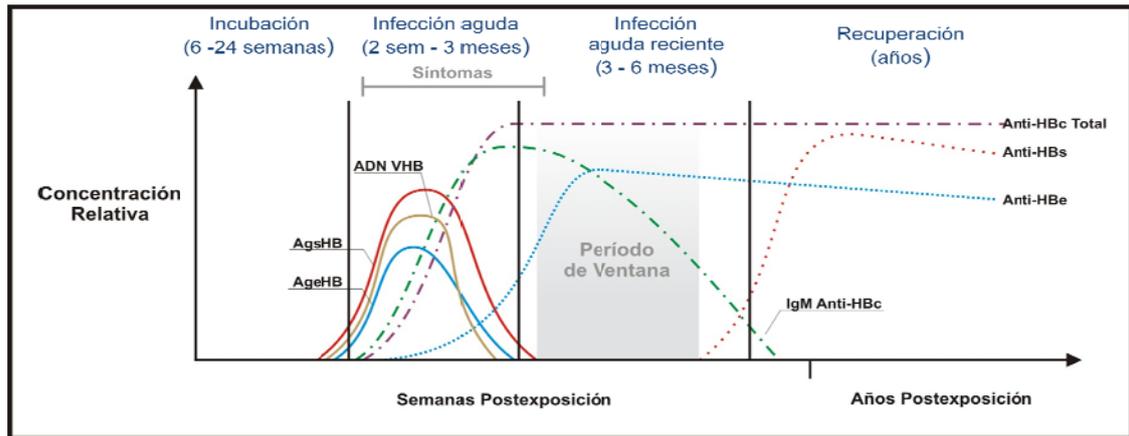


Figura 1.4 Comportamiento de los marcadores del VHB durante la infección aguda

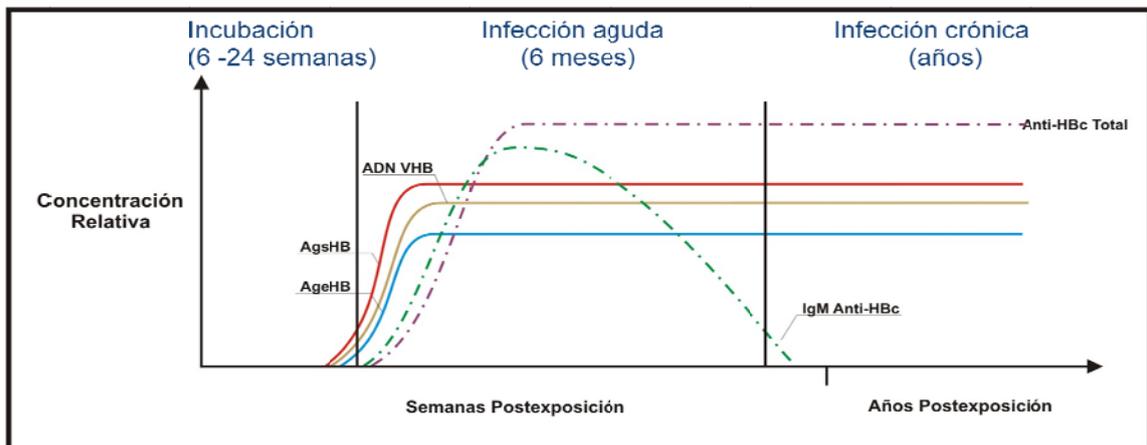


Figura 1.5 Comportamiento de los marcadores del VHB durante la infección crónica

## Anexo 2

Tabla 1.1 Interpretación de resultados de los marcadores serológicos del VHB

Resultados de los Ensayos						Interpretación
HBsAg	IgM Anti-HBc	Total Anti-HBc	Anti-HBs	HBeAg	Anti-HBe	
+	-	-	-	-	-	Inicios de la infección
+	+	+	-	+	-	Infección aguda temprana
-	+	+	-	-	-	Infección aguda reciente. Período de ventana
+	+	+	-	-	+	Infección aguda en resolución
+	-	+	-	+	-	Infección crónica con alta infectividad
+	-	+	-	-	+	Infección crónica con baja infectividad
-	-	+	+	-	-	Inmune por infección previa de VHB
-	-	-	+	-	-	Inmune por vacunación
-	-	-	-	-	-	Susceptible a la infección

Tomado de: WHO/CDS/CSR/LYO/2002.2:Hepatitis B

### Anexo 3

#### Fórmula 1

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{(\text{UF CP} - \text{UF Mezcla AcM/HBsAg})}{\text{UF CP}} \cdot 100$$

Donde:

UF: Unidades de fluorescencia

CP: Control positivo

#### Fórmulas 2

$$S = \frac{VP}{VP+FN} \cdot 100 \quad VPP = \frac{VP}{VP+FP} \cdot 100$$

$$E = \frac{VN}{VN+FP} \cdot 100 \quad VPN = \frac{VN}{VN+FN} \cdot 100$$

$$\text{Eficacia} = \frac{VP+VN}{VP+FP+VN+FN} \cdot 100$$

$$K = \frac{po-pe}{1-pe} \quad po = \frac{VP+VN}{n} \quad pe = \frac{P+N}{n}$$

$$P = \left[ \left( \frac{(VP+FP)(VP+FN)}{n} \right) \right] \quad N = (FN+VN) - (VP+FN) - P$$

Donde:

VP = Verdaderos positivos.

n = Total de muestras estudiadas.

VN = Verdaderos negativos.

P = Concordancia en el caso de los positivos.

FN = Falsos negativos.

N = Concordancia en el caso de los negativos.

FP = Falsos positivos.

#### Fórmula 3

$$\text{Reproducibilidad (\%)} = \frac{\text{Número de resultados (positivos o negativos)}}{\text{Total de veces evaluadas}} \cdot 100$$

## Anexo 4

### Fórmula 4

$$\text{Recuperación (\%)} = \frac{\text{CP(UF) (Tiempo de estudio)}}{\text{CP(UF) (Tiempo inicial)}} \cdot 100$$

Donde:

CP: Control positivo

UF: Unidades de fluorescencia

### Fórmula 5

$$\text{Inhibición (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Muestra} + R_n}{\text{Muestra} + R_c}\right) \cdot 100$$

Donde:

R<sub>n</sub>: Reactivo neutralizante

R<sub>c</sub>: Reactivo control

### Fórmula 6

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$V_2 = \frac{C_1 \cdot V_1}{C_2}$$

Donde:

C<sub>1</sub>: Concentración de hematocrito en el material biológico (%)

C<sub>2</sub>: Concentración de hematocrito deseada (%)

V<sub>1</sub>: Volumen de material biológico (mL)

V<sub>2</sub>: Volumen de material biológico deseado (eritrocitos + Suero normal humano anti-HBsAg negativo) (mL)

### Fórmula 7

$$\text{Recuperación (\%)} = \frac{\text{UF Muestra (Tiempo de estudio)}}{\text{UF Muestra (Tiempo inicial)}} \cdot 100$$

Donde:

UF: Unidades de fluorescencia

## Anexo 5

Tabla 2.1 Variantes de recubrimiento evaluadas para seleccionar los AcM de la fase sólida del ensayo

Variantes	HEP-1 ( $\mu\text{g/mL}$ )	8H11 ( $\mu\text{g/mL}$ )	2F12H9 ( $\mu\text{g/mL}$ )	2C4A2 ( $\mu\text{g/mL}$ )
Control	8	5	-	-
Var.1	6	2	3	2
Var.2	6	3	2	2
Var.3	4	3	3	3

Tabla 2.2 Variantes de ensayo evaluadas

Procedimiento técnico	Variantes de ensayo				
	A	B	C	D	E
Muestras	1 h-37 °C	1 h-37 °C	30 min-37 °C	30 min-37 °C	16-24 h 20 a 25 °C
Anticuerpos Biotinilados	1 h-37 °C	30 min-37 °C	1 h-37 °C	30 min-37 °C	30 min-37 °C
Conjugado Estrep./FA	1 h-37 °C	30 min-37 °C	30 min-37 °C	1 h-37 °C	30 min-37 °C
Sustrato	30 min 20 a 25 °C				

Anexo 6

CERTIFICADOS DE REGISTRO SANITARIO DEL UMELISA HBsAg PLUS  
EN CUBA, MÉXICO, PERÚ, BRASIL, COLOMBIA Y VENEZUELA

Anexo 7

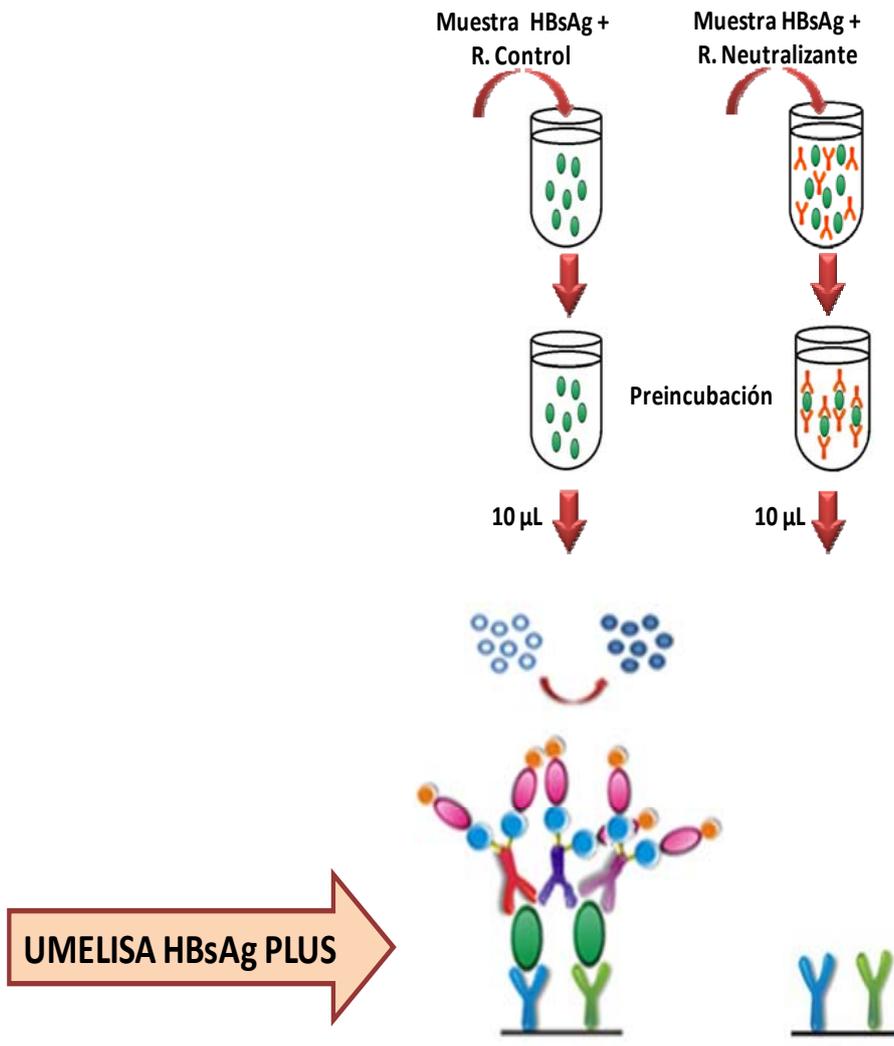


Figura 2.2 Principio del ensayo confirmatorio

Anexo 8

CERTIFICADOS DE REGISTRO SANITARIO DEL HBsAg CONFIRMATORY TEST  
EN CUBA, COLOMBIA, ECUADOR Y PERÚ

## Anexo 9

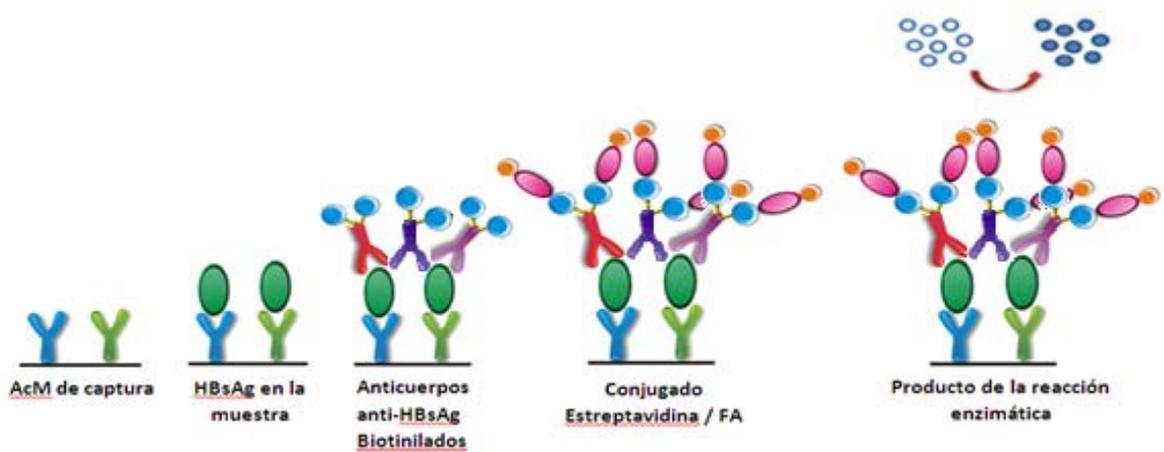
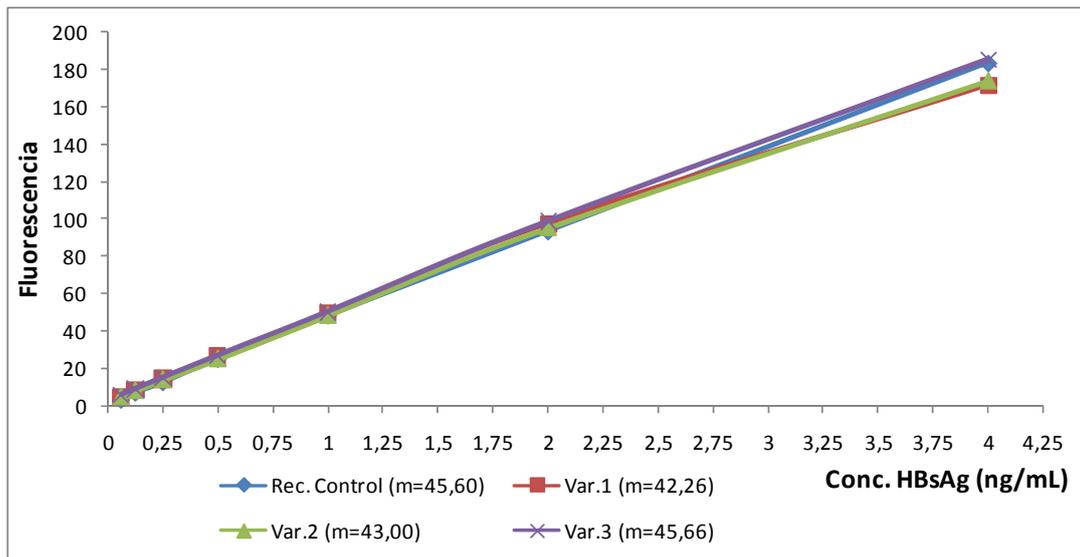


Figura 3.1 Procedimiento del ensayo para muestras de suero y plasma



m: Pendiente de la curva estándar

Figura 3.2 Comportamiento de la curva estándar de HBsAg (EPEI-ad) en las diferentes variantes de recubrimiento evaluadas

## Anexo 10

Tabla 3.4 Detectabilidad de diferentes ensayos comerciales para HBsAg

Ensayo comercial	Compañía	Detectabilidad (ng/mL)
AxSym HBsAg V2	Abbott (E.U.A.)	0,16
Advia Centaur HBsAg	Bayer(Alemania)	0,12
Liaison HBsAg	Dia-Sorin (Italia)	0,11
Monolisa HBsAg Ultra	Bio-Rad (E.U.A.)	0,08
Vidas HBsAg Ultra	Biomérieux (Francia)	0,09

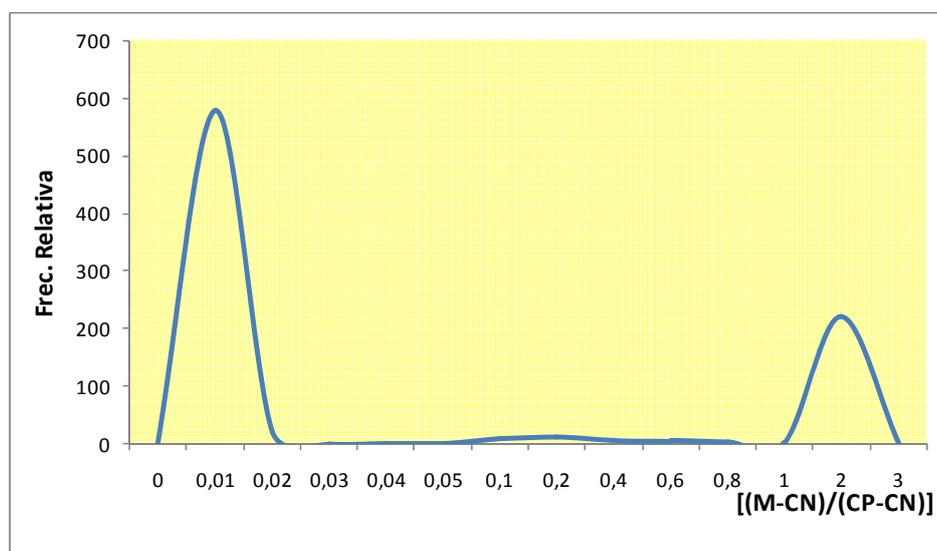


Figura 3.10 Distribución de frecuencias para la población de positivos y negativos evaluada en el estudio de las características funcionales del ensayo

## Anexo 11

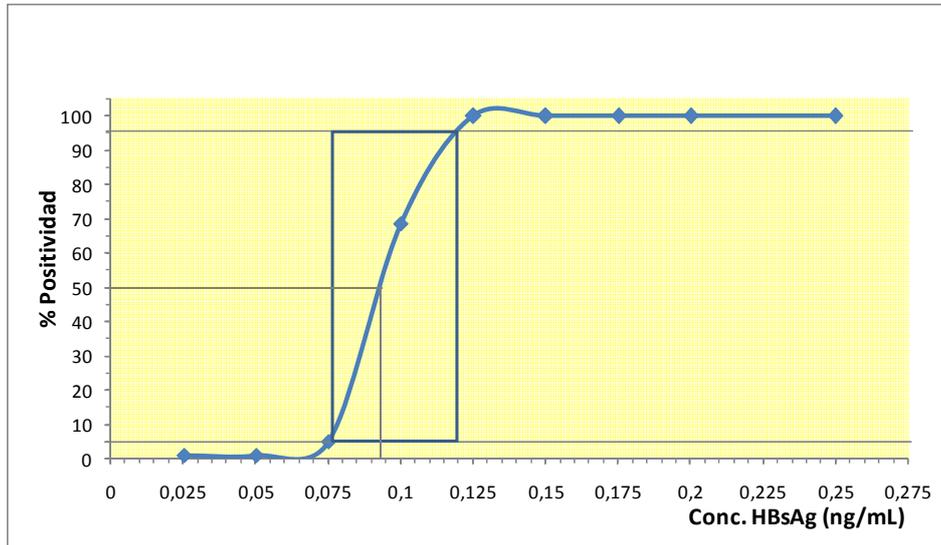


Figura 3.12 Zona gris del ensayo determinada en base al Estándar HBsAg-ad del PEI

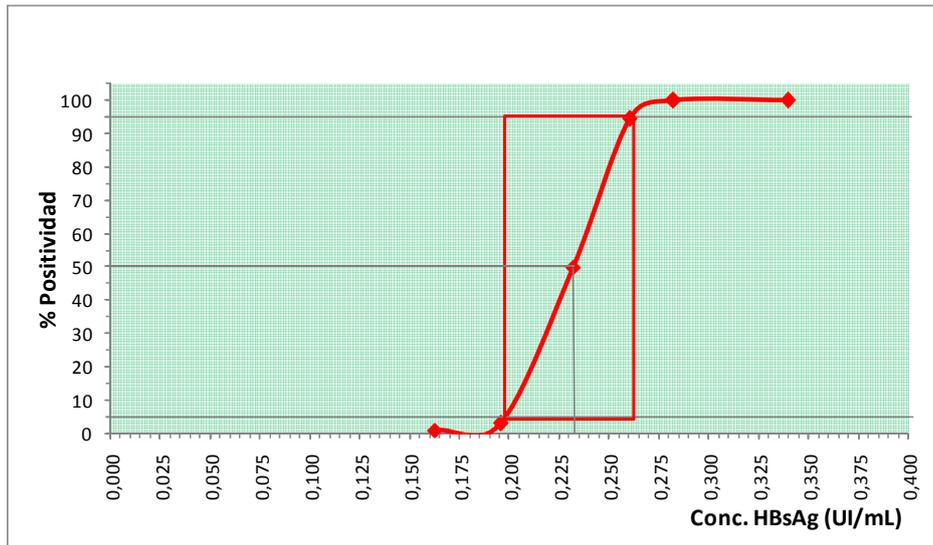


Figura 3.13 Zona gris del ensayo determinada en base al Primer Estándar Internacional de la OMS

## Anexo 12

Tabla 3.8 Estudio de estabilidad en anaquel del diagnosticador

Tiempo de estudio	Lote 1		Lote 2		Lote 3	
	CP (UF)	Recuperación (%)	CP (UF)	Recuperación (%)	CP (UF)	Recuperación (%)
Inicial	144,2	-	144,7	-	146,0	-
3 meses	145,8	100	145,8	100	141,4	96,8
5 meses	151,3	100	151,3	100	143,1	98
8 meses	142,6	98,9	142,6	98,5	146,2	100
10 meses	137,2	95,1	137,2	94,8	140,6	96,3
12 meses	139,4	96,7	139,8	96,6	143,8	98,5
14 meses	136,4	94,6	135,7	93,8	139,9	95,8
18 meses	135,9	94,2	138,9	96,0	137,5	94,2

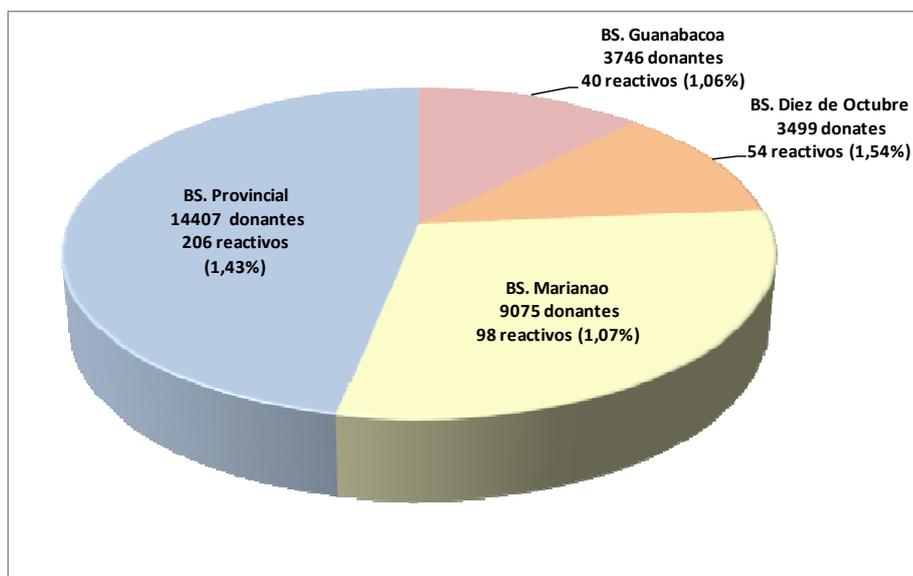
CP: Control positivo

UF: Unidades de fluorescencia

Tabla 3.9 Estabilidad de reutilización. Reactivos listos para el uso

Tiempo estudiado (semanas)	Estabilidad Placas Recubiertas (%Recup. CP)	Estabilidad Control Positivo (%Recup. CP)	Estabilidad Anticuerpos Biotinilados (%Recup. CP)	Estabilidad Conj. Estrep./FA (%Recup. CP)
1	100	98,8	100	100
2	100	100	100	98,91
3	98,6	99,2	99,01	100
4	100	99,6	100	100
5	99,4	100	100	100
6	100	98,9	98,87	100
7	100	100	100	98,67
8	100	99,1	99,73	100

### Anexo 13



BS: Banco de sangre

Figura 3.15 Estudio piloto del UMELISA HBsAg PLUS en cuatro Bancos de Sangre

Tabla 3.12 Resultados de cuatro muestras falsas positivas del UMELISA HBsAg PLUS. Estudio piloto

Muestra	MicroELISA Hepanostika		UMELISA HBsAg PLUS	
	Valor de Corte (Abs.)	Valor de la muestra (Abs.)	Valor de Corte (UF)	Valor de la muestra (UF)
M1	0,114	0,104	5,15	9,78
M2	0,123	0,120	8,22	13,6
M3	0,128	0,127	6,38	8,49
M4	0,143	0,114	6,46	7,96

## Anexo 14

Tabla 3.16 Ejemplos de resultados en la prueba confirmatoria desarrollada

Muestra	Unidades de fluorescencia (UF)				Resultado (Observaciones)
	Muestra pura + Rc	Muestra pura + Rn	Muestra 1:100 + Rc	Muestra 1:100 + Rn	
A	210	210	210	15,4	Pos
B	23,8	25,6	210	67,2	Pos (efecto de gancho)
C	7,3	2,8	2,3	2,1	Pos
D	40,7	1,9	3,2	2,9	Pos
E	210	11,6	18,5	2,4	Pos
F	35,8	36,1	2,7	2,2	Neg
G	210	210	210	193,3	Diluir

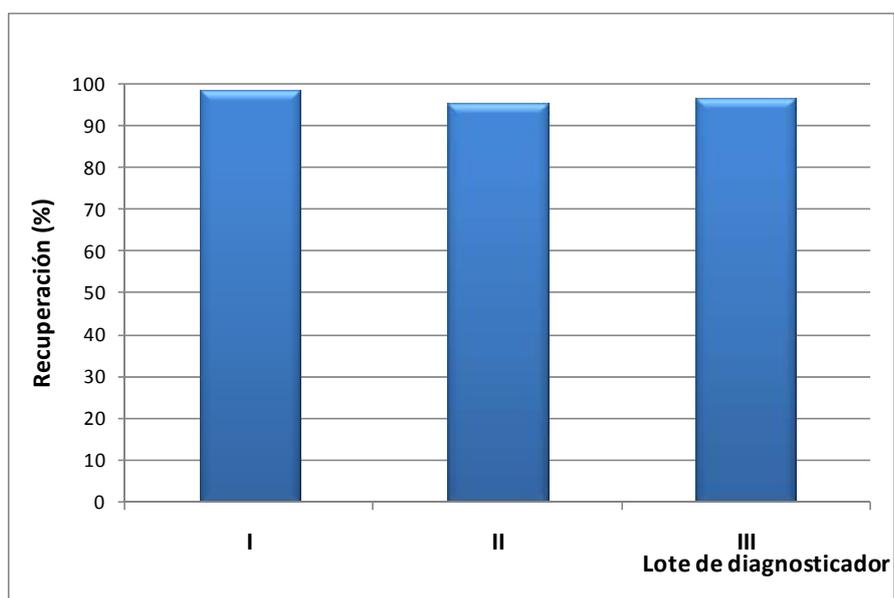


Figura 3.17 Estabilidad en anaquel del estuche confirmatorio. Recuperación promedio en 30 meses de estudio

## Anexo 15

Figura 3.20 Procedimiento técnico del ensayo para muestras de sangre seca sobre papel de filtro

Tabla 3.19 Comportamiento de las muestras de SSPF HBsAg positivas, en el tiempo inicial de estudio para las dos variantes de secado

Muestras HBsAg positivas	V1		V2	
	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar
1 ng/mL	8,25	0,63	9,55	1,13
2 ng/mL	14,8	4,03	15,7	1,13
4 ng/mL	32,65	1,06	31,8	2,82

V1: 15 °C; 55% HR                      V2: 30 °C; 89% HR

## Anexo 16

V1: 15 °C y 55% HR

V2: 30 °C y 89% HR

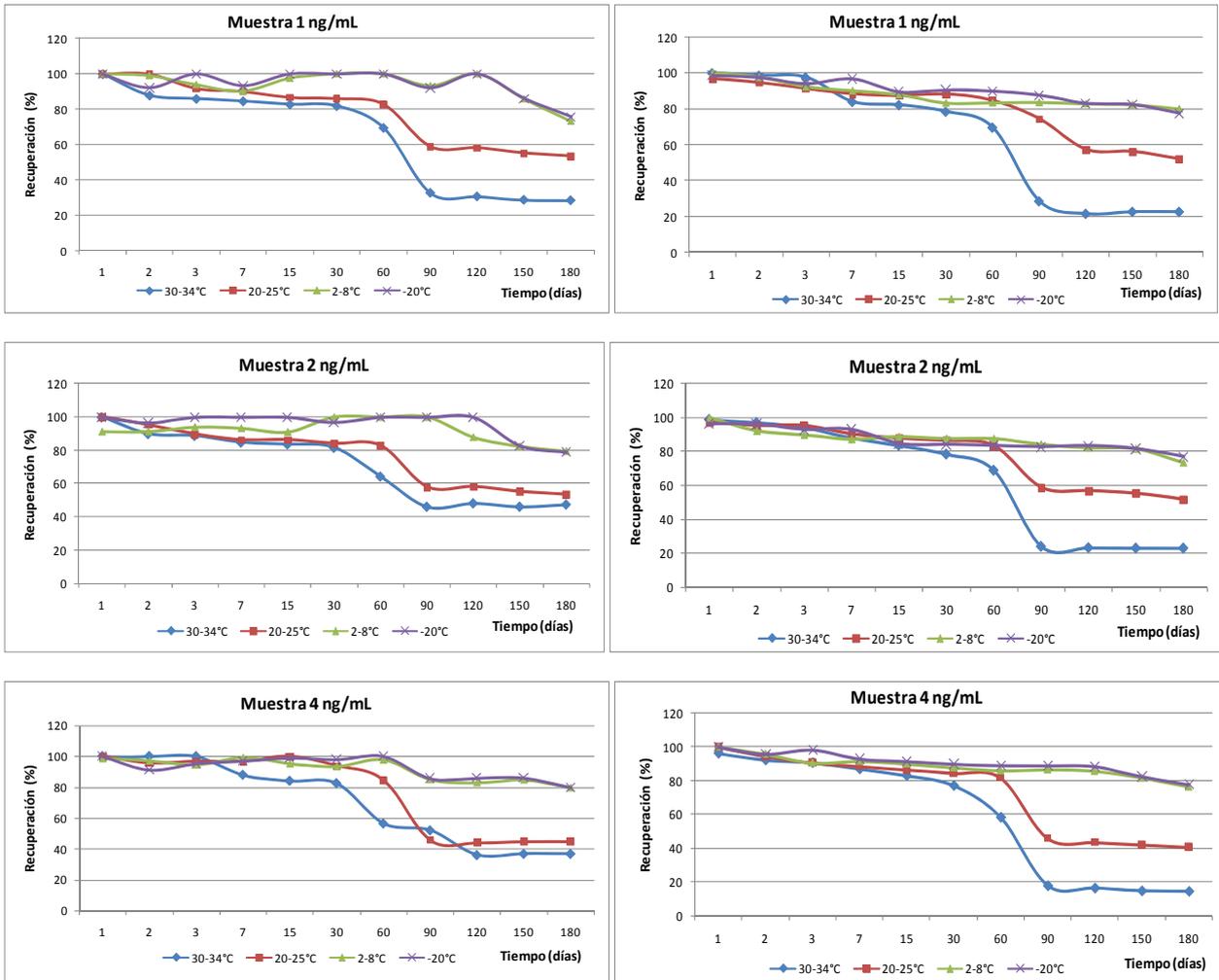


Figura 3.23 Efecto de la temperatura de almacenamiento en la estabilidad del HBsAg en muestras de sangre seca sobre papel de filtro secadas bajo diferentes condiciones (V1 y V2)

Anexo 17

Tabla 3.20 Evaluaciones internacionales. UMELISA HBsAg PLUS

Centro Evaluador	Muestras evaluadas	Resultados		Referencia empleada	Observac.
		Sens. (%)	Esp. (%)		
Brasil 2001 INCQS	782 Sueros	100	99.4	Paneles comerciales Muestras clasificadas INCQS.	112 VP 670 VN (4 FP)
México 2005 INDRE	250 Sueros	100	98.2	Muestras clasificadas INDRE.	25 VP 225 VN (4 FP)
Brasil 2005 INCQS	795 Sueros	100	99.6	Paneles comerciales Muestras clasificadas INCQS.	161 VP 634 VN (2 FP)
Brasil 2011 INCQS	659 Sueros	100	99.3	Paneles comerciales Muestras clasificadas INCQS.	180 VP 479 VN (4FP)

Anexo 18

Tabla 3.21 Evaluación internacional del UMELISA HBsAg PLUS. PEI / ICBS. 2006

Producto	Fabricante	Formato	Sensibilidad %	Especificidad %
AxSYM HBsAg V2	Abbott	ELISA(MEIA)	100	100
Monolisa HBsAg	BIO-RAD	ELISA	100	99,5
Hepanostika	BioMérieux	ELISA	100	99,5
BioELISA	Biokit	ELISA	100	99
<b>UMELISA HBsAg PLUS</b>	<b>TecnoSUMA</b>	<b>ELISA</b>	<b>99,32</b>	<b>100</b>
IMMULITE 2000 HBsAg	DPC, Biermann	ELISA(ChLIA)	98,63	100
EasiLisa TM HBsAg	NubencoEnterprise	ELISA	98,63	100
Livzon HBsAg	LivzonReagent	ELISA	97,95	100
Diagnostic Kit HBsAg	Beijing GWK	ELISA	97,95	100
Radiopreparat HBsAg	RadiopreparatEnterprise	ELISA	97,95	100
Diagnostic Kit HBsAg	LifeclonBiotechnology	ELISA	97,95	99,50
Hepalisa HBsAg	J.Mitra & Co.	ELISA	98,63	97,95

Tabla 3.22: Evaluaciones de desempeño Red Nacional de Laboratorios SUMA. HBsAg CONFIRMATORY TEST

Laboratorio	Muestras positivas UMELISA HBsAg PLUS	Muestras confirmadas HBsAg CONF. TEST	Confirmación (%)
2001-2010 CMHE Stgo. de Cuba	5 588	5 533	94.0
2006-2010 BS Provincial Stgo. de Cuba	481	449	93.3
2000-2011 Red Nacional Certificación Sangre	97 518	77 508	79.5

## Anexo 19

### EVALUACIONES DE DESEMPEÑO

UMELISA HBsAg PLUS y HBsAg CONFIRMATORY TEST

## Anexo 20

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DE LA ASPIRANTE RELACIONADA CON EL TRABAJO

## Producción científica de la aspirante relacionada con el trabajo

### Publicaciones

- 1.- Importancia del pesquisaje de hepatitis virales en el diseño de estrategias de vacunación. Vaccimonitor, 7. Año 14. N° 2. Jul-Dic 2005. I. Valdivia, R. Ochoa, J. Trujillo, A. Delahanty, J. Ventura, D. Ortega, A. Palenzuela y C. Silva.
- 2.- Detección de HBsAg en muestras de sangre seca sobre papel de filtro empleando el UMELISA HBsAg PLUS. Revista Biomédica, Vol. 14, N° 1, p17-21, 2003. A. Delahanty, I. Valdivia, J. Ventura, J. Trujillo, D. Ortega y A. Palenzuela.
- 3.- Estabilidad de HBsAg en muestras de sangre seca sobre papel de filtro. BIOQUIMIA Vol. 27, No. 4, 103-106, 2002. A. Delahanty, I. Valdivia, J. Ventura, D. Ortega, J. Trujillo, A. Palenzuela y Y. Tallo.
- 4.- Monoclonal antibodies Against Hepatitis B S Antigen: Production, Characterization and Use for Diagnosis. Hybridoma Vol. 19, No. 3, 2000. C. Acosta, I. Baluja, I. Amores, A. Brito, I. Valdivia, A. Delahanty, J. Ventura y V. Soto.
- 5.- Impacto del programa de inmunización anti-virus de hepatitis B (VHB) en pacientes sometidos a diálisis en La Habana, Cuba. Invest. Clin. 41(4):237-244, 2000. M. González-Griego, E. Pentón, G. Delgado, J. Pérez-Oliva, V. Ramos, M. Izquierdo, G. García, N. Levy, Z. Cinza, I. Valdivia, J. Trujillo y A. Delahanty.
- 6.- Alertar a tiempo. Ciencia, Innovación y Desarrollo Vol. 3, No. 3, 33-36, 1997. I. Valdivia y J. Trujillo.

### Registros Sanitarios.

- 1.- Registro Sanitario UMELISA HBsAg PLUS.

CUBA N° de Registro D0007-10

COLOMBIA N° de Registro INVIMA R-2000947212

MÉXICO N° de Registro 0405R95 SSA

BRASIL N° de Registro ANVISA 10188410017

VENEZUELA N° de Registro 7087

- 2.- Registro Sanitario HBsAg CONFIRMATORY TEST.

CUBA No. de Registro D9606-21

COLOMBIA N° de Registro INVIMA R-2001051155

MÉXICO N° de Registro 0405R95 SSA

## Informes Técnicos.

- 1.- Informe Técnico: "Validación interna del UMELISA HBsAg PLUS, para la detección de HBsAg en muestras de suero o plasma". I. Valdivia, A. Delahanty, J. Ventura.
- 2.- Informe Técnico: "Caracterización de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el HBsAg y su empleo en el UMELISA". I. Valdivia, A. Delahanty, C. Acosta.
- 3.- Informe Técnico: "Validación interna de la prueba para la detección de HBsAg en muestras de sangre seca sobre papel de filtro, empleando el UMELISA HBsAg PLUS". A. Delahanty, I. Valdivia, J. Ventura.

## Trabajos presentados en eventos científico-técnicos

### 1.- II Jornada Nacional de Laboratorios de Diagnóstico SUMA. Cuba, 1990.

- UltramicroELISA monoclonal para la detección del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B.
- UltramicroELISA policlonal para la detección del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B.
- Purificación del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B a partir de suero humano para la obtención de antisueros específicos.
- Purificación de anticuerpos contra el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B por cromatografía de afinidad.
- Preparación y evaluación de un estándar de trabajo de antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, subtipo *ad*.

### 2.- I Jornada Científica de Laboratorios SUMA en la URSS. Rusia, 1992.

- Diagnóstico del VHB.
- Aplicación de la tecnología SUMA para los programas de certificación de la sangre.

### 3.- II Congreso Nacional y IV Jornada Latinoamericana de Trabajos Cooperativos en Hematología, Inmunología y Hemoterapia. I Encuentro Cuba-Brasil de Hematólogos. Cuba, 1993.

- UltramicroELISA para la detección del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B.

### 4.- IV Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología. I Congreso Cubano de Medicina Tropical. Cuba. 1993

- Ensayo Confirmatorio para el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B.
- UltramicroELISA en un paso para la detección del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B.

5.- VIII Forum Nacional de Ciencia y Técnica. Cuba, 1993

-UMELISA HBsAg en un solo paso y ensayo confirmatorio para el diagnóstico del antígeno de superficie del VHB.

6.- Jornada Médica de la Sociedad Latinoamericana de Hepatología y la Asociación Mexicana de Hepatología. México, 1994

-Estudios en grupos de alto riesgo y estrategias en el programa de vacunación contra la hepatitis B en Cuba.

7.- Biotecnología Habana '94. Cuba, 1994

-Purificación del anticuerpo monoclonal CB-Hep1 mediante proteína A sepharosa CL-4B de alto flujo, usando gradiente de pH discontinuo.

8.- XII Seminario Científico del CNIC. Cuba. 1995

-Evaluación de la estabilidad de los estuches UMELISA HBsAg.

-Caracterización de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el HBsAg

9.- Primer Taller SUMA Regional Occidental. Cuba 1996

-Aplicación de los UMELISAs HBsAg, anti-HBsAg y HBsAg Confirmatory Test para la evaluación de la respuesta inmune a la vacuna contra la hepatitis B.

10.- IV Latin American Congress of Immunology. XI Mexican Congress of Immunology. México, 1996

-Infection Caused by the hepatitis B virus in seropositive patients to HIV

11.- I Jornada Nacional de Inmunología. Cuba, 1996

-Evaluación del sistema Avidina-Biotina en el UMELISA HBsAg.

12.- Inmunoensayo '97. 1er Encuentro Internacional de Inmunodiagnóstico, 3ra Jornada Nacional de Inmunoensayo. Cuba, 1997

-Utilización de los UMELISA HBsAg, anti-HBsAg y HBsAg Confirmatory Test en estudios clínicos vinculados con la vacuna recombinante HeberBiovac HB.

-Aplicación de los UMELISA HBsAg, anti-HBsAg y HBsAg Confirmatory Test en la evaluación de la respuesta inmune a la vacuna recombinante contra el virus de la hepatitis B (VHB) en seropositivos al VIH.

-Obtención, caracterización y uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el HBsAg en el diagnóstico del virus de la hepatitis B.

13.- HEMATOLOGIA 2001. IV Congreso Nacional y VI Jornada Latinoamericana de Hematología, Inmunología y Medicina Transfusional. II Encuentro Internacional de Inmunodiagnóstico. VI Congreso

Iberoamericano de Hematología. II Congreso de la División Interamericana de la Sociedad Internacional de Hematología. Cuba, 2001

-UMELISA HBsAg PLUS, importancia de su extensión en Cuba.

-Detección de HBsAg en muestras de sangre seca sobre papel de filtro.

-Estabilidad del HBsAg en muestras de sangre seca sobre papel de filtro.

-Transmisión Vertical en las hepatitis

14.- Hepatología 2002. Cuba.

-Estabilidad de HBsAg en muestras de sangre seca sobre papel de filtro almacenadas en condiciones climáticas de Cuba.

15.- XIV Forum Nacional de Ciencia y Técnica. Cuba 2003

-UMELISA HBsAg PLUS: Garantía para el diagnóstico de la hepatitis B.

16.- Biotecnología Habana 2003. Cuba

-Immunogenicity and safety assessment in healthy adults of the cuban recombinant HEBERBIOVAC-HB vaccine.

17.- XIV Forum Provincial de Ciencia y Técnica. Cuba, 2004

-Generalización del diagnóstico de las hepatitis virales en Cuba y América Latina con el empleo de la tecnología SUMA.

18.- 12 International Congress of Immunology and 4 Annual Conference of FOCIS. Canadá, 2004

-Detection of HBsAg in eluates of blood spotted on filter paper using the UMELISA HBsAg PLUS.

19.- IV Congreso Nacional de Inmunología Cuba, 2004

-Evaluación del UMELISA HBsAg PLUS con Estándares del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B.

20.- Hepatología 2006. Cuba

-Seroprevalencia de marcadores de los virus de las hepatitis B y C en poblaciones supuestamente sanas.

21.- Hematología 2009. Cuba

Soporte analítico de la pesquisa serológica de la sangre en Cuba.

Tutoría de tesis de especialidad y de diploma

-Tutoría de tesis de especialidad. ICBP "Victoria de Girón". La Habana, Cuba, 1994

"Normalización de un ensayo para la confirmación del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B"

-Asesoría de Trabajo de Diploma. Facultad de Biología. Universidad de la Habana, Cuba, 1999

“Detección de HBsAg en muestras de sangre seca sobre papel de filtro”