

**Evaluación de una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real simple y rápida para la cuantificación del ADN del virus de la hepatitis B**  
Evaluation of a simple and fast real time polymerase chain reaction assay for quantification of hepatitis B virus DNA

Licel de los Ángeles Rodríguez Lay<sup>1\*</sup> <https://orcid.org/0000-0002-7742-3146>

Maria Caridad Montalvo<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-7496-023X>

Marité Bello Corredor<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-7394-8690>

Dayesi López Hernández<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-6930-7674>

Yenisleidys Martínez Montesino<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-8183-3685>

Bárbara Marrero Sanchez<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-9267-2143>

Yaimé Josefina González González<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0002-7308-6197>

Aenny Armas Cayarga<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0002-7642-6564>

<sup>1</sup>Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (IPK). La Habana, Cuba.

<sup>2</sup>Centro de Inmunoensayo. La Habana, Cuba.

\*Autor para correspondencia: [licel@ipk.sld.cu](mailto:licel@ipk.sld.cu)

## RESUMEN

**Introducción:** Los ensayos para cuantificar el ADN del virus de la hepatitis B (VHB) o carga viral son imprescindibles en el diagnóstico y en el seguimiento de los pacientes con hepatitis B crónica; de ahí que estén disponibles estuches diagnósticos para esta función. En el presente estudio se muestra la validación de SUMASIGNAL VHB (un paso), el cual es un sistema de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RCP-TR) para la cuantificación del genoma del VHB, propuesto por el Centro de Inmunoensayo.

**Objetivo:** Evaluar el desempeño analítico de SUMASIGNAL VHB (un paso).

**Métodos:** Se utilizó un panel de 80 muestras de suero bien caracterizadas y el Tercer Estándar Internacional de la OMS para las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos del virus de la hepatitis B. Se determinaron las características del ensayo como especificidad

clínica, especificidad analítica (reactividad cruzada), rango lineal o linealidad y exactitud, precisión intraensayo y comparación con un ensayo de referencia.

**Resultados:** La especificidad analítica y clínica fue del 100 %. Al evaluar la linealidad y exactitud con un estándar de referencia de la OMS, se obtuvo que la totalidad de las diferencias entre los  $\text{Log}_{10}$  del valor obtenido y el de referencia resultaron inferiores a 0,5  $\text{Log}_{10}$  ( $r= 0,9977$  y  $r^2= 0,9954$ ). Además, se obtuvieron bajos coeficientes de variación intraensayo. La evaluación comparativa con el estuche comercial Artus HBV RG PCR kit mostró una correlación fuerte ( $r= 0,8882$ ).

**Conclusiones:** SUMASIGNAL VHB (un paso) es un ensayo fácil de realizar manualmente, es rápido e incluye reactivos de extracción de ácidos nucleicos. Teniendo en cuenta la validez del método para el uso previsto, puede ser recomendado para su introducción en el diagnóstico, la vigilancia y la indicación de tratamiento en los pacientes con hepatitis B crónica.

**Palabras clave:** reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real; hepatitis B; cuantificación del ADN-VHB; validación de sistemas diagnósticos.

## ABSTRACT

**Introduction:** Assays to quantify hepatitis B virus (HBV) DNA or viral load are indispensable for the diagnosis and follow-up of patients with chronic hepatitis B, hence the availability of diagnostic kits for this purpose. The present study deals with the validation of HBV SUMASIGNAL (one step), a real time polymerase chain reaction (RT-PCR) system for quantification of the HBV genome proposed by the Immunoassay Center.

**Objective:** Evaluate the analytical performance of HBV SUMASIGNAL (one step).

**Methods:** Use was made of a panel of 80 well characterized serum samples and the Third WHO International Standard for hepatitis B virus nucleic acid amplification techniques. Determination was performed of assay characteristics such as clinical specificity, analytical specificity (cross-reactivity), linear range or linearity and accuracy, intra-assay precision and comparison with a reference assay.

**Results:** Analytical and clinical specificity was 100%. Evaluation of linearity and accuracy with a WHO reference standard revealed that all the differences between the  $\text{log}_{10}$  of the value obtained and the reference value were lower than 0.5  $\text{log}_{10}$  ( $r= 0.9977$  and  $r^2= 0.9954$ ). The intra-assay variation coefficients obtained were low. Comparative evaluation with the commercial Artus HBV RG PCR kit showed a strong correlation ( $r= 0.8882$ ).

**Conclusions:** The assay HBV SUMASIGNAL (one step) is easy to conduct manually, fast and includes reagents for nucleic acid extraction. Based on the validity of the method for the use in mind, it may be recommended for incorporation into the diagnosis, surveillance and treatment of patients with chronic hepatitis B.

**Keywords:** real time polymerase chain reaction; hepatitis B; HBV DNA quantification; validation of diagnostic systems.

Recibido: 16/12/2019

Aceptado: 21/05/2020

## Introducción

Se estima que existe 257 millones de personas con infección crónica por el virus de la hepatitis B (VHB) globalmente. Para tener una idea de la magnitud, en 2015, la hepatitis B ocasionó 887 000 muertes, la gran mayoría debido a sus complicaciones (cirrosis y el carcinoma hepatocelular) según cifras de la Organización Mundial de la Salud (OMS).<sup>(1)</sup> En el 2015, los Estados Miembros de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) aprobaron el primer Plan de acción para la prevención y el control de las hepatitis virales a escala regional, en el que se promueven políticas e intervenciones de salud pública encaminadas a eliminar las hepatitis virales en los Estados Miembros hacia el 2030. En el caso de la hepatitis B para lograr esta meta es fundamental contar con directrices para la prevención, el diagnóstico y la atención médica de la infección por el VHB.<sup>(2,3)</sup>

Una de las herramientas moleculares para el estudio de la infección por el VHB es la detección cuantitativa del ADN del VHB o carga viral. La carga viral es imprescindible para definir la existencia de replicación del VHB en pacientes con un perfil serológico compatible con infección crónica, para investigar la presencia de infección oculta por el VHB (HBsAg negativo) y para monitorear la respuesta al tratamiento antiviral y la definición de respuesta virológica.<sup>(4)</sup> Además, es fundamental para estudiar a las embarazadas con HBsAg positivo con el propósito de instaurar terapia antiviral. Lo anterior coadyuvaría a la eliminación de la transmisión materno-infantil de la hepatitis B y el logro de las metas de impacto 2020 y hacia la meta del 2030.

El estuche SUMASIGNAL VHB (un paso) propuesto por el Centro de Inmunoensayo (CIE), Cuba, es un método cuyo principio se basa en una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RCP-TR). Dicho método fue evaluado internamente en el CIE, resultando ser un sistema de RCP-TR simple, rápido, específico, preciso y exacto para la cuantificación del ADN del VHB en suero y plasma humanos, útil para el diagnóstico y el manejo de la enfermedad.<sup>(5)</sup> El presente trabajo tiene como objetivo evaluar el desempeño analítico de SUMASIGNAL VHB (un paso).

## **Métodos**

### **Muestras clínicas**

Se conformó un panel de sueros, que se conservó en condiciones adecuadas (-20 °C). El panel comprendía 80 muestras residuales de sueros con las siguientes características: 20 muestras negativas al HBsAg y al ADN-VHB; 10 muestras negativas al HBsAg y positivas a otros agentes infecciosos que pueden co-infectar junto al VHB o poseen cuadros clínicos similares como: virus de la hepatitis A (IgM anti-VHA, 2 muestras), virus de la hepatitis C (VHC, 2 muestras), virus de la hepatitis E (VHE, 1 muestra), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH, 2 muestras), citomegalovirus (CMV, 2 muestras) y virus dengue (IgM anti-dengue, 1 muestra). Además, 50 muestras positivas al ADN-VHB analizadas previamente por los estuches COBAS® TaqMan® HCV Test v2.0 (Roche), Artus RG HBV PCR kit (Qiagen) y una RCP-TR estandarizada y evaluada en el Laboratorio de referencia de hepatitis virales del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK),<sup>(6)</sup> dichas muestras abarcaban todo el rango lineal de cuantificación del ensayo SUMASIGNAL VHB (un paso) desde 5,0E+02 a 5,0E+09 UI/mL.

### **Consideraciones éticas**

En el presente estudio se utilizaron muestras residuales de suero que fueron enviadas al laboratorio del IPK y del Instituto de Gastroenterología para diagnóstico molecular del VHB y que se encontraban adecuadamente conservadas en congelación. Se utilizaron muestras enumeradas respetando la identidad de estas. No se utilizaron con otros fines y los resultados obtenidos formaron parte del estudio de validación solamente.

### **Estándar Internacional**

Se utilizó el Tercer Estándar Internacional de la OMS para las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos del VHB (*National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC*

código 10/264) (EI) para determinar la exactitud y linealidad. Este reactivo es de genotipo A2 serotipo adw2 y posee una concentración de 850 000 UI/mL ( $\sim 5,93 \log_{10}$  UI/mL), cuando se reconstituye en 0,5 mL de agua libre de nucleasas.<sup>(7)</sup>

### **Evaluación de la prueba inicial de desempeño**

Se determinaron las características del ensayo tales como especificidad clínica, especificidad analítica (reactividad cruzada), rango lineal o linealidad y exactitud, precisión intraensayo y comparación con un ensayo de referencia.<sup>(8)</sup>

Especificidad clínica o diagnóstica: Se determinó con el análisis de muestras negativas al HBsAg y al ADN-VHB.

Especificidad analítica o reactividad cruzada: Se determinó con el análisis de las muestras negativas al HBsAg y positivas a otros agentes infecciosos que pueden co-infectar junto al VHB o que poseen cuadros clínicos similares.

Linealidad y exactitud: Se utilizó el EI diluido en 0,250 mL de agua libre de nucleasas, para obtener una concentración de  $1700E+06$  UI/mL. Se realizaron diluciones seriadas en base 10 hasta 1:1000, 5 réplicas de cada uno y se incluyó además el estándar puro. Este experimento se realizó en un mismo día. Los resultados en UI/mL se transformaron en  $\text{Log}_{10}$  para su procesamiento final.

Precisión: Fue calculada con el EI en cuatro diluciones, desde 1 700 000 UI/mL hasta 1700 UI/mL para asegurar diferentes concentraciones de ADN (alta, media y baja) con 3 réplicas de cada una.

Estudio de comparación entre SUMASIGNAL VHB (un paso) y un ensayo de referencia (Artus<sup>®</sup> HBV RG PCR Kit): Se analizaron por ambos métodos paralelamente 50 muestras positivas al ADN-VHB que abarcasen todo el rango lineal de cuantificación del ensayo SUMASIGNAL VHB (un paso). De ellas, el 38 % de las muestras tenía una carga viral (CV) en  $\text{Log}_{10}$  entre 3 y 5, 34 % estaban entre  $>5$  y 7 y el 28 % eran de  $\text{Log}_{10} > 7$ .

### **Ensayo a evaluar**

#### **SUMASIGNAL VHB (un paso)**

Este estuche diagnóstico es una prueba *in vitro* de amplificación de ácidos nucleicos para la cuantificación del ADN del VHB en suero o plasma humano. El ensayo utiliza una solución de lisis que permite la lisis rápida de la partícula viral y la liberación del ADN del VHB a partir de suero o plasma humano. A través de una RCP-TR es posible realizar la cuantificación del ADN del VHB por variaciones en la fluorescencia que se producen al ocurrir dicha reacción. En la mezcla de PCR están presentes dos cebadores que flanquean

una región conservada en el genoma del VHB (gen S) y una sonda fluorescente específica que permite la detección cuantitativa. Se elimina la extracción del ADN de las muestras pues solo es necesario añadir el suero o plasma humano directamente al tubo de PCR y mezclarlo con la solución de lisis para amplificar posteriormente el ADN liberado. El sistema utiliza además un control interno para detectar posibles inhibiciones de la RCP, evitando la aparición de resultados falsos negativos. Incorpora también un marcador de referencia (ROX) para eliminar las variaciones que pudieran existir entre los diferentes tubos a través del análisis automático de la relación entre la fluorescencia de las muestras y del marcador ROX, lo que permite una cuantificación más exacta. El sistema de detección utiliza la enzima Uracil-N-Glicosilasa (UNG), que degrada completamente los restos del producto amplificado de reacciones anteriores, lo que evita la obtención de resultados falsos positivos. El límite de detección de este ensayo es de 377,47 UI/mL utilizando el estándar internacional de la OMS.<sup>(5)</sup>

Cada tubo de reacción de la RCP-TR contó con un volumen final de 50 µL que consistió en 40 µL de una mezcla de RCP lista para su uso y 10 µL de cada una de las referencias cuantitativas (A-D) los controles positivos y negativos o las muestras con la solución de lisis después de incubadas durante 10 min a temperatura ambiente (20-25 °C). Los parámetros de la reacción consistieron en 2 min. a 50 °C y 2 min a 94 °C, seguido de 45 ciclos repetitivos de 94 °C por 5 s y 57 °C por 30 s. El programa de la PCR-TR se configuró en el equipo SLAN 96-P (Shanghai Hongshi Medical Technology Co., Ltd, Shanghai, China) según manual del estuche.

### **Ensayos de referencia**

Para la extracción del ADN del VHB se utilizó el estuche QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Alemania) de forma manual, según instrucciones del fabricante. Para la cuantificación del ADN se utilizó el estuche artus® HBV RG PCR Kit (Qiagen, Alemania) según instrucciones del fabricante. El programa de la PCR-TR se configuró en el equipo Rotor Gene Q (Qiagen, Alemania) según manual del estuche.

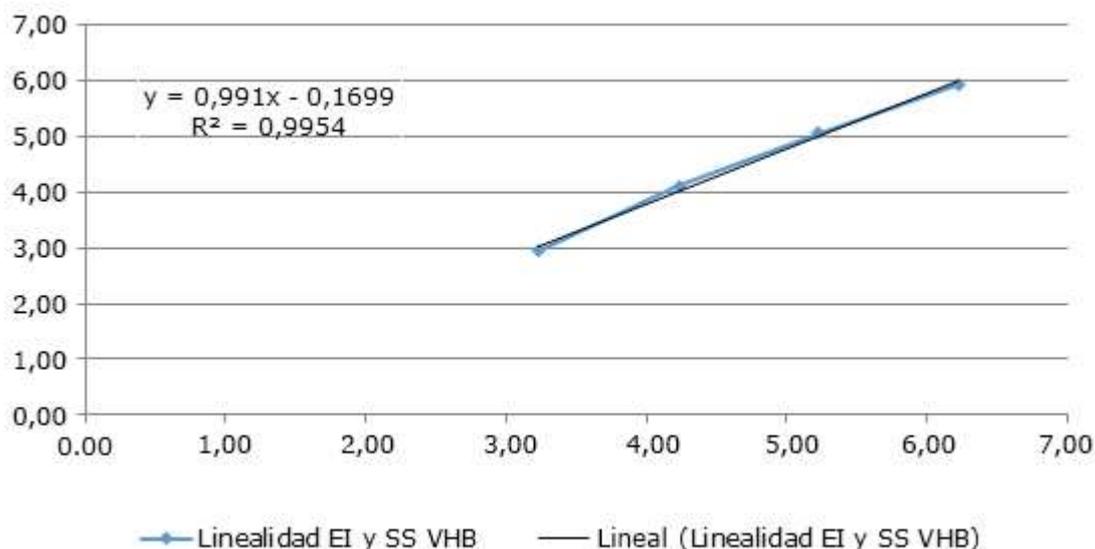
### **Análisis estadístico**

Para el análisis de los resultados se confeccionó una base de datos en Microsoft® Excel. Se calcularon medidas de estadística descriptiva tales como la distribución de frecuencias, promedios y la desviación estándar. Se calculó el coeficiente de correlación de Pearson (r) y el análisis de regresión lineal para los ensayos de exactitud y linealidad con el EI. Para evaluar la precisión intraensayo se determinó el promedio, la desviación estándar (DE) y el

coeficiente de variación ( $CV = (DE/Promedio) \times 100$ ) para cada concentración evaluada del EI dentro de un mismo ensayo. Para comparar el método a evaluar y un ensayo de referencia se determinó el coeficiente de correlación.

## Resultados

La especificidad clínica y especificidad analítica o reactividad cruzada del ensayo SUMASIGNAL VHB (un paso) fueron del 100 %. En el ensayo de linealidad y exactitud con el EI se alcanzaron resultados satisfactorios para una  $r^2 = 0,9954$  y una diferencia de los  $\log_{10}$  esperado vs. observado de menos de 0,5 en todas las diluciones, respectivamente (Fig. 1, Tabla 1).



Los resultados están expresados en  $\log_{10}$ . El coeficiente de regresión  $r^2 = 0,9954$  comprueba la linealidad en el rango analizado.

**Fig. 1** - Resultados del experimento de linealidad entre los resultados esperados del EI y los obtenidos con SUMASIGNAL VHB (un paso).

**Tabla 1** - Comparación entre los títulos esperados de las diluciones del EI y los títulos obtenidos con el estuche SUMASIGNAL VHB (un paso)

EI	Título esperado (UI/mL)	$\log_{10}$ esperado	Media $\log_{10}$ observado	Diferencia $\log_{10}$ esperado vs. observado (exactitud)
Puro	1,70E+06	6,23	5,94	0,29
1:10	1,70E+05	5,23	5,06	0,17
1:100	1,70E+04	4,23	4,12	0,11
1:1000	1,70E+03	3,23	2,95	0,28

EI: estandar internacional

El coeficiente de correlación entre ambos resultados fue de  $r=0,9977$ .

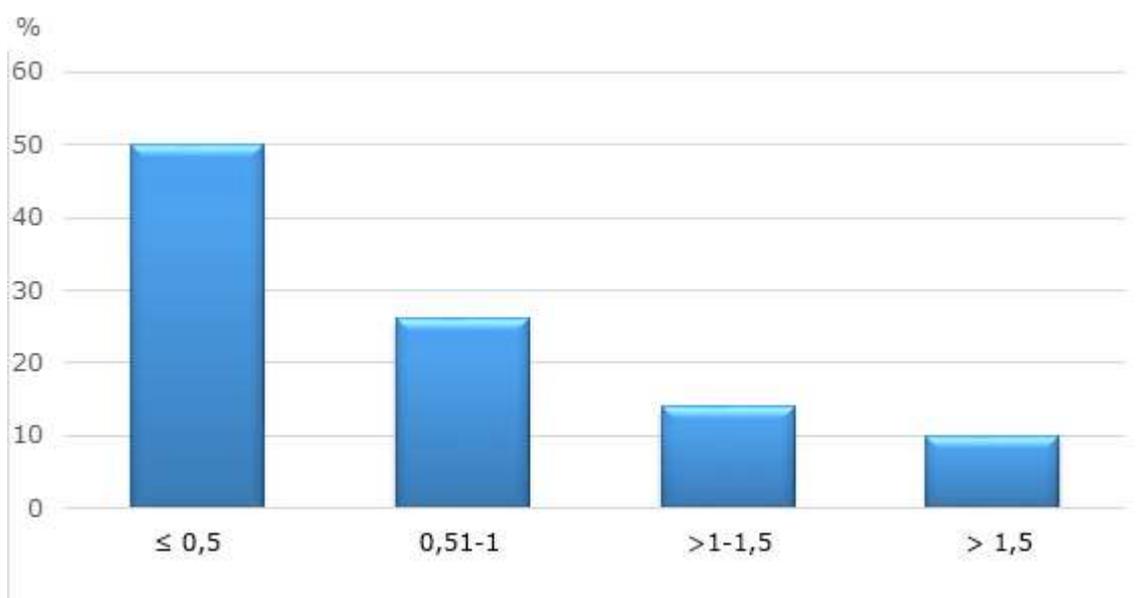
En la tabla 2 se muestran los resultados de la evaluación de la precisión intraensayo, donde el CV fue de menos del 3 %.

**Tabla 2** - Precisión intraensayo del ensayo SUMASIGNAL VHB (un paso) utilizando el EI para cuantificar el ADN del VHB

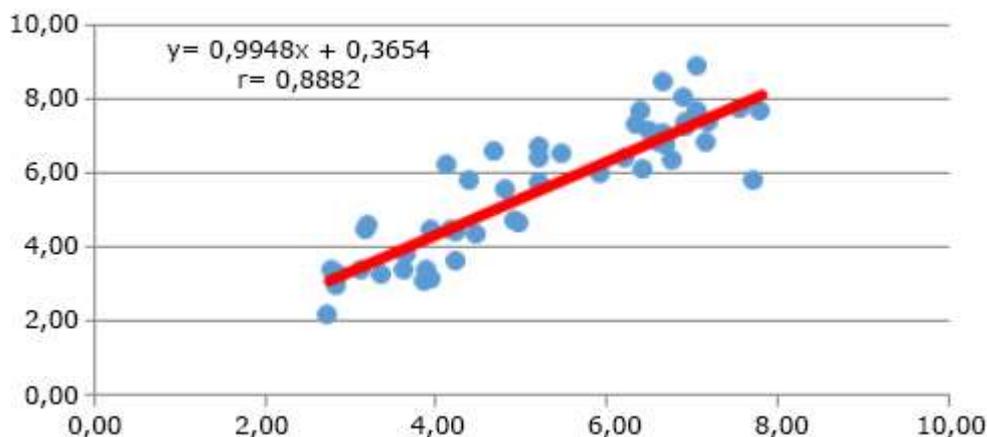
Concentración de ADN del VHB (UI/mL)/Log <sub>10</sub>	Log <sub>10</sub> concentración de ADN del VHB		
	Promedio	DE	CV (%)
EI puro (1 700 000)/6,23	5,94	0,058	0,99
EI 1:10 (170 000)/5,23	5,06	0,064	1,27
EI 1:100 (17 000)/4,23	4,12	0,032	0,79
EI 1:1000 (1 700)/3,23	2,95	0,081	2,75

EI: estándar internacional, DE: desviación estándar, CV: coeficiente de variación.

Se cuantificó el ADN-VHB en 50 muestras por ambos métodos, el objeto de evaluación y el de referencia; 25 (50 %) muestras obtuvieron diferencias  $\text{Log}_{10} \leq 0,5$ ; 13 (26 %) muestras obtuvieron una diferencia de logaritmo de entre 0,51 y 1; 7 (14 %) muestras entre  $>1$  y 1,5; y 5 (10 %) muestras  $>1,5$  (Fig. 2). En el diagrama de dispersión (Fig. 3) se muestran los  $\text{Log}_{10}$  de las concentraciones de ADN obtenidas por SUMASIGNAL VHB (un paso) y Artus HBV RG PCR kit. Se obtuvo un coeficiente de correlación  $r=0,8882$ .



**Fig. 2** - Comportamiento de las diferencias entre los ensayos SUMASIGNAL VHB (un paso) y Artus HBV RG PCR (Log<sub>10</sub>).



**Fig. 3** - Log<sub>10</sub> de las concentraciones de ADN obtenidas por SUMASIGNAL VHB (un paso) (eje X) y artus HBV RG PCR kit (eje Y).

## Discusión

En el presente estudio se evaluó el desempeño analítico del ensayo SUMASIGNAL VHB (un paso), un método propuesto por el CIE para cuantificar el ADN-VHB basado en el principio de RCP-TR; el cual tiene como característica la eliminación del paso de extracción del ADN de las muestras, pues solo necesita añadir la misma directamente al tubo de RCP y mezclarlo con la solución de lisis para amplificar posteriormente el ADN liberado. La RCP-TR se considera el estándar de oro para la cuantificación de ácidos nucleicos. Además, es una herramienta diagnóstica poderosa que permite obtener resultados de forma rápida, reproducibles y exactos reduciendo al mínimo el riesgo de contaminaciones.<sup>(9,10)</sup>

La especificidad clínica y especificidad analítica o reactividad cruzada obtenidas fueron excelentes, comparable con la obtenida por *Armas Cayarga* y otros al evaluar internamente dicho ensayo,<sup>(5)</sup> y es similar a otros ensayos de su tipo, en los que se han obtenido resultados de más del 97 %, utilizando muestras seronegativas al VHB.<sup>(6,9,10,11,12)</sup>

La utilización del Tercer Estándar Internacional de ADN-VHB de la OMS, reconocido como el reactivo de referencia para las técnicas de detección de ácidos nucleicos, permite obtener resultados más sólidos y exactos, y su uso ha resuelto el problema en la estandarización de los ensayos cuantitativos al unificar los resultados en UI/mL.<sup>(7,10,13)</sup> Además, ha permitido comparar y armonizar resultados entre diferentes laboratorios y diferentes ensayos y el establecimiento de límites regulatorios y guías de tratamiento.<sup>(7)</sup>

En el presente estudio se obtuvieron diferencias mínimas entre los log<sub>10</sub> esperados en relación a los obtenidos, sin superar diferencias de más de 0,5 Log<sub>10</sub> (valor de corte

empleado para evaluar una diferencia clínicamente significativa) lo cual brinda seguridad en el diagnóstico, al apuntar que la variabilidad de los resultados de la prueba no pueda ser confundida como un cambio de la carga viral del paciente.<sup>(8,14)</sup> Asimismo, la ecuación lineal mostró muy buenos resultados (pendiente cercana al valor de 1 e intercepto cercano al valor 0) con un coeficiente de regresión  $r^2 = 0,9954$ , en los que todos los puntos evaluados indicaron una línea recta, lo cual revela que conociendo uno de los valores (esperado) se puede predecir el resultado (observado) perfectamente.

Lograr una buena precisión es esencial en los ensayos de cuantificación de ácidos nucleicos. Se ha planteado que en los ensayos de RCP-TR se puede lograr un CV de 1-3 % para el valor del Ct.<sup>(15)</sup> Algunos autores apuntan a que la imprecisión no debe ser mayor que el 30 %.<sup>(8)</sup> El sistema evaluado logró un excelente CV intraensayo, con mínima dispersión de los resultados al realizar réplicas del estándar de la OMS en diferentes concentraciones y es muy similar al obtenido por otros autores a nivel nacional e internacional.<sup>(5,6,11,12,16,17)</sup>

Al comparar la técnica evaluada con el ensayo de referencia, el 76 % de las muestras clínicas obtuvieron resultados con diferencias  $\text{Log}_{10} \leq 1$ . Si bien las diferencias de 0,5 son las calificadas dentro del intervalo de tolerancia clínica, el coeficiente de correlación de Pearson fue de 0,8882, lo cual indica una fuerte correlación entre las pruebas y gran precisión utilizando 50 muestras clínicas de suero que abarcaban todo el rango de cuantificación de SUMASIGNAL VHB (un paso), lo que permite compararla con otras técnicas comerciales. Si tenemos en cuenta que estos sistemas disponibles comercialmente poseen un costo elevado, SUMASIGNAL VHB (un paso) podría ser una alternativa para los países de bajos recursos.

La técnica evaluada utiliza controles internos, que descarta la posibilidad de inhibidores en las muestras que inhiben la RCP originando falsos negativos. La inhibición de los ensayos moleculares suele ocurrir por alteraciones en el pH, la concentración de iones, o la viscosidad o por inhibición directa de la enzima polimerasa.<sup>(8,18)</sup> Este es un aspecto importante a tener en cuenta ya que asegura la calidad de los resultados.

La limitación de este estudio diagnóstico consiste en su límite de detección definido en 377,47 UI/mL<sup>(5)</sup> debido obviamente a su método de extracción, lo cual impide su uso como estudio de pesquisa en bancos de sangre (identificar muestras en "periodo de ventana"), para determinar casos de infecciones ocultas, en que la carga viral es usualmente baja (< 200 UI/mL) o para definir respuesta virológica en pacientes tratados con análogos de nucleos(t)idos (AN), ya que esta se define justamente con la no detección del ADN-VHB, precisándose ensayos diagnósticos de bajos límites de detección.<sup>(4,19)</sup>

Comúnmente se ha estimado la indicación de terapia antiviral de la hepatitis B crónica cuando los niveles de ADN-VHB > 20 000 UI/mL, entre otros marcadores bioquímicos, histológicos y factores del huésped (edad, duración de la infección, estadio de la enfermedad, entre otros). Cuba adopta igualmente este criterio para indicación de tratamiento, proponiendo como procedimiento preferencial monoterapias con AN de alta barrera de resistencia a largo plazo: Entecavir (ETV), Tenofovir alafenamida (TAF) y Fumarato de disoproxilo de tenofovir (TDF).<sup>(4,19,20)</sup> No obstante, en la práctica clínica, se ha visto que algunos pacientes con hepatitis B crónica tienen niveles fluctuantes de ADN-VHB, que pueden variar desde valores indetectables hasta >2 000 000 UI/mL,<sup>(21)</sup> de ahí que el monitoreo seriado de la carga viral es más importante que un único valor de corte arbitrario para la necesidad de tratamiento.<sup>(19)</sup> De acuerdo con estos planteamientos, SUMASIGNAL VHB (un paso) podría usarse en la red diagnóstica identificando a los pacientes con infección crónica tributarios de tratamiento antiviral y a las embarazadas en cuya pesquisa se confirme la presencia del HBsAg.

En conclusión, el estuche SUMASIGNAL VHB (un paso) es un ensayo fácil de realizar manualmente y rápido, ya que se obtienen los resultados entre 1,5 a 2 h aproximadamente (entre procesamiento de las muestras, RCP-TR e interpretación de los resultados). Incluye reactivos de extracción de ácidos nucleicos, asegurando su uso sin necesidad de comprar reactivos comerciales de extracción. Teniendo en cuenta la validez del método para el uso previsto, el estuche SUMASIGNAL VHB (un paso) puede ser recomendado para su introducción en el diagnóstico, la vigilancia y la indicación de tratamiento en los pacientes con hepatitis B crónica.

## Referencias bibliográficas

1. Organización Mundial de la Salud. Hepatitis B. 19 de julio de 2019. [acceso 11/09/2019]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>
2. Organización Panamericana de la Salud. Nuevas generaciones sin la infección por el VIH, la sífilis, la hepatitis B y la enfermedad de Chagas en las Américas 2018. ETMI Plus. Washington, DC; 2019 [acceso 11/09/2019]. Disponible en: <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/50993>

3. Organización Panamericana de la Salud. La hepatitis B y C bajo la lupa. La respuesta de salud pública en la Región de las Américas 2016. Washington, DC: OPS; 2016 [acceso 11/09/2019]. Disponible en: <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/31447>
4. European Association for the Study of the Liver. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. J Hepatol 2017 [acceso 11/09/2019];67:j370-98. Disponible en: <http://doi: 10.1016/j.jhep.2017.03.021>. Epub 2017 Apr 18.
5. Armas Cayarga A, Perea Hernández Y, González González YJ, Figueredo Lago JE, Valdivia Álvarez IY, Gómez Cordero I, et al. Performance characteristics of a fast-real-time PCR assay for hepatitis B virus DNA quantification. Biologicals. 2019 [acceso 11/09/2019];58:22-7. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2019.01.003>
6. Rodríguez L, Montalvo MC, Sariego S, Bello M, Mora E, Kourí V, et al. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para la cuantificación del ADN del virus de la hepatitis B. Rev Cubana Med Trop. 2012 [acceso 11/09/2019];64(3). Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revcubmedtro/cmt-2012/cmt123i.pdf>
7. Fryer JF, Heath AB, Wilkinson DE, Minor PD. 2017. A collaborative study to establish the 3rd WHO international standard for hepatitis B virus for nucleic acid amplification techniques. Biologicals 2016 [acceso 11/09/2019];46:57-63. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2016.12.003>
8. Burd E. Validation of laboratory developed molecular assays for infectious diseases. Clin Microbiol Rev. 2010;23:570-6. doi:10.1128/CMR.00074-09
9. Valsamakis A. Molecular Testing in the Diagnosis and Management of Chronic Hepatitis B. Clin Microbiol Rev. 2007;20(3):426-39. doi:10.1128/CMR.00009-07
10. Datta S, Chatterjee S, Veer V. Recent advances in molecular diagnostics of hepatitis B virus. World J Gastroenterol. 2014 [acceso 11/09/2019];20(40):4615-25. Disponible en: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v20/i40/14615.htm> DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v20.i40.14615>
11. Torres Santos AP, Levi JE, Figueiredo Lemos M, Calux SJ, Takano Oba I, Moreira RC. An in-house real-time polymerase chain reaction: standardization and comparison with the Cobas Amplicor HBV monitor and Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HBV tests for the quantification of hepatitis B virus DNA. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2016;111(2):134-40. doi: 10.1590/0074-02760150415.

12. Liu C, Chang L, Jia T, Guo F, Zhang L, Ji H, Zhao J, Wang L. Real-time PCR assays for hepatitis B virus DNA quantification may require two different targets. *Virology J.* 2017;14:94. DOI 10.1186/s12985-017-0759-8
13. Baylis SA, Wallace P, McCulloch E, Niesters HGM, Nübling CM. Standardization of nucleic acid tests: the approach of the World Health Organization. *J Clin Microbiol.* 2019;57:e01056-18. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/JCM.01056-18>
14. Barriga Angulo G, Solís Trejo M Aceves Rosas A. Estudio comparativo de dos pruebas para determinar carga viral para VIH-1 y VHC basadas en RT-PCR de tiempo real. *Rev Mex Patol Clin.* 2009 [acceso 11/09/2019];56(4):247-56. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2009/pt094c.pdf>
15. Ding C, Cantor CR. Quantitative analysis of nucleic acids-the last few years of progress. *J Biochem Mol Biol.* 2004;37(1):1-10. DOI: 10.5483/bmbrep.2004.37.1.001
16. de Oliveira dos Santos, Botelho Souza LF, Borzacov LM, Villalobos-Salcedo JM, Souza Vieira D. Development of cost-effective real-time PCR test: to detect a wide range of HBV DNA concentrations in the western amazon region of Brazil. *Virology J.* 2014;11:16. doi:10.1186/1743-422X-11-16
17. Aguiar J, Rodríguez L, León Y, Freyre F, Silva JA, Montalvo MC, Gell O, Estrada R, Canales E, Muzio V, Guillén G, Pentón E, Aguilar JC. Hepatitis B virus DNA quantification by a cost effective and simple real time PCR in Cuban carriers. *J Infect Dis Therap.* 2014 [acceso 11/09/2019];2:49-58. DOI: Disponible en: <http://dx.doi.org/10.14205/2310-9386.2014.02.02.4>
18. Ballagi-Pordany A, Belak S. The use of mimics as internal standards to avoid false negatives in diagnostic PCR. *Mol. Cell Probes.* 1996;10:159-64. DOI: 10.1006/mcpr.1996.0022
19. Terrault NA, Lok ASF, McMahon BJ, Chang KM, Hwang JP, Jonas MM, Brown RS Jr., Bzowej NH, Wong JB. Update on prevention, diagnosis, and treatment of chronic hepatitis B: AASLD 2018 hepatitis B guidance. *Hepatology.* 2018;67:1560-99. DOI 10.1002/hep.29800
20. Ministerio de Salud Pública. Plan Estratégico Nacional para la prevención y control de las ITS, el VIH y las hepatitis 2019-2023. La Habana: Ministerio de Salud Pública; 2019. p. 159-60.
21. Chu CJ, Hussain M, Lok AS. Quantitative serum HBV DNA levels during different stages of chronic hepatitis B infection. *Hepatology.* 2002;36:1408-15. DOI: 10.1053/jhep.2002.36949

### **Conflicto de intereses**

No se declara conflicto de intereses.

### **Contribuciones de los autores**

Licel de los Ángeles Rodríguez Lay: Participó en la conceptualización, metodología, validación, análisis datos, escritura original y preparación del manuscrito, revisión y edición, y lectura y aprobación de la versión final.

Maria Caridad Montalvo: Participó en la metodología, validación, análisis datos, revisión y edición, y lectura y aprobación de la versión final.

Marité Bello Corredor: : Participó en la metodología, validación, análisis datos, revisión y edición, y lectura y aprobación de la versión final.

Dayesi López Hernández: : Participó en la metodología, validación, análisis datos, revisión y edición, y lectura y aprobación de la versión final.

Yenisleidys Martínez Montesino: : Participó en la validación, revisión y edición, y lectura y aprobación de la versión final.

Bárbara Marrero Sánchez: : Participó en la validación, y lectura y aprobación de la versión final.

Yaimé Josefina González González: : Participó en la metodología, revisión y edición, y lectura y aprobación de la versión final.

Anny Armas Cayarga: : Participó en la metodología, revisión y edición, y lectura y aprobación de la versión final.