

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE MEDICINA

CARRERA DE BIOQUÍMICA CLÍNICA

DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE BIOQUÍMICA
CLÍNICA

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA NARRATIVA: MARCADORES SEROLÓGICOS Y
MOLECULARES UTILIZADOS PARA DETECCIÓN DEL VIRUS DE HEPATITIS B
EN DONANTES DE SANGRE PARA UN NIVEL ÓPTIMO DE SEGURIDAD
TRANSFUSIONAL

POR: STALIN RODRIGO FLORES CARVAJAL

DIRECTORA: MTR. ROSA DE FÁTIMA CHIRIBOGA PONCE

QUITO, 2020

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Stalin Rodrigo Flores Carvajal, C.I. 1719367334; autor del trabajo de graduación intitulado: Marcadores serológicos y moleculares utilizados para detección del virus de hepatitis B en donantes de sangre para un nivel óptimo de seguridad transfusional, previa a la obtención del grado académico de BIOQUÍMICA CLÍNICA en la Facultad de Medicina-Carrera de Bioquímica:

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.



Stalin Rodrigo Flores Carvajal, C.I. 1719367334

DEDICATORIA

A mis padres por su inmenso amor, su sacrificio y motivación para definir mi formación académica.

A mis queridas hermana y sobrina, por ser la inspiración diaria para cumplir mis metas.

A mi amada Amanda por su apoyo incondicional en cada momento.

A mis parientes y amigos que estuvieron pendientes en las duras etapas de mi vida.

AGRADECIMIENTO

A Dios por darme la vida y permitir que me encuentre en este momento muy especial para mí, sígueme bendiciendo padre y no me desampares.

A mis padres Rodrigo y Elena por su amor, sus valores, sus logros y esfuerzo para la formación de sus hijos.

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador y a la Facultad de Medicina por darme la oportunidad de ser parte de la comunidad universitaria y de los grandes profesionales para nuestro país Ecuador.

A mi directora Master Rosita Chiriboga Ponce por su gran motivación y enseñanza en el transcurso de mi carrera universitaria en mi prestigiosa universidad la PUCE.

A Elizabeth Vaca por su ayuda y compromiso con los estudiantes de la Carrera de Bioquímica Clínica.

A mi amada Amanda por su apoyo incondicional y por ser mi compañera en los buenos y malos momentos.

A mis tías Diana y Justina por haberme apoyado en los momentos difíciles de vida.

A mi amigo del alma David por ser mi apoyo fundamental en mi etapa universitaria.

RESUMEN

Título de la disertación: *Marcadores serológicos y moleculares utilizados para detección del virus de hepatitis B en donantes de sangre para un nivel óptimo de seguridad transfusional año 2020*

Introducción: la detección del virus de la hepatitis B (VHB) ha promovido en los bancos de sangre y hemocentro el uso de varios marcadores serológicos y la introducción de la prueba molecular MP-NAT o ID-NAT para ofrecer una seguridad transfusional, sin embargo existe controversia en la implementación de la prueba molecular NAT debido a la presencia de donantes de sangre asintomáticos con baja concentración del ADN viral o presencia de hepatitis oculta (OBI) que interfiere con el límite de detección de la prueba molecular convirtiéndose en un problema su detección por un solo método, por lo que se recomienda el uso de marcadores serológicos de HBsAg, anti-core HBc e ID-NAT o triplex NAT. También se suman estrategias como vacunación masiva, pruebas moleculares individuales, selección del donante, autoexclusión, metodologías serológicas más sensibles y específicas, así como técnicas de concentración del ADN viral para su detección, sumándose la recomendación de estudios de costo-beneficio. **Materiales y Métodos:** estudio bibliográfico narrativo descriptivo de evidencias científicas relacionadas al tema propuesto y a la población de estudio, se utilizaron fuentes primarias de artículos de revistas indexadas utilizando descriptores Mesh, para la selección de información se utilizó la metodología de STROBE. **Conclusiones y Recomendaciones:** Los autores sugieren que la elección de los marcadores serológicos y moleculares debe realizarse en base a investigaciones que demuestren el beneficio para los pacientes y la seguridad transfusional. El virus de la hepatitis B posee varias particularidades como mutaciones, replicación viral lenta que ocasiona una carga viral indetectable en donantes portadores de hepatitis oculta (OBI), por lo que el excluir marcadores serológicos como HBsAg o anti-core HBc produciría posibles transmisiones transfusionales del virus como se ha demostrado en algunos estudios en los que existieron donantes NAT negativo/anti-HBc reactivo, en contraste también se han reportado falsos positivos en anti-HBc. Todos estos datos sugieren que debe mantenerse el uso en paralelo de los marcadores serológicos y moleculares para la identificación inequívoca del virus B en los donantes de sangre. Una de las recomendaciones es promover la investigación del riesgo residual de la infección sumada al costo-beneficio de la implementación de algoritmo de detección en la población de donantes de sangre para una seguridad transfusional.

ABSTRACT

Title: Serological and molecular markers used for the detection of hepatitis B virus in blood donors for an optimal level of transfusion safety in 2020

Introduction: the detection of the hepatitis B virus (HBV) has promoted the use of several serological markers in blood banks and hemocenter and the introduction of the molecular test MP-NAT or ID-NAT to offer transfusion safety, however there is controversy in the implementation of the NAT molecular test due to the presence of asymptomatic blood donors with a low concentration of viral DNA or the presence of occult hepatitis (OBI) that interferes with the detection limit of the molecular test, making its detection a problem by a single method, for which the use of serological markers of HBsAg, anti-core HBc and ID-NAT or triplex NAT is recommended. Strategies such as mass vaccination, individual molecular tests, donor selection, self-exclusion, more sensitive and specific serological methodology, as well as viral DNA concentration techniques for its detection are also added, adding the recommendation of cost-benefit studies. **Materials and Methods:** descriptive narrative bibliographic study of scientific evidence related to the proposed topic and the study population, primary sources of indexed journal articles were used using Mesh descriptors, for the selection of information the STROBE methodology was used.

Conclusions and Recommendations: The authors suggest that the choice of serological and molecular markers should be made based on research that demonstrates the benefit for patients and transfusion safety. The hepatitis B virus has several peculiarities such as mutations, slow viral replication that causes an undetectable viral load in donors carrying occult hepatitis (OBI), so excluding serological markers such as HBsAg or anti-core HBc would produce possible transfusion transmissions of the virus, as has been shown in some studies in which there were NAT negative / reactive anti-HBc donors, in contrast, false positives have also been reported in anti-HBc. All these data suggest that you should keep using the serological and molecular markers in parallel for the unequivocal identification of virus B in blood donors. One of the recommendations is to promote the investigation of the residual risk of the infection added to the cost-benefit of the implementation of the detection algorithm in the blood donor population for transfusion safety.

TABLA DE CONTENIDOS

| | |
|--|-----|
| DEDICATORIA | ii |
| AGRADECIMIENTO | iii |
| RESUMEN..... | iv |
| ABSTRACT | v |
| LISTA DE TABLAS | 8 |
| LISTA DE FIGURAS..... | 9 |
| LISTA DE SIGLAS..... | 10 |
| INTRODUCCIÓN..... | 12 |
| 1. CAPÍTULO I | 15 |
| 1.1 Justificación | 15 |
| 1.2 Planteamiento del Problema | 16 |
| 1.3 OBJETIVOS..... | 17 |
| 1.3.1 Objetivo General..... | 17 |
| 1.3.2 Objetivos Específicos..... | 17 |
| 2. CAPÍTULO II..... | 18 |
| 2.1 MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL..... | 18 |
| 2.1.1 Virus de Hepatitis B | 18 |
| 2.1.2 Partícula Viral | 19 |
| 2.1.3 Respuesta Inmune..... | 20 |
| 2.2 Marcadores Serológicos y Viroológicos para la detección de la infección de Hepatitis B | 21 |
| 2.2.1 Marcadores Serológicos | 21 |
| 2.2.1.1 Antígeno de superficie (HBsAg)..... | 21 |
| 2.2.1.2 Antígeno de replicación (HBeAg)..... | 22 |
| 2.2.1.3 Anticuerpo contra el núcleo del HBV (anti-HBc)..... | 22 |
| 2.2.1.4 Anticuerpo anti-HBe..... | 22 |
| 2.2.1.5 Anticuerpo de superficie del virus (anti-HBs)..... | 22 |
| 2.2.1.6 Antígeno relacionado con el núcleo de la hepatitis B (HBcrAg)..... | 22 |
| 2.3 Marcadores Moleculares..... | 23 |
| 2.3.1 HBV ADN..... | 23 |
| 2.3.2 NAT | 23 |
| 2.3.3 MP-NAT..... | 23 |
| 2.3.4 ID-NAT..... | 24 |
| 2.3.5 Genotipos HBV | 24 |

| | |
|---|----|
| 2.4 Tamizaje de Hepatitis B en donantes de sangre | 24 |
| 2.5 Detección de Hepatitis B | 25 |
| 2.6 MARCO METODOLÓGICO | 27 |
| 2.6.1 Tipo de estudio | 27 |
| 2.6.2 Fuentes de Información | 27 |
| 2.6.3 Búsqueda de Información - sintaxis | 27 |
| 2.6.4 Selección de la Información | 28 |
| 2.6.5 Criterios de Exclusión | 28 |
| 2.6.6 Criterios de Elegibilidad | 30 |
| 2.7 Diagrama de Evaluación de artículos incluidos para el estudio | 31 |
| 3. CAPÍTULO III | 34 |
| 3.1 Resultados | 34 |
| 3.2 Conclusiones basadas en análisis de artículos | 56 |
| 4. CAPÍTULO IV | 56 |
| 4.1 Discusión | 66 |
| 4.2 Conclusiones del estudio | 68 |
| 4.3 Recomendaciones | 69 |
| 5. Bibliografía | 70 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|---|----|
| TABLA 1: Resultados marcadores serológicos | 23 |
| TABLA 2: Diagrama de verificación de los datos requeridos en cada artículo incluidos para el estudio | 31 |
| TABLA 3.1: Marcadores serológicos y moleculares para la detección del virus hepatitis B en donantes de sangre | 60 |
| TABLA 3.2: Comparación de técnicas de amplificación de ácidos nucleicos para hepatitis B | 63 |
| TABLA 3.3: Algoritmos de detección para el virus de hepatitis B | 65 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Partícula viral Dane del HBV circulante en sangre | 19 |
| Figura 2: Pruebas serológicas para el diagnóstico del HBV circulante en sangre | 22 |
| Figura 3: Diagrama de elegibilidad de STROBE | 29 |

LISTA DE SIGLAS

HBV: Virus de Hepatitis B

HCV: Virus de Hepatitis C

VIH: Virus de inmunodeficiencia humana

HBsAg: Antígeno de superficie del virus de Hepatitis B

anti – HBs: Anticuerpo de superficie del virus de Hepatitis B

anti – HBc: Anticuerpo contra el núcleo del virus de Hepatitis B

HBcAg: Antígeno nuclear del virus de Hepatitis B

HBeAg: Antígeno de replicación del virus de Hepatitis B

anti – HBe: Anticuerpo contra el antígeno de replicación del virus de Hepatitis B

HBcrAg: Antígeno relacionado con el núcleo del virus de Hepatitis B

HBV ADN: Ácido desoxirribonucleico del virus de Hepatitis B

NAT: Tecnología de Amplificación de ácidos nucleicos

MP- NAT: Tecnología de Amplificación de ácidos nucleicos por agrupamiento de muestras, multiplex, minipool

ID – NAT: Tecnología de Amplificación de ácidos nucleicos de manera individual

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

pg – ARN: Ácido ribonucleico pre genómico

ORFs: Marcos de lectura superpuestos

TLRs: Receptores tipo Toll

MHC I: Complejo mayor de Histocompatibilidad de clase I

TTIs: Infecciones transmisibles por transfusión

IFN: Interferón

OBI: Infección oculta por el virus de Hepatitis B

MHR: Región hidrofílica del antígeno de superficie, mutante de escape inmunológico

CUE: Unidad de exclusión confidencial

ELISA: Inmunoensayo enzimático

CLIA: Quimioluminiscencia

ECLIA: Electro quimioluminiscencia

CMIA: Quimioluminiscencia de micropartículas

UI/ml: Unidades internacionales por mililitro

WP: Período de ventana

OMS: Organización Mundial de la Salud

OPS: Organización Panamericana de la Salud

MSP: Ministerio de Salud Pública del Ecuador

FDA: Administración de alimentos y drogas

REDS: Grupo de Epidemiología en donantes

ARC: Cruz Roja Americana

CAMS: Academia China de Ciencias Médicas

PUMC: Colegio Médico de la Unión de Pekín

NGI: Instituto Nacional de Genética

NIBSC: Instituto Nacional de Normas y Control Biológico

HEMOAM: Hemocentro de Manaus

STROBE: Mejorar la comunicación de Estudios Observacionales en Epidemiología

INTRODUCCIÓN

Las prácticas de medicina transfusional han ayudado a salvar vidas y a contribuir con la salud de la población mundial, sin embargo, existen efectos adversos manifestados de forma inmediata o tardía que frecuentemente se asocian a infecciones (Organización Panamericana de la Salud, 2011). Aunque las infecciones por transfusión han disminuido cronológicamente con el avance de las metodologías de detección, se ha observado que persisten tasas de transmisión de algunos agentes virales, entre ellos la hepatitis B (Organización Panamericana de la Salud, 2016), el primer registro del reporte de una epidemia por virus de la hepatitis B fue por Lurman en 1885 durante un brote de viruela y uso de vacunas elaboradas con linfa de otras personas que no conocían estar contagiadas con el virus B, igualmente en los años 30 y 40 se observaron casos de hepatitis B luego de la vacunación contra el sarampión, fiebre amarilla y paperas debido a la preparación con estabilizadores provenientes de suero o plasma humano, posteriormente se identificó la transmisión por transfusiones sanguíneas (Toro Montoya & Restrepo Gutierrez, 2011).

La investigación de la hepatitis B se inició hace 50 años cuando se desconocía el agente etiológico de la enfermedad, pero el bioquímico y antropólogo médico Baruch Samuel Blumberg con ayuda de su colega Harley Alter investigaron en un gran número de sueros provenientes de aborígenes australianos con sintomatología de ictericia y descubriendo al agente causal al que denominaron “antígeno Australia (AuAg)” mismo que se convertiría en años posteriores en el primer marcador específico de hepatopatía viral, convirtiéndose en el ganador del premio Nobel en el año 1963, otorgado por el descubrimiento de un nuevo antígeno (Toro Montoya & Restrepo Gutierrez, 2011) (Block, Alter, London, & Bray, 2016). Los primeros ensayos biológicos se basaron en hemaglutinación y el más utilizado en los primeros estudios fue la reacción fijadora del complemento (CFR), pero estos resultados de carácter cualitativos no eran suficientes.

La detección de donantes infecciosos fue estudiada por Blumberg con el uso de agar de gel de doble difusión desarrollado por Ouchterlony en el descubrimiento del antígeno Australia, metodología que fue sensible y específica comparada con otros métodos bioquímicos para el estudio de proteínas, además constituía una técnica muy sencilla de fácil uso y lectura (Block, Alter, London, & Bray, 2016).

En 1970 no se establecía que era exactamente el AuAg, si se trataba de una proteína formada como reacción al patógeno que causa hepatitis, un componente del patógeno o en sí el mismo patógeno, con la ayuda del microscopio electrónico se observó que AuAg

era una partícula redonda de 17 -25 nm diferenciada de los virus en tamaño y forma, para esto Blumberg y su equipo concluyeron que estas partículas no tenían ningún ácido nucleico anclado, fue entonces que David S Dane en Londres descubrió que el antígeno no solo aparecía en pequeñas partículas pleomórficas, sino que también se observó en estructuras más grandes similares a los virus, poco tiempo después en 1971 su colega británico June Almeida logró la liberación de las partículas nucleares de las llamadas “partículas Dane” y demostró por microscopía electrónica que los pacientes infectados por el virus formaron anticuerpos contra este antígeno central pues se concluyó fuertemente que las partículas Dane eran el virus causante de la hepatitis y AuAg sería obviamente el antígeno de superficie del virus (HBsAg) (Block, Alter, London, & Bray, 2016).

Antes de 1972 se estudió el marcaje químico de anticuerpos, fue posible vincular las moléculas fluorescentes a los anticuerpos para el desarrollo de nuevas metodologías, el radioinmunoensayo (RIA) para el agente infeccioso en estudio llamado AUSRIA 125 que era capaz de detectar la unión antígeno-anticuerpo mediante yodo 125 posteriormente, esta nueva prueba desencadenó un avance importante para el tamizaje de donantes de sangre y para el diagnóstico de hepatitis viral introduciéndose rápidamente en la práctica clínica. EL AUSRIA 125 permitió que el ensayo HBsAg muy pronto se complemente con el estudio de anticuerpos anti-HBs y anti-HBc, generalmente, el anti-HBc aparece en procesos agudos o por el contacto silencioso con el virus de hepatitis B, sin embargo, si la infección se encuentra controlada desaparece el HBsAg, el anti-HBc permanece y aparece el anti-HBs, si la infección pasa a crónica anti HBc y HBsAg se mantienen positivos, por esta razón el ensayo de estos tres marcadores permitió establecer el proceso infeccioso o inmune de los receptores de sangre desde principios de la década de 1980 (Organización Panamericana de la Salud, 2016) (Block, Alter, London, & Bray, 2016).

Algunos investigadores, incluido Blumberg, notaron que el estudio de HBsAg no permitía saber el estado infeccioso de la persona ni evaluar la gravedad de la infección, para esto el virólogo sueco Lars Magnus descubrió el HBeAg que ayudó en la distinción de portadores altamente infecciosos de aquellos con menor infectividad, William Carman mencionó que el nuevo marcador predice la existencia de Hepatitis B fulminante (Organización Panamericana de la Salud, 2016).

La ruta para la detección del genoma de HBV fue abierta por William S Robinson en Stanford California en 1973, quien fue capaz de determinar la actividad de una ADN polimerasa endógena y un año más tarde ser comprobada, en 1978 tres pioneros en biología molecular y sus equipos en laboratorios de bioseguridad: Pierre Tiollais (París), William Rutter (San Francisco) y Kenneth Murray(Edimburgo) lograron clonar el virus de

Hepatitis B, y este acontecimiento importante permitiría el desarrollo de metodologías para la detección de ADN HBV y el desarrollo de una vacuna altamente eficaz (Toro Montoya & Restrepo Gutierrez, 2011).

La Organización Mundial de la Salud adoptó el término de Hepatitis B a mediados de la década de 1970 que se ha conservado hasta el presente. En 1990 se desarrolló la prueba de PCR impulsando y un año más tarde la OMS introdujo la preparación de estándares internacionales e incluyó arbitrariamente las unidades internacionales (IU) para la cuantificación de ADN HBV. (Gerlich, 2013), además de la inclusión en los servicios de sangre el tamizaje obligatorio de HBsAg.

La disponibilidad de hemocomponentes seguros es un deber de vital importancia para los sistemas de salud y es de suma responsabilidad de los gobiernos nacionales, ya que el riesgo de transmisión de hepatitis B por transfusión es extremadamente alto y a pesar de que es posible evitarlo no todos los servicios y sistemas de hemovigilancia realizan las pruebas de detección necesarias o a su vez son inadecuadas. En el Ecuador el 0,49% de las unidades de sangre en el 2013 presentaron reactividad para el antígeno de superficie. (Organización Panamericana de la Salud, 2016). Se detalla que las infecciones transmitidas por transfusión a causa del virus de Hepatitis B tienen una prevalencia del 0,2 - 1,53% en pacientes multitransfundidos en Latinoamérica. (Organización Panamericana de la Salud, 2011)

El ministerio de Salud Pública del Ecuador actualmente ha implementado la tecnología de amplificación de ácidos nucleicos (NAT) en los principales bancos de sangre del país, también es obligatorio el análisis del marcador serológico de antígeno de superficie (HBsAg) a todas las unidades de sangre y solo algunas entidades realizan el análisis de anticuerpos IgM e IgG contra el núcleo (anti-HBc), sumado a esto solo se solicita el análisis de carga viral en aquellos donantes reactivos para HBsAg, (Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2014), por esta razón al no existir un algoritmo estandarizado para la detección del virus de hepatitis B en los bancos de sangre a nivel mundial, la presente revisión bibliográfica narrativa pretende establecer qué marcadores para el tamizaje serológico y molecular del virus de hepatitis B deben ser incluidos o excluidos para proporcionar una seguridad transfusional.

CAPÍTULO I

1.1 JUSTIFICACIÓN

El tamizaje serológico implementado en los bancos de sangre ecuatorianos para evitar la transmisión del virus de la hepatitis B (VHB) se basa en la determinación del antígeno de superficie (HBsAg) en metodologías con eleva sensibilidad y especificidad, el marcador serológico de core (anti-HBc) total es utilizado por algunos bancos de sangre y últimamente la técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (NAT) ha sido incluida en el algoritmo de detección del virus de hepatitis B para evitar la transmisión postransfusional.

En algunos países también se emplea un algoritmo similar al del país y se considera que el marcador serológico de anti-HBc es útil para la detección de portadores crónicos de la infección con una viremia baja no detectada en pruebas moleculares (Busch M. P., 2004).

La introducción de la técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (NAT) debido a los costos fue desarrollada en mini-pools (MP) de 3 a 8 muestras para detección de VIH, VHC y HBV sin afectar la sensibilidad durante el período de ventana que es el lapso de tiempo desde la infección y la medición de la respuesta inmune, sin embargo, la baja replicación del virus de hepatitis B ha generado controversia en la utilización de mini-pools (MP) (Busch M. P., 2004), existe otra técnicas de amplificación de ácidos nucleicos individual denominada ID-NAT-HVB que es más efectiva en detectar los niveles de viremia bajos en individuos crónicos (Bouchardeau, y otros, 2006).

Estos criterios generan la realización de un análisis bibliográfico que exponga el criterio de los científicos del uso de diferentes marcadores serológicos y moleculares para la detección de VHB en donantes de sangre por lo que el propósito de este estudio es determinar de acuerdo con investigaciones científicas que algoritmo se recomienda implementar para evitar la transmisión del virus de hepatitis B.

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La implementación de la prueba molecular NAT ha logrado reducir drásticamente el riesgo residual de transmisión del virus de VIH y VHC en varios países, pero aún existe controversia para la detección del virus de hepatitis B. (Bouchardeau, y otros, 2006). A lo largo del tiempo se ha descrito transmisión postransfusional del VHB a pesar de la detección obligatoria del antígeno de superficie (HBsAg) razón por la cual para garantizar la seguridad de la sangre se incluyó la prueba molecular HBV-NAT dentro del algoritmo de detección en todos los bancos de sangre.

No existe una estandarización en el algoritmo de detección de virus de hepatitis B para donantes de bancos de sangre, así la Cruz Roja Americana implementó la prueba de mini-pool (MP) el año 2009 pero conservó las pruebas de HBsAg y anticuerpos contra el core (anti-HBc) e incluyó la prueba individual ID-NAT de tal manera que la combinación de todas las pruebas permitió determinar infección aguda, crónica y oculta del VHB (Stramer S. , y otros, 2012), en Ecuador los marcadores serológicos obligatorios para la infección por VHB es HBsAg y MP-NAT, algunos bancos realizan anti-HBc total e IgM.

Por otro lado, el riesgo residual de transmisión del virus de hepatitis B puede estar asociado al rendimiento de las pruebas ante las cargas virales bajas, el estado inmunológico del donante y la fase de la infección, siendo un limitante en donantes que se han infectado, (Stramer S. , y otros, 2012). Los reportes de transmisión de virus luego de una transfusión son escasos, pero aún persisten y se ha visto que se relacionan con resultados falsos negativos en serología o NAT, también se ha reportado que existen discrepancias en los resultados y está relacionado en gran medida al rendimiento de los ensayos utilizados. (Candotti & Laperche, 2018).

Boush, M en el 2006 concluyó que la sensibilidad de las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos NAT necesita ser mejorada para reemplazar las pruebas actuales de HBsAg, especialmente cuando no se realizan pruebas anti-HBc. En contraste, *Candotti y Laperche*, en el 2018 mencionan que en países de baja prevalencia es necesario el mantenimiento de las pruebas de anti-core HBc para proporcionar un nivel óptimo de seguridad de la sangre. Con estos antecedentes la pregunta de investigación sería:

Pregunta de investigación ¿Qué marcadores serológicos son los idóneos para evitar una transmisión transfusional del virus de hepatitis B?

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar los diferentes abordajes para el tamizaje serológico del virus de hepatitis B en donantes de sangre para obtener una seguridad transfusional.

1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar si los marcadores serológicos de anti-HBc HBV y HBsAg deben ser incluidos o excluidos en el algoritmo de detección de la infección por el virus de hepatitis B en donantes de sangre de acuerdo con la revisión bibliográfica de artículos científicos.
- Determinar el tipo de prueba molecular que debe ser utilizada en el screening de donantes de sangre de acuerdo con la revisión bibliográfica de artículos científicos.
- Analizar qué marcadores serológicos y moleculares deben ser incluidos en el algoritmo de detección del HBV que garantice un nivel óptimo de seguridad transfusional de acuerdo con la revisión bibliográfica de artículos científicos.

CAPÍTULO II

2.1. MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL

La infección por el VHB aún constituye un problema de salud pública y sus manifestaciones pueden ser aguda, crónica y fulminante. Los sistemas de salud a nivel mundial han implementado varias estrategias en cada uno de sus niveles para lograr varios objetivos como prevención, control y tratamiento (Liu et al., 2017). Uno de los objetivos más importantes para lograr un seguimiento y tratamiento eficaz de la infección de la hepatitis B es conocer la fuente de infección, la susceptibilidad del hospedador y los factores de transmisión (Organización Mundial de la Salud, 2016).

La forma más oportuna y rentable para los países en el control de la hepatitis B es evitar que una persona susceptible contraiga la infección a través de estrategias como la inmunización por vacunación obligatoria, la detección de casos activos, así como tratar a las personas infectadas (Liu et al., 2017).

De acuerdo con los reportes de la OMS del año 2019, la hepatitis B afecta alrededor de 2000 millones de personas con infección reciente o pasada, y 257 millones han desarrollado infecciones crónicas en el transcurso de su vida, es decir, el 3,5% de la población mundial vive con infección crónica por VHB (Organización Mundial de la Salud, 2019). Por otro lado, es un virus que tiene prevalencia muy variada existiendo zonas de alta prevalencia consideradas “endémicas” y de baja prevalencia “no endémicas”. El VHB se contrae al tener contacto con fluidos corporales, relaciones sexuales, transmisión perinatal, uso de drogas inyectables y representa un problema para el personal de salud, entre ellos, el personal del laboratorio clínico (Organización Mundial de la Salud, 2019).

2.1.1 Virus de hepatitis B

El virus de la Hepatitis B pertenece a la familia de virus hepadnaviridae que puede desencadenar una hepatitis aguda, crónica y oculta en humanos, también está relacionado con el desarrollo de hepatocarcinoma y cirrosis cuando ocurre la integración con el genoma del hepatocito (Terrault, y otros, 2018).

El virus de Hepatitis B está estructurado por un genoma de ADN bicatenario principalmente con 3200 pares de bases, su tamaño es de 42 nm, presenta una doble

cápsula, con una envoltura externa en la cual se ubica el antígeno de superficie (HBsAg) y una nucleocápside interna en la que se encuentra el antígeno core (HBcAg), tiene una cadena larga de ADN y una cadena corta complementaria de ARN pre genómico (pgARN), ambas conforman una cadena principal con cuatro marcos de lectura superpuestos (ORFs), el promotor precore (PreC/C), el promotor Pre-S1, el promotor Pre S2/S y el promotor X. El PreC/C se encarga de codificar el antígeno HBe y el antígeno HBc; el Pre-S1 codifica la ADN polimerasa de HBV; el Pre S2/S codifica las proteínas de envoltura largas, medias y pequeñas; y el promotor X codifica la proteína X (HBx) (Li, y otros, 2020)

2.1.2 Partícula viral

Las partículas virales se caracterizan por circular en sangre, miden de 40-42 nm de diámetro, están cubiertas por una estructura lipídica externa que deriva de la célula infectada y una cápside interna que encierra al ADN viral. Posee una bicapa lipídica que contiene al antígeno de superficie que engloba tres tipos de glicoproteínas de membrana: pequeña, mediana y grande, además contiene la polimerasa para iniciar su replicación (Figura 1).

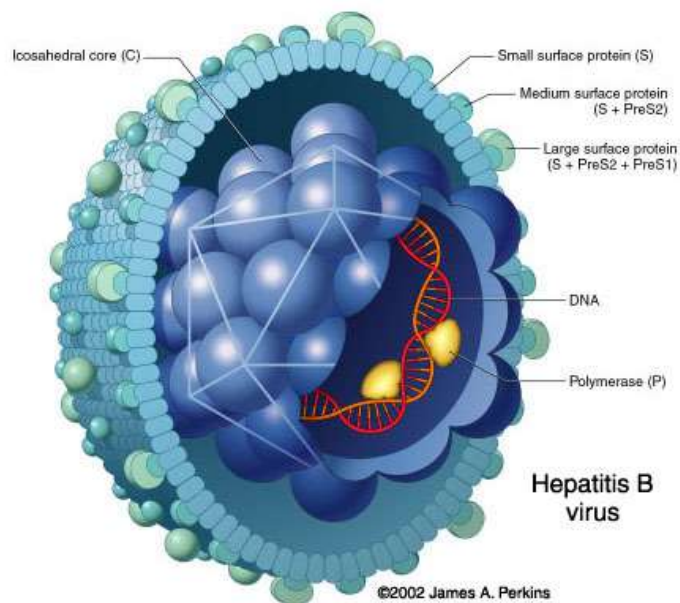


Figura 1: Partícula viral Dane del VHB circulante en sangre

Nota. Imagen tomada de James A. Perkins, 2002, Medical and Scientific illustration, Rochester Scientific Institute.

La proteína o antígeno HBx tiene 154 aminoácidos no existe un modelo tridimensional y sus características bioquímicas aún no se han determinado por completo debido a que no se han podido obtener cantidades significativas para su estudio, la localización de esta proteína determina su función así si se encuentra en el núcleo de la célula huésped promueve la transcripción, mientras que en el citoplasma modula la replicación vírica (Slagle & Bouchard, 2018) y se encuentra fuertemente relacionada con la hepatitis crónica por su capacidad de integrarse al genoma celular del hepatocito.

2.1.3 Respuesta inmune

El ciclo del virus de la hepatitis B ha representado un tema amplio de discusión que aún no se encuentra del todo esclarecido, la respuesta inmune innata juega un rol importante en las primeras etapas de la infección por HBV e induce posteriormente la respuesta inmune adaptativa (Li, y otros, 2020)

La respuesta inmune innata es inhibida por los componentes virales HBeAg y HBx con los receptores Toll (TLRs) y los de ácido retinoico, aunque los pacientes infectados poseen una respuesta inmune innata alterada, las citoquinas antivirales aún pueden combatir la replicación de HBV. Los pacientes infectados por HBV poseen una función deteriorada de las células mieloides y las células plasmocitoides, la capacidad de producción de IFN se encuentra disminuida generalmente asociada a la persistencia de HBV y a una respuesta de tolerancia por parte de las células T (Li, y otros, 2020)

La respuesta inmune específica juega un rol mayor en la eliminación del HBV, los linfocitos T citotóxicos CD8 dependientes del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHCI) pueden inducir a la apoptosis de los hepatocitos infectados y a la secreción de interferón IFN para inhibir la replicación viral mediante mecanismos no citolíticos, pero en la infección crónica por el HBV las células T específicas son propensas a la apoptosis, existe una función reducida de las citoquinas y la capacidad proliferativa es inadecuada, este agotamiento de células T contribuyen a la persistencia de HBV (Li, y otros, 2020)

2.2 Marcadores serológicos y virológicos para la detección de la infección de hepatitis B

2.2.1 Marcadores serológicos

Los marcadores serológicos desde su descubrimiento han apoyado fuertemente al diagnóstico y a la identificación de las fases de infección en portadores del virus de HBV, los más conocidos son:

2.2.1.1. Antígeno de superficie (HBsAg). Se produce en el citoplasma de la célula y se localiza en sangre, es el marcador serológico más utilizado en la actualidad y suele aparecer en la fase temprana de infección se lo puede identificar después de 1 a 10 semanas del contacto con el virus HBV. La infección aguda manifiesta positividad de HBsAg, en algunos casos puede desaparecer inmediatamente y mantener una seroconversión positiva en algunos años evidenciando infección crónica (Nguyen, Wong, Gane, Kao, & Dusheiko, 2020) ; (Yuen, y otros, 2018).

2.2.1.2 Antígeno de replicación (HBeAg). Fue descubierto en la década de 1970, identificado como un marcador de replicación viral e infectividad, la definición de la fase infectiva actualmente se mide con la detección del antígeno HBe en la muestra del paciente. También es utilizado como un indicador de seroconversión que es la detección de un antígeno o anticuerpo en un individuo previamente negativo. La medición de la presencia o ausencia de HBe durante un tratamiento específico con interferón permite determinar el éxito o fracaso del mismo de acuerdo a los niveles detectados cuando están elevados indican el fracaso del tratamiento, además determina la fase de la infección en la aguda tiende a disminuir mientras que en la crónica replicativa aumenta (Nguyen, Wong, Gane, Kao, & Dusheiko, 2020) ; (Yuen, y otros, 2018).

2.2.1.3 Anticuerpo contra el núcleo del HBV (anti-HBc). Los anticuerpos contra el núcleo del virus B pueden detectarse tanto en infección aguda y crónica, como en la infección oculta por el virus (OBI) en aquellos casos en los que las cargas virales son relativamente bajas, por otra parte, se puede identificar inmunoglobulinas específicas que ayudaran a categorizar el estado agudo o crónico de la infección anti-HBc IgM y anti-HBc IgG (Nguyen, Wong, Gane, Kao, & Dusheiko, 2020).

2.2.1.4 Anticuerpo anti-HBe. Este anticuerpo aparece cuando ha dejado de existir replicación viral, es decir, se determina después que el antígeno replicativo HBe ya no es evidenciado en pruebas serológicas siendo indicativo de resolución de la infección aguda (Nguyen, Wong, Gane, Kao, & Dusheiko, 2020).

2.2.1.5 Anticuerpo de superficie del virus (anti-HBs). El anti-HBs es un anticuerpo que aparece cuando ha existido cura o recuperación para el virus, también presenta positividad en aquellos pacientes que han sido vacunados contra la Hepatitis B y le brinda inmunidad permaneciendo en portadores sanos del virus (Nguyen, Wong, Gane, Kao, & Dusheiko, 2020)

2.2.1.6 Antígeno relacionado con el núcleo de la hepatitis B (HBcrAg). Este marcador es relativamente nuevo descubierto por primera vez en el año 2002, este mide una secuencia de aminoácidos común al antígeno de replicación (HBeAg) y el antígeno core (HBcAg), puesto que la positividad tiene correlación con los niveles intrahepáticos de ADN HBV y ARN pregenómico constituyendo un buen marcador de actividad transcripcional de ADNc (Nguyen, Wong, Gane, Kao, & Dusheiko, 2020) ; (Yuen, y otros, 2018). La interpretación de estos marcadores en conjunto permite determinar en qué fase de la infección de hepatitis B se encuentra el individuo como se indica en la Figura 2 y la Tabla 1 (Yuen, y otros, 2018).

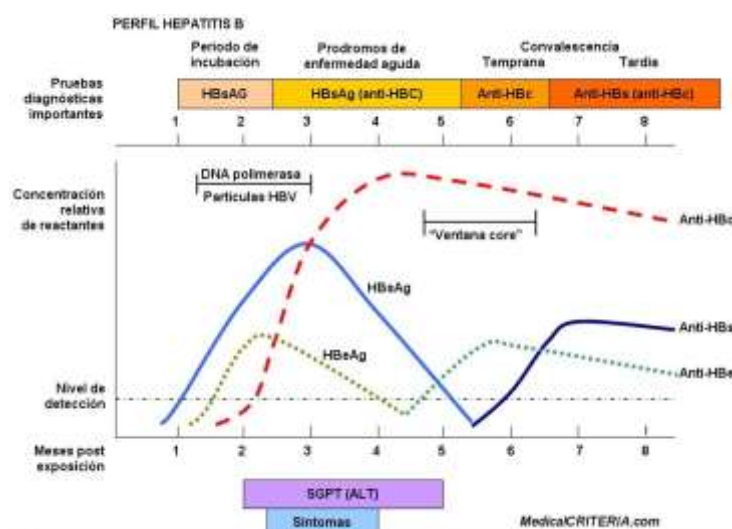


Figura 2: Pruebas serológicas para el diagnóstico del HBV circulante en sangre

Nota. Tomado de Guillermo Firman. (mayo 26, 2020). Pruebas Serológicas para el Diagnóstico de Infección por el Virus de Hepatitis B (VHB). *Medical Criteria*. <https://medicalcriteria.com/web/es/gashep/>

Tabla 1: Resultados de marcadores serológicos

| Interpretación del Panel para Hepatitis B | | | | |
|---|----------|--------------|----------|--------------|
| Interpretación | HBsAg | anti-HBc IgG | anti-HBs | anti-HBc IgM |
| Susceptible | negativo | negativo | negativo | |
| Inmune debido a infección natural | negativo | positivo | positivo | |
| Inmune debido a vacunación de hepatitis B | negativo | negativo | positivo | |
| Infección aguda | positivo | positivo | negativo | positivo |
| Infección crónica | positivo | positivo | negativo | negativo |

Nota. Información basada en el artículo de Man-Fung Yuen, D. Chen, G. Dusheiko. *et al.* Hepatitis B virus infection. *Nat Rev Dis Primers* 4, 18035.

2.3 Marcadores moleculares

2.3.1 HBV ADN.

La evaluación del ADN es un componente crucial puesto que es el marcador más precoz en la determinación de la infección por el virus de Hepatitis B, es muy importante la cuantificación del ADN inclusive en aquellas fases crónicas y esto se lo realiza por lo general mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real; la mayoría de estos ensayos poseen una sensibilidad de 5 – 10 UI/mL, la carga viral en algunos pacientes con infección crónica es muy variable pueden ir desde indetectables hasta >2`000000 UI/mL, no obstante, el monitoreo de los niveles de HBV ADN en cada paciente valora el pronóstico de la infección y también ayuda a controlar el tratamiento antiviral.

2.3.2 NAT.

Las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos NAT facilitan la detección de partículas de ADN del virus B independiente de la fase de la infección en que se encuentre, mediante la aplicación de la metodología de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), constituyendo un método que mejora la sensibilidad del tamizaje de donantes de sangre (Ruiz et al., 2010).

2.3.3 MP-NAT.

La NAT multiplex ó minipool NAT es un tipo de técnica de amplificación de ácidos nucleicos que detecta el material genético de más de un organismo a la vez, es decir es realizada por agrupamiento de muestras mayor a tres, es decir, varios sueros son incluidos en la prueba (Busch M. P., 2004).

El minipool MP-NAT reduce su sensibilidad de acuerdo con el número de muestras incluidas, sin embargo, posee una detección superior en comparación con las pruebas de HBsAg, esta metodología posee un límite de detección de 146 UI/mL para un intervalo de confianza del 95 % (Scheiblaue, y otros, 2020)

2.3.4 ID- NAT.

Corresponde a un tipo de técnica de amplificación de ácidos nucleicos para muestra individual, que es utilizada en la identificación del virus previamente detectado en MP-NAT. En el caso de HBV la tecnología Ultrio tiene una sensibilidad de 10 UI/mL a un intervalo de confianza del 95%, aunque en el avance de las metodologías se reporta una sensibilidad de 3,4 UI/mL para Ultrio Plus con un intervalo de confianza del 95 %, además posibilita la detección entre 10 a 18 días después de la exposición al virus de hepatitis B (Terrault, y otros, 2018); (Ramachandran, y otros, 2018).

2.3.5 Genotipos HBV.

En la actualidad han sido identificados 10 genotipos los mismos que poseen una distribución geográfica aleatoria a nivel mundial, los genotipos han sido etiquetados desde la A hasta J, juegan un papel importante tanto en la progresión de la enfermedad hepática como en la respuesta a la terapia con interferón (IFN) (Terrault, y otros, 2018)

2.4 Tamizaje de Hepatitis B en donantes de sangre

La Organización Panamericana de la Salud (OPS) recomienda que los servicios de sangre examinen como mínimo en cada donación de sangre: antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg), y anticuerpos contra “core” de hepatitis B (anti-HBc) (Organizacion Panamericana de la Salud, 2011). Por otro lado, la OMS y la OPS reportan

en su informe “Suministro de Sangre para transfusiones en los países de Latinoamérica y el Caribe 2016- 2017” que se deben realizar las pruebas de tamizaje para el antígeno de superficie (HBsAg) y anticuerpos contra “core” (Anti-HBc), marcadores serológicos obligatorios en el tamizaje de donantes de sangre para la hepatitis B en América Latina (Organización Panamericana de la Salud, 2020)

En el año 2018 de acuerdo con la OMS, de 171 países 110 cuentan con una legislación específica para la seguridad y la calidad de las transfusiones sanguíneas, además manifiesta que, para la detección de infecciones transmisibles por transfusión como Hepatitis B, se debe realizar un cribado de calidad con las respectivas pruebas de confirmación (Organización Mundial de la Salud, 2020).

En Ecuador, el Ministerio de Salud Pública Programa Nacional de Sangre menciona que es obligatorio que las muestras de donantes de sangre sean sometidas a pruebas para detección de VIH, HBsAg, HCV, Sífilis y Chagas mientras que pruebas como paludismo son realizadas en zonas endémicas, pero no se establece que marcadores serológicos deben ser utilizados para la detección de hepatitis B.

2.5 Detección de hepatitis B

En 1969 se introduce el estudio del antígeno de superficie para hepatitis B en donantes de sangre convirtiéndose en obligatoria en 1972. En 1987 se promueve la utilización del marcador serológico de detección de anticuerpo contra el core del virus B como un apoyo en la identificación de donantes considerados como no-A no-B y en período de ventana o cuando el HBsAg se vuelve indetectable (Sloand, 1995) y en 1999 la Administración de Alimentos y Medicamentos. U.S. (FDA: Food and Drug Administration) autoriza el uso de este marcador NAT para disminuir el riesgo de hepatitis B como una estrategia para detección de donantes en período de ventana cuando el HBsAg y anti-HBc son no reactivos (Kuhns & Busch, 2006).

En la actualidad existen más de 40 ensayos para la detección de hepatitis B, estos varían en la presentación y sensibilidad, utilizan anticuerpos monoclonales y otros policlonales para la captura y la detección del antígeno de superficie, incluyen métodos como enzima inmunoensayo (ELISA), inmunocromatográficos, aglutinación de partículas y quimioluminiscencia (CLIA), en plataformas semiautomatizadas o automatizadas. La sensibilidad de los ensayos para hepatitis B es difícil de medir debido a la diferencia de

cálculo en los riesgos residuales de los anticuerpos utilizados para su fabricación y adicionalmente varían según el país y la disponibilidad de los datos de validación, ante esto la OMS desarrolló un estándar internacional expresado en UI/mL y lo transformaron a ng/mL indicando que los ensayos más sensibles detectan niveles de antígeno de superficie $\leq 0,1$ ng/mL pero en algunos países se utilizan métodos con límites de >1 ng/mL (Kuhns & Busch, 2006).

Actualmente existen tres ensayos en el mercado que cuantifican el antígeno de superficie estos son: Architect QT (Abbott Laboratories), el Elecsys HBsAg II Quantensayo (Roche Diagnostic) y DiaSorin Liaison XI. Los rangos de detección varían entre 0,05 a 250 UI/mL y dependiendo de la dilución puede llegar a 50.000 UI/mL, a pesar de ser sensibles hay factores que pueden influir en la detección y se relaciona con los mutantes de B que la vuelven inexacta o indetectable (Cornberg, y otros, 2016).

Las pruebas usadas para detección de anti-HBc varían en presentación y pueden ser directos, sándwich, competitivos y detectan anticuerpos anti-IgG e IgM dependiendo de lo que se decida detectar y si es fase aguda, crónica o portador asintomático. En la mayoría de los bancos de sangre se detecta en paralelo con HBsAg por lo que se utiliza el mismo sistema de detección, cabe recalcar que no existen pruebas confirmatorias para anticuerpos del core de hepatitis B (Kuhns & Busch, 2006).

La prueba NAT fue utilizada de forma rutinaria en tres países Alemania, Austria y en tres centros de España, se sumaron Estados Unidos y Europa, factores como mano de obra y costo promovió el uso de multiplex para NAT utilizando pools de 16-96 de muestras. Los límites de detección fueron inicialmente expresados en porcentajes, 50% a 95% de probabilidad de detectar el DNA VHB, en cambio la OMS puso como medida de referencia la concentración en UI/mL, a partir de ello existen varias expresiones como moléculas/mL, genoma copias/mL o equivalentes de genoma geq/mL, estas medidas dependerán de los métodos de aislamiento, extracción y concentración del ADN. También se determinó que la sensibilidad del NAT depende del número de muestras que posea un pool, el volumen procesado, el método de concentración, la calidad de extracción y la sensibilidad del método de detección (Kuhns & Busch, 2006)

2.6 MARCO METODOLÓGICO

2.6.1 Tipo de estudio

El estudio corresponde a una revisión bibliográfica de tipo narrativo descriptivo, de la literatura académica y las evidencias científicas, sobre los marcadores serológicos y moleculares para detección de hepatitis B; el periodo de revisión de la literatura corresponde a las publicaciones entre el 01 de enero del 2004 a agosto del 2020 por ser las fechas en que se inició la polémica de ingreso de la metodología NAT.

2.6.2 Fuentes de Información

Se utilizó una fuente primaria de información únicamente artículos de revistas indexadas publicados en el buscador PUBMED por ser la que contiene las prestigiosas revistas indexadas relacionadas a inmunohematología y bancos de sangre como the journal of AABB-Transfusion, Transfusion clinique et biologique : journal de la Société française de transfusion sanguine, Blood transfusion, además que permite el ingreso a las colecciones de revistas facilitando la obtención de full text articule y son reconocidas por expertos en el área, no se buscarán en otras fuentes.

2.6.3 Búsqueda de información - sintaxis

Para llevar a cabo la búsqueda en PUBMED se identificaron los conceptos claves y relevantes de acuerdo con la pregunta planteada para el estudio, y se utilizaron los términos de búsqueda en texto libre y en lenguaje controlado, palabras clave (keywords), y descriptores MeSH (Medical Subject Headings, tesauros de la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos), así como sinónimos, abreviaciones, acrónimos.

Los términos MESH a utilizar son: Blood Donors, Hepatitis B Antibodies, Screening

Las frases de búsqueda o sintaxis se construyeron con ayuda de los operadores booleanos (AND, OR y NOT), paréntesis, comodines, operadores de proximidad y funcionalidades de la base de datos, así como también se indicaron en que campo del artículo se deberá priorizar la búsqueda de estos términos, por ejemplo [TIAB] para búsqueda en el campo título y resumen. Para facilitar la búsqueda y selección de

información se emplearon los filtros de búsqueda que dispone PUBMED de acuerdo con los criterios de inclusión establecidos.

2.6.4 Selección de la información

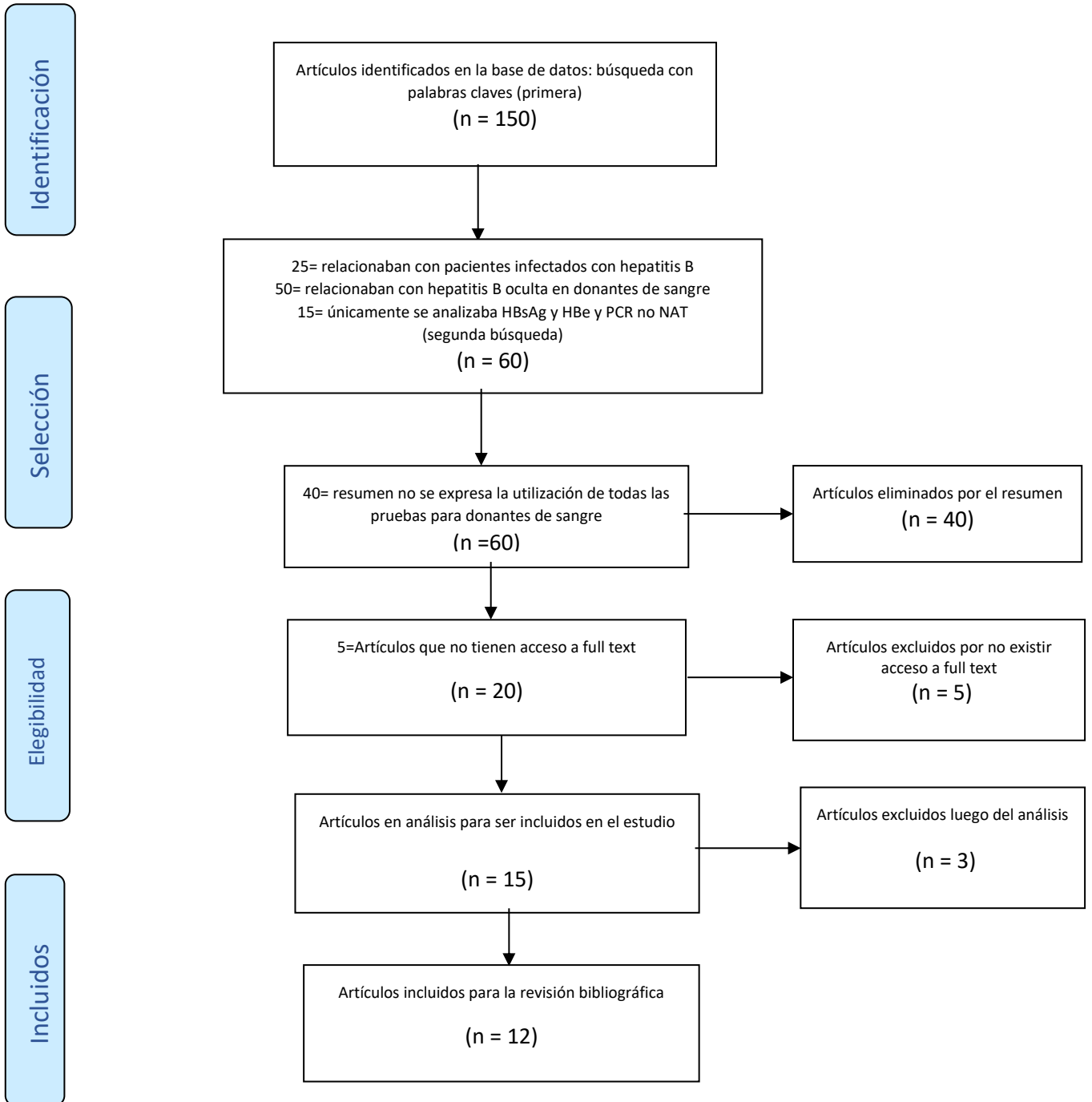
Una vez realizada la búsqueda exhaustiva y sistemática, la información recuperada se manejó con la ayuda del gestor bibliográfico Mendeley, en el que se incluyó la referencia bibliográfica, una vez depuradas se continuó con los pasos establecidos en el diagrama de flujo para selección de información-STROBE (Figura 3), prosiguiendo con el retiro de duplicados y la revisión de los artículos con posibilidad de ser seleccionados por título y resumen. En el siguiente paso, se analizó el texto completo del artículo de acuerdo con los lineamientos y criterios STROBE se crearon los siguientes criterios mínimos para la elección de los artículos a ser analizados en este estudio:

- Título/tema: artículos relacionados con marcadores serológicos para detección de hepatitis B en donantes de sangre
- Resumen: indican que es un estudio dirigido solo a donantes de sangre y el uso de marcadores serológicos y moleculares.
- Introducción: se expresa el propósito de la investigación que va dirigido al tema objeto de la revisión bibliográfica.
- Método-población-materiales: indica el número de muestras o donantes de sangre, uso de pruebas serológicas y moleculares NAT-Mini-Pool e ID-NAT.
- Idioma inglés o español
- Año considerado desde el 2004 que inició la inclusión del marcador serológico en adelante para establecer su evolución.
- Discusión y conclusiones: permitió encontrar la respuesta de la pregunta de investigación clarificando la inclusión o exclusión de marcadores serológicos y moleculares para el virus de hepatitis B.

2.6.5 Criterios de exclusión

- Artículos que mencionaron estudios relacionados con diagnóstico de hepatitis B en pacientes y no pruebas de tamizaje en donantes de sangre.
- Estudios que evalúen otras pruebas de tamizaje que no incluyan HBsAg, anti-HBc y NAT.

Figura 3: Diagrama de elegibilidad de STROBE



2.6.6 Criterios de elegibilidad

Finalmente se aplicó los siguientes criterios de evaluación y selección de artículos para el estudio tomando como base la declaración de Strobe en cuanto al título, método, resultados y discusión, la misma que consta en el Anexo 2 (Vandenbroucke, 2009) .

- Criterio 1: si cumple cuando el artículo tiene un tema que proporciona información clara del propósito del estudio y el resumen es informativo e indica los principales hallazgos y están relacionados a responder la pregunta de investigación planteada en la presente revisión bibliográfica.
- Criterio 2: si el método utilizado fue aleatorio, tamaño muestral y la población son donantes de sangre exclusivamente.
- Criterio 3: si el estudio describe claramente la metodología utilizada indica qué tipo de pruebas serológicas y moleculares se realizaron.
- Criterio 4: si existe un análisis estadístico que permita observar la significancia de los resultados obtenidos si se trata de estudio descriptivo indica su análisis.
- Criterio 5: si el estudio en su discusión compara sus resultados con otros estudios y compara sus hallazgos dando una respuesta al tema.
- Criterio 6: si el estudio ofrece en la discusión una interpretación cautelosa de sus resultados, menciona si existe limitaciones, sesgos o necesidad de otros estudios y discute la generalización de sus resultados.

Para el registro de esta evaluación se utilizará una matriz de doble entrada que relaciona estos criterios y la referencia del artículo (Tabla 2). Además, se utilizará otra matriz para registrar la referencia de los artículos no seleccionados y la razón para que no formen parte del estudio.

2.7 TABLA 2: Diagrama de verificación de los datos requeridos en cada artículo incluidos para el estudio

| Criterio Artículos | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|--|--|--|---|---|---|---|
| Busch MP. Should HBV DNA NAT replace HBsAg and/or anti-HBc screening of blood donors? | El autor propone el estudio de la implementación del NAT e interroga la discontinuación de los marcadores moleculares HBsAg, anti-HBc en banco de sangre y compara la sensibilidad de detección de las pruebas mencionadas | El tamizaje se realiza en donantes de sangre alrededor de varias etnias poblacionales Estados Unidos, Japón, Reino Unido y Alemania de manera aleatoria | El estudio describe la utilización de metodologías como Elisa, quimioluminiscencia para pruebas serológicas de HBsAg y anti HBc y NAT realizados en pools con diferentes tamaños de muestra además del PCR e ID-NAT | Indica claramente el análisis descriptivo estadístico de los diferentes resultados obtenidos en la población de donantes de sangre americanos, japoneses, alemanes y de Reino Unido | El estudio compara sus resultados con los obtenidos previamente por parte de la Cruz Roja Americana, el grupo de epidemiología REDs, estudios alemanes y japoneses realizados previamente en donantes de sangre | El estudio discute la necesidad de incrementar la sensibilidad de MP-NAT e ID-NAT y menciona que existe limitaciones en aquellos donantes en los que las cargas virales son relativamente bajas, además estima que no existe costo beneficio en la implementación del NAT |
| Bouchardeau F, Girault A, Razer A, Servant-Delmas A, Mercier M, Laperche S. Sensitivity of hepatitis B virus DNA transcription-mediated amplification testing in hepatitis B surface antigen-positive blood donations. | Los autores proponen el estudio de la implementación del NAT para evaluar donaciones positivas para anti- HBc y HBsAg recolectadas en Francia verificando la correlación de los niveles de ADN viral con HBsAg | Se analizaron 253 donaciones positivas para ensayos serológicos HBsAg y anti- HBc mediante MP-NAT y PCR de manera aleatoria | El estudio describe la aplicación de pruebas de ELISA, quimioluminiscencia, para pruebas serológicas de HBsAg, anti- HBc, HBeAg, los ensayos triplex MP-NAT se configuraron en 8 donaciones, además se comprobó por PCR | Indica el análisis estadístico de los resultados obtenidos por MP-NAT en comparativa con los hallazgos en marcadores serológicos HBeAg y HBsAg por encontrarse íntimamente relacionados | El estudio compara sus resultados con los obtenidos por otros autores en referencia a la implementación de MP-NAT demostrando que existen algunas donaciones potencialmente infecciosas que no reflejan reactividad | Se discute la necesidad de incrementar la sensibilidad del MP-NAT y se manifiesta un porcentaje de determinación de los verdaderos positivos mediante PCR y técnicas más sensibles, puesto que la replicación del virus de Hepatitis B es muy variable |
| Allain JP, Candotti D. Diagnostic algorithm for HBV safe transfusion. | Los autores proponen el desarrollo de un algoritmo diagnóstico para la identificación del virus HBV en donantes de sangre verificando que las cargas virales bajas imposibilitan la detección de los verdaderos positivos | Se realiza la implementación del NAT en pools e ID-NAT además se correlaciona con la información que brindan las pruebas serológicas con los resultados obtenidos en pruebas moleculares en donantes | Se describe metodologías de MP-NAT, ID-NAT y de PCR en tiempo real aplicada como ensayos discriminatorios, además de quimioluminiscencia para HBsAg, anti -HBs, anti-HBc | Indica el análisis descriptivo estadístico de los diferentes resultados obtenidos en MP-NAT correlacionados con PCR en tiempo real además del análisis de algunos promotores del genoma HBV | El estudio compara sus resultados con algunos estudios de Europa y Sudáfrica que se basan en pruebas serológicas además de pruebas moleculares MP-NAT, ID-NAT, ensayos discriminatorios y PCR en tiempo real | En el diseño del algoritmo diagnóstico discute la necesidad de implementar metodologías que analicen de manera eficaz la determinación de mutantes de HBsAg, así como, metodologías más sensibles para la identificación de donantes OBI |
| Stramer SL, Zou S, Notary EP, et al. Blood donation screening for hepatitis B virus markers in | Los autores se centran en el análisis de Hepatitis B en donantes de sangre mediante la implementación | El tamizaje se realiza en donantes americanos de manera aleatoria, el estudio realiza el análisis | Se describe el análisis de anti- HBc y HBsAg por quimioluminiscencia además de MP-NAT con | Indica el análisis estadístico de las donaciones seropositivas, | El estudio compara sus resultados con los obtenidos por otros autores en referencia a la | El análisis comprensivo de los datos demuestra que la implementación del MPNAT y HBsAg no contribuyen a la seguridad del producto y además no |

| | | | | | | |
|--|---|--|--|---|---|--|
| the era of nucleic acid testing: are all tests of value? | del NAT además de los análisis serológicos de anti-HBc y HBsAg indagando en el valor de la realización de las tres pruebas | de 6,5 millones de donaciones | prueba confirmatoria individual de PCR | seronegativas, solo positivas en MP- NAT y también la correlación de los resultados obtenidos entre ambas | implementación de MP-NAT demostrando que existen algunas donaciones que no reflejan reactividad porque las cargas virales son bajas | debe obviarse el tamizaje de anti-HBc, observando la limitante de la detección de OBI en donantes aparentemente sanos |
| Stramer SL, Notari EP, Krysztof DE, Dodd RY. Hepatitis B virus testing by minipool nucleic acid testing: does it improve blood safety? | Los autores evalúan la implementación de MP-NAT calculando el riesgo residual de transmisión de HBV antes y después de esta implementación | El tamizaje se realiza en donantes americanos de manera aleatoria, el estudio realiza el análisis de 12,8 millones de donaciones | Se describe el análisis de anti- HBc y HBsAg por quimioluminiscencia además de MP-NAT con prueba confirmatoria individual de PCR | Indica el análisis estadístico de las donaciones seropositivas, seronegativas, solo positivas en MP- NAT y también la correlación de los resultados obtenidos entre ambas | El estudio compara sus resultados con los obtenidos por otros autores en referencia a la implementación del MP-NAT, además calcula la incidencia y el riesgo residual de transmisión por el virus de HBV en donantes americanos | Se discute que las políticas de vacunación y que la implementación de NAT han ayudado a reducir el riesgo residual y la incidencia por el virus de hepatitis B, además manifiesta limitaciones para la detección cuando se procesa en pools infiriendo en reducir el tamaño o procesar de manera individual (ID-NAT) |
| Esposito A, Sabia C, Iannone C, Nicoletti GF, Sommese L, Napoli C. Occult Hepatitis Infection in Transfusion Medicine: Screening Policy and Assessment of Current Use of Anti-HBc Testing. | Los autores requieren analizar la infección oculta de hepatitis B (OBI) basados en la combinación de ensayos serológicos y moleculares de acuerdo a la prevalencia en cada localidad, metodología y costo beneficio | El tamizaje se realiza en donantes de sangre americanos, europeos, asiáticos, africanos, australianos y de medio Oriente | Se describe el análisis de anti-HBc, anti-HBs, HBeAg, anti- HBe y HBsAg mediante quimioluminiscencia y de acuerdo a la prevalencia del virus en la localidad, por otra parte, se analiza MP-NAT e ID-NAT | Indica el análisis estadístico descriptivo de los resultados obtenidos en las diferentes localidades tanto para marcadores serológicos como moleculares | Realiza la comparación de los resultados obtenidos con otros autores en referencia al marcador serológico anti -HBc, además correlaciona los resultados en el diagnóstico de OBI | Se discute que en países no endémicos se debe implementar MP-NAT y que en países endémicos debe realizarse la implementación de ID-NAT para lograr evaluar las cargas virales fluctuantes del OBI |
| Arora, S., Doda, V., & Kirtania, T. (2015). Sensitivity of individual donor nucleic acid testing (NAT) for the detection of hepatitis B infection by studying diluted NAT yield samples | Los autores requieren analizar la sensibilidad del ID-NAT para la detección de OBI en donantes y verificar como escapan de la detección cuando solo se realiza HBsAg | El estudio analiza de manera aleatoria 28134 donaciones en donantes de sangre de la India | Se describe el análisis de anti-HBc por quimioluminiscencia de micropartículas y HBsAg y anti- HBs mediante quimioluminiscencia y ELISA además de NAT e ID-NAT | Indica el análisis estadístico del rendimiento del NAT para donantes OBI además de los marcadores serológicos HBsAg, anti- HBc (IgG-IgM) y anti HBs | Realiza la comparación de los resultados obtenidos con otros autores en referencia al marcador serológico anti -HBc, además correlaciona los resultados en el diagnóstico de OBI | Se discute que la dinámica viral y los marcadores serológicos son muy variables en donantes infectados con HBV, además manifiesta que es deseable el tamizaje de HBsAg, anti -HBc e ID-NAT en áreas endémicas |
| Dodd RY, Nguyen ML, Krysztof DE, Notari EP, Stramer SL. Blood donor testing for hepatitis B virus in the United States: is there a case for continuation of hepatitis B surface antigen detection? | Los autores se centran en el análisis de Hepatitis B en donantes de sangre mediante la implementación del NAT además del análisis serológico de anti-HBc y HBsAg indagando en el valor de la realización de las tres pruebas en referencia a la incidencia de HBV | El estudio analiza 22,4 millones de donaciones de manera aleatoria en donantes de sangre americanos | Se describe el análisis de HBsAg, anti HBc mediante quimioluminiscencia además de MP- NAT ID-NAT y PCR para aquellas cargas virales bajas | Indica el análisis estadístico de las donaciones seropositivas, seronegativas, solo positivas en MP- NAT y también la correlación de los resultados obtenidos entre ambas | El estudio realiza la comparativa con los otros estudios anteriores verificando que las tendencias de incidencia de HBV siguen disminuyendo gracias al programa continuo de vacunación en los Estados Unidos | Se discute que los eventos agudos y crónicos disminuyen, adicionalmente que la demanda de hemocomponentes ha disminuido en Estados Unidos y de la misma forma la incidencia de HBV postransfusional |

| | | | | | | |
|--|---|---|--|---|---|--|
| Ye X, Li T, Zhang R, Liu H, Zeng J, Hong W, Lu L, Zhu W, Li S, Xu M, Wu S, Chen L. Comprehensive analysis of hepatitis B virus infections in blood donors in southern China that are surface antigen positive but nucleic acid testing negative. | Los autores proponen el análisis del HBV en el sur de China en donantes con HBsAg reactivos, pero NAT negativos | El estudio realiza el tamizaje de 101025 donaciones de manera aleatoria en donantes chinos | Se describe el análisis de HBsAg ELISA, anti HBe, anti HBs, HBeAg mediante quimioluminiscencia y anti-HBc por quimioluminiscencia de micropartículas además de MP- NAT ID- NAT, qPCR y PCR anidado para amplificación de ORFs (BCP/PC) | Indica el análisis estadístico de las donaciones reactivas y no reactivas de HBsAg en comparativa con el ADN de HBV y las pruebas moleculares MP-NAT, PCR | El estudio realiza la comparación de los resultados con los obtenidos por estudios americanos y australianos los cuales reportan falsos negativos para HBsAg similares | Se discute aplicar metodologías más sensibles para NAT y HBsAg en áreas de elevada endemicidad como China, además se manifiestan limitaciones en la técnica de ELISA para HBsAg las que generan falsos positivos |
| Rocha D, Andrade E, Godoy DT, Fontana-Maurell M, Costa E, Ribeiro M, Ferreira AGP, Brindeiro R, Tanuri A, Alvarez P. The Brazilian experience of nucleic acid testing to detect human immunodeficiency virus, hepatitis C virus, and hepatitis B virus infections in blood donors. | Los autores proponen evaluar la experiencia del tamizaje de donantes mediante la adquisición de la plataforma NAT en Brasil | El estudio realiza el tamizaje de 12,6 millones de donaciones de manera aleatoria en Brasil | Se describe el análisis de HBV mediante la plataforma NAT además del tamizaje serológico mediante pruebas de cuarta generación para HBsAg y anti -Hbc | Indica el análisis estadístico del rendimiento del NAT para HBV en Brasil | El estudio realiza comparaciones con estudios europeos, africanos, asiáticos y americanos sobre el rendimiento del NAT para el virus de Hepatitis B | Se discute implementar mayor sensibilidad al kit además de nuevas estrategias de selección de donantes en Brasil para la reducción de las tasas de transmisión del virus de Hepatitis B |
| Corrêa ASM, Lamarão LM, Vieira PCM, de Castro RBH, de Almeida NCC, de Castro JAA, de Lima MSM, Palmeira MK, Meireles ALLP, Burbano RR. Prevalence, incidence and residual risk of transfusion-transmitted HBV infection before and after the implementation of HBV-NAT in northern Brazil. | Los autores proponen evaluar el riesgo estimado de transmisión de HBV por transfusión antes y después de la implementación de la plataforma NAT en Brasil | El estudio realiza el tamizaje de 294881 donaciones de manera aleatoria en Brasil | Se describe el análisis de HBV mediante los marcadores serológicos de HBsAg y anti Hbc por quimioluminiscencia de micropartículas, además del análisis de NAT | Indica el análisis estadístico de la tasa de prevalencia de infección por HBV por 100000 donaciones en el estado de Pará antes y después de la implementación del NAT | El estudio compara sus resultados con los obtenidos por estudios americanos y europeos evidenciando un mayor riesgo residual para la transmisión de HBV en Brasil | Se discute que las estrategias de reclutamiento y la selección de donantes siguen siendo herramientas que pueden mejorarse, además se enfatiza en incrementar la sensibilidad del kit de la plataforma NAT para brindar una seguridad transfusional óptima |
| Souza JC, Crispim MAE, Abraham C, Fraiji NA, Kiesslich D, Stefani MMA. High rate of seromarkers for HIV, HBV and syphilis among blood donors using confidential unit exclusion, before and after HIV-NAT implementation at a major public blood bank in the Brazilian Amazon. | Los autores proponen evaluar el uso de unidades de exclusión confidencial antes y después de la implementación de la plataforma NAT en el área Amazónica del Brasil | El estudio realiza el tamizaje de 287588 donaciones de manera aleatoria en Brasil | Se describe el análisis de HBV mediante la plataforma NAT además del tamizaje serológico mediante pruebas de cuarta generación para HBsAg y anti -Hbc | Indica el análisis estadístico de los usuarios CUE y no CUE en referencia al rendimiento de NAT y de las pruebas serológicas | El estudio compara sus hallazgos con los obtenidos por estudios americanos y europeos en los que se utilizaron unidades de exclusión confidencial, llegando a interpretar que el CUE brinda una capa adicional de seguridad sanguínea en conjunto con la evaluación del NAT | Se discute que la prevalencia elevada del virus HBV cataloga a Brasil como un área endémica y que los usuarios de CUE al excluir sus donaciones contribuyen a la seguridad de los hemocomponentes por estar relacionados directamente con HBsAg y anti-HBc |

CAPÍTULO III

3.1 RESULTADOS

El análisis bibliográfico de cada uno de los artículos permite establecer qué pruebas serológicas y moleculares deberían incluirse o excluirse del algoritmo de tamizaje serológico para obtener una seguridad transfusional y evitar la transmisión de virus de hepatitis B (HBV), la revisión de artículos científicos en revistas indexadas principalmente las pertenecientes a las de alto impacto como TRANSFUSION validan la información obtenida, así como la revisión desde su implementación hasta la actualidad, a continuación se presenta una reseña de cada autor en relación al tema propuesto cumpliendo con cada uno de los objetivos planteados.

Artículo Científico 1: Should HBV DNA NAT replace HBsAg and/or anti-HBc screening of blood donors? Michael P Busch, 2004.

El propósito de este estudio fue evaluar la introducción de nuevas pruebas para la detección del virus de hepatitis B relacionadas con técnicas moleculares para el tamizaje de donantes de sangre y medir la sensibilidad analítica que es definida como la capacidad que tiene una metodología para diferenciar pequeñas variaciones de la concentración de un analito conocido también como límite de detección (Márquez-Fernández, Ramos-Ligonio, & López-Monteon, 2015). El estudio lo realizaron en varias etapas en colaboración entre el grupo de Epidemiología en los donantes (REDS) y la Food and Drug Administration (FDA):

1. **Medición de la sensibilidad de la prueba de detección del ADN virus B y la identificación del antígeno de superficie:** probaron 28 paneles de seroconversión conformados por muestras con diferentes concentraciones del antígenos del virus de hepatitis B (HBV), 100 muestras seleccionadas de diferentes paneles y 28 controles de validación de Kits (validación de kit) , todos fueron probadas en siete reactivos para detección del antígeno de superficie (HBsAg) y pruebas de ADN-Viral mediante (individual) ID, HBV-NAT, (minipools) MP-NAT. Los datos obtenidos fueron analizados para medir los tiempos de detección del HBV.

Los resultados demostraron que el tiempo de replicación del virus B es de 2,65 días considerado significativamente más largo que los del virus VIH y de hepatitis C (VHC) que

es menor a un día. Además, determinaron que las pruebas serológicas para medición de HBsAg a ser introducidas en el tamizaje de donantes variaron su detección en 0,07 a 0,12 ng/mL en comparación con las pruebas autorizadas que es de 0,13-0,62 ng/mL, también la detección de la carga viral fue 102-267 UI/mL menor a las autorizadas que es de 363 a 1069 UI/ml.

Los autores mencionan que estos ensayos serológicos unidos a los moleculares reducirían el tiempo de ventana de detección del HBsAg en 2-9 días; MP-NAT en 9-11, ID-NAT reduciría 25-36 días, estableciendo que los nuevos ensayos en conjunto son capaces de detectar un mayor porcentaje de donaciones de sangre infecciosas que se pierden al utilizar únicamente la prueba de HBsAg y estimaron que ayudaría a prevenir entre 30-35 transfusiones potencialmente infecciosas. De forma similar la introducción de la prueba molecular de muestra única ID-NAT podría detectar hasta 50 unidades virales / 107 donaciones, sin embargo los ensayos MP-NAT utilizan agrupaciones de muestras de 16 a 24 y no existe un aumento de la sensibilidad que los que usan agrupaciones de 512 a 1200 muestras de plasma, la explicación se da por varios factores: número de muestras, eficacia de los procedimientos de extracción para concentrar las partículas virales, volumen que permite el ensayo para agrupar muestras y el límite de detección de la prueba, todo esto va a determinar la dilución que se realice en función del total de muestras testadas.

El autor concluye que los resultados son consistentes que la introducción del NAT-HBV ha disminuido el período de ventana para la detección de donantes de sangre, sin embargo, otros autores como Kleinman & Bush, Matsumoto *et al*, informaron de 10 casos de transmisión de hepatitis B, cinco fueron detectados al usar pruebas de HBsAg más sensibles y de los 5 casos que fueron negativos en la prueba de HBsAg dos fueron detectados por NAT múltiple y dos por ID-NAT, un caso no fue detectado por ID-NAT (Kleinman, y otros, 2005) (Matsumoto C, 2001).

Por otro lado, durante el año de publicación del presente artículo se estaba evaluando la introducción de nuevas metodologías de detección como Abbot quimioluminiscencia que detectó muestras que fueron negativas en las metodologías aprobadas demostrando su sensibilidad, y el ensayo de Roche Ampliscreen HBV determinando que de 670.000 donaciones individuales se detectaron dos, con estos datos se sugiere que mientras se mejora la sensibilidad de las pruebas serológicas no se justifica la implementación de la prueba NAT mejorada o individual porque no representa costo beneficio para la mejora detectada (Busch M. P., 2004).

- 2. Frecuencia de detección de ADN-HBV en donantes anti-HBc reactivo:** uno de los riesgos de transmisión del virus de hepatitis B es la presencia de donantes portadores asintomáticos que no presentan el antígeno de superficie (HBsAg). Se ha demostrado que 0,5-1% de las donaciones que son HBsAg no reactivas y anti-HBc reactiva contiene niveles bajos de ADN de HBV, bajo este concepto surgió la pregunta del investigador: ¿podrían detectarse el virus B mediante pruebas NAT de muestras agrupadas (MP-NAT) desarrolladas actualmente?

Estudio de la REDS obtuvo que muestras HBsAg EIA no reactivas, anti-HBc reactivo se procesaron en ID-NAT detectándose <50 copias/mL del virus, en muestras anti-HBc reactivas y anti-HBs negativas o reactivas con valores de < 100 IU/L fueron positivas en ID-NAT con 50 y 100 copias/mL, obteniéndose una tasa de detección del 3,7%.

Determinando los autores que el tamizaje de anti-HBc detecta donantes infectados por VHB cuando son negativos para el antígeno de superficie, la carga viral es baja y no puede ser detectada por MP-NAT. Esta afirmación fue expuesta en dos estudios que se llevaron a cabo en Estados Unidos que corroboran que el ID-NAT detecta aquellas donaciones que poseen el virus de la hepatitis B (HBV) que no son identificadas por MP-NAT, así de 3000 muestras de donantes de sangre reactivos para anti-HBc se detectaron 17 que tenían una viremia baja y HBsAg negativo. Sin embargo, el ensayo de Roche Ampliscreen HBV usando MP-NAT de 24 unidades detectó solo una muestra mientras que ID-NAT identificó 14 unidades contaminadas por el HBV (Busch M. P., 2004).

Existen países donde no se utiliza la prueba de anti-HBc porque no la consideran de utilidad para prevenir la transmisión del VHB por lo que lastimosamente la decisión dependerá de las políticas que evalúe cada país.

- 3. Mantenimiento de HBsAg, anti-HBc en la introducción de NAT-VHB:** el autor mantiene la afirmación que existe una baja concentración del virus en donaciones de sangre reactivas para anti-HBc, no reactivo en HBsAg y que la introducción de reactivos con sensibilidad mejorada no detecta todas los hemocomponentes con HBsAg baja o mutante, y que el uso de pool MP-NAT no detecta todas las unidades potencialmente infecciosas.

Las pruebas de anti-HBc previenen la transmisión del virus B mucho más que las pruebas de MP-NAT VHB o los ensayos mejorados para HBsAg. Por lo tanto, durante este período de investigación y con los datos científicos indicados en este artículo se aclara que la implementación de las pruebas MP-NAT no deben reemplazar a las pruebas serológicas de anti-HBc que se realizan de forma frecuente en la mayoría de los países. Es posible la

introducción del ID-NAT por ser más sensible, sin embargo, la viremia de los individuos portadores crónicos es intermitente y constituye un problema su detección, no así con las pruebas anti-HBc que detectan si el donante ha tenido contacto con el virus. En conclusión, el autor considera que la combinación de las pruebas mejorara la sensibilidad de detección en donantes de sangre para el HBV, la exclusión de una de ellas debe ser analizado (Busch M. , 2004).

Artículo científico 2: Sensitivity of hepatitis B virus DNA transcription-mediated amplification testing in hepatitis B surface antigen–positive blood donations. Bouchardeau F, Girault A, Razer A, Servant-Delmas A, Mercier M, Laperche S, 2006.

El objetivo planteado en este estudio fue comparar la sensibilidad diagnóstica de la prueba molecular y si la detección del antígeno de superficie de hepatitis B debe mantenerse cuando se implemente la prueba molecular de HBV- NAT.

Para el estudio se utilizaron un panel de 253 muestras reactivas para anticuerpos anti-HBc y antígeno de superficie (HBsAg) de donantes franceses. Los reactivos utilizados fueron de Abbott Laboratories, Bio-Rad, escogidos por su sensibilidad analítica de aproximadamente 0,1ng/mL de HBsAg frente al estándar nacional francés (0,05 UI/mL). También se realizaron pruebas de replicación viral mediante el marcador serológico HBeAg, 50 muestras fueron reactivas siendo 8 donantes repetitivos y 42 de primera vez, las restantes fueron reactivas para anti-HBe. Todas las muestras fueron analizadas en ID-NAT y MP-NAT.

El análisis de datos mostró que 50 muestras de donantes de sangre HBsAg no reactivo y HBeAg reactivo fueron positivas con MP-NAT e ID-NAT, de las 203 muestras HBsAg y anti-HBe reactivo, el 80,3% fueron positivas con MP-NAT y 97,5% con ID-NAT y de las 40 muestras negativas con MP-NAT, 35 fueron reactivas ID-NAT. Las muestras no detectadas por MP-NAT tenían 186 copias/ mL un nivel bajo de detección.

Finalmente, el autor menciona que los resultados obtenidos son similares a los de otros estudios que la prueba NAT no detecta el 100% de las muestras positivas para el virus B, porque el ADN del HBV no es detectable en todas las donaciones potencialmente infectadas y que es eficiente cuando se utilizan muestras individuales para NAT. Adicionalmente se requiere tecnologías más sensibles capaces de detectar de 1000 a 2000

copias/ mL y en países donde es inaccesible las pruebas NAT debe procurarse reactivos con una sensibilidad analítica alta. (Bouchardeau, y otros, 2006)

Artículo 3: Diagnostic algorithm for HBV safe transfusión: Jean-Pierre Allain, Daniel Candotti, 2009.

El objetivo de este estudio fue confirmar la presencia del ADN viral del HBV en donantes que no presentan el marcador serológico del antígeno de superficie HBsAg y diseñar un algoritmo diagnóstico para la confirmación de la presencia del HBV ADN y obtener una seguridad transfusional; desde sus inicios las pruebas moleculares fueron implementadas para detectar las infecciones virales en el transcurso del período de ventana para virus que se replican de manera acelerada como el HCV y HIV que duplican su carga viral en 14 y 20 horas respectivamente. (Kleinman S. H., 2006) . Cuando se añadió la determinación de ADN viral de HBV al mini pool (MP) de HCV y HIV-1, se redujo la sensibilidad de forma crítica, los ensayos triplex podían detectar de manera simultánea los tres genomas virales, no obstante, se encontraron discrepancias entre la determinación serológica del HBV y el ADN viral. Se afirma que el HBsAg será detectable una vez que las cargas virales fluctúen entre 1000 - 100000 UI/mL, (Kleinman S. H., 2006)

La infección oculta por el virus de la Hepatitis B (OBI) constituye un reto más en la seguridad transfusional ya que ha sido identificada con mayor frecuencia en donantes aparentemente sanos, su detección consiste en determinar HBV-ADN sin la presencia de HBsAg y acompañado de anti- HBc. Los donantes OBI son por lo general adultos mayores en los que la carga viral <1000 IU/mL e incluso pueden ser <100 IU/mL, la mitad de estos casos tienen la presencia de anti-HBs, confirmando la resolución de la infección y otros pocos no presentan anti-HBc y anti-HBs esto es conocido como infección oculta “primaria” por HBV con HBsAg negativo. (Akira Yosikawa, Gotanda, & Minegishi, 2007), constituyendo un reto para la detección de estos donantes, por lo que el autor plantea cuatro análisis que deben ser considerados para determinar un algoritmo apropiado para alcanzar una seguridad transfusional.

Confirmación de ADN del HBV: existen ensayos comerciales denominados triplex que se caracterizan por revelar la presencia del genoma viral (VIH-VHC-VHB) con una sola señal independientemente del virus que ha sido detectado por lo que no son considerados útiles. Otro tipo de ensayos triplex permiten detectar específicamente que genoma viral está presente a través de una sonda marcada con un espectro diferente. Es necesario que la elección de los ensayos comerciales sea aquellos que pueden discriminar el genoma

viral detectado (dHBV, dHCV, dHIV-1) y evitar el uso de pruebas denominadas discriminatorias que son ensayo de repetición en forma individual de cada muestra del mini-pool que conlleva demoras en el tiempo de detección.

Una de las dificultades en estos ensayos es la discriminación de las muestras con hepatitis oculta (OBIs) puesto que este tipo de donantes poseen una carga viral muy baja y lo que se necesita primordialmente es incrementar la sensibilidad del ensayo, para ello en las pruebas denominadas triplex se recomienda incrementar el volumen de plasma extraído de 0,2 a 0,5 mL y hasta 1 mL o más, o realizar una ultra centrifugación de volúmenes de plasma de 5 – 10 mL y recolectar el pellet donde se encontrarán concentradas las partículas virales; se ha observado que la metodología de centrifugación es muy eficiente.

Serología de HBV: la aplicación de las pruebas serológicas fue relacionada con la prevalencia de la infección, así en las áreas de baja prevalencia la introducción del marcador serológico de anti-HBc ayuda de manera significativa a la confirmación de la infección viral demostrándose al ser confirmada la presencia del virus mediante la prueba molecular de ADN-HBV; mientras que en países de elevada prevalencia el anti-HBc no es discriminatoria entre falsos o verdaderos positivos. El uso de los ensayos IgM anti- HBc ha demostrado ser muy valioso para definir tanto la fase de recuperación como la fase crónica o la presencia de OBI. Uno de los ensayos utilizados en este estudio fue Abbot PRISM por ser más sensibles para la determinación del HBsAg, los donantes OBI a menudo poseen cepas del HBV con una región hidrofílica del antígeno de superficie mutado (MHR) indetectable con ensayos de baja sensibilidad.

Diseño de algoritmo diagnóstico y confirmatorio de HBV ADN: el propósito del autor en esta fase del estudio fue estimar la infectividad del donante y obtener información necesaria para diferirlo. Por lo que estableció tres pasos para el diagnóstico final de HBV

Paso 1: Confirmación de HBV ADN: se sugiere la evaluación de las metodologías utilizadas para la detección de ADN, así como la repetición de los análisis, una muestra reactiva deberá ser procesada por duplicado o triplicado al verificar su reactividad en los marcadores serológicos de HBsAg o anti-HBc promoviendo que la detección de la carga viral sea efectiva.

Existen discrepancias en las pruebas moleculares en mini-pool MP-NAT debido a la carga viral baja del HBV por lo que se requiere validar estas metodologías. El PCR tiempo real es más sensible y permite detectar los estadios de infección así en período de ventana cuando la carga viral es de aproximadamente >100IU/mL, en una hepatitis oculta (OBI)

<100IU/mL. (Candotti, Grabarczyk, & Ghiazza, 2008). Otra opción para aumentar la sensibilidad de las pruebas es aumentar el volumen de plasma durante la extracción de ADN viral, centrifugar a elevadas velocidades para concentrar las partículas virales, así como el uso de regiones de amplificación como el Pre-core, la región básica promotora del núcleo (BCP/PC) y la región Pre-S1-Pre-S2 (pre-S/S), esta secuenciación provee información importante para la identificación genotípica del virus.

Paso 2: Información proporcionada por las pruebas serológicas para los marcadores del HBV: en este paso el autor menciona la importancia del análisis de la reactividad de los marcadores serológicos por la información que ofrecen para comprender el estado de la infección.

El marcador de anti-HBc es indicativo de infección reciente, crónica y de contacto con el virus, la combinación con reactividad en anti-HBs indica la neutralización del virus de B, pero si existe solo reactividad en anti-HBc, ADN HBV y un título <200IU/mL de anti-HBs es indicativo de una infección oculta de hepatitis B- OBI. Sin embargo, cuando existen variantes del virus MHR no son detectadas en reactivos con baja sensibilidad convirtiéndose en un problema su identificación serológica.

Paso 3: Seguimiento de las pruebas: la finalidad del seguimiento es distinguir entre un periodo de ventana o establecimiento de la infección cuando el donante ha sido diferido, el autor recomienda la recolección de muestras posteriores a la primera donación después de 1 mes, 2 meses y 6 meses.

El período de ventana evidencia una carga viral >100 IU/mL y únicamente cuando la carga supera 2000UI/mL se observa la presencia del antígeno de superficie y luego de un mes se puede manifestar la seroconversión del anti-HBc.

Otra función del seguimiento es recolectar y analizar las muestras en forma pareada para determinar si fue infección o contaminación en el laboratorio, las infecciones verdaderas mantienen o aumentan la reactividad de la muestra inicial. Algunos bancos de sangre mantienen una seroteca que puede ser con fines legales ante una transmisión del virus B o una seroconversión del donante o con propósitos investigativos que permitan tener un criterio claro ante la inclusión del donante diferido.

Estos son datos que permiten conocer el establecimiento de la infección y el riesgo de transmisión postransfusional en períodos de ventana, en mutantes de B o seroconversión.

Finalmente plantea **Paso 4: Diagnóstico y toma de decisiones:** En base a los análisis presentados a aquellos donantes que sean diferidos por presentar diagnósticos dudosos por el período de ventana debe explicarse que existe el 95% de posibilidades de resolución espontánea, pero debe ser verificado con pruebas posteriores, una de las explicaciones es que la mayoría de los donantes son adultos con un sistema inmunitario maduro capaz de controlar al virus, sin embargo, durante varias semanas son altamente infecciosos.

En el caso de un diagnóstico de OBI, con o sin anti-HBs reactivo no constituye un riesgo de infección entre parejas sexuales, pero si se ha estimado un riesgo de transmisión en donaciones de sangre, aproximadamente entre 3 y 50% de muestras reactivas únicamente con anti-HBc, con niveles bajos o detectables de anti-HBs. En contraste, los mutantes del VHB sin detección de HBsAg son altamente infecciosos por lo que se requiere de un adecuado tamizaje.

Con estos resultados se puede inferir que se requiere de un exhaustivo análisis de la inclusión o exclusión de marcadores serológicos y virológicos para obtener una transfusión segura. (Allain & Candotti, 2009).

Artículo 4: Blood donation screening for hepatitis B virus markers in the era of nucleic acid testing: are all tests of value?. Stramer, S. L., Zou, S., Notari, E. P., Foster, G. A., Krysztof, D. E., Musavi, F., & Dodd, R. Y. (2012)

El propósito principal de este estudio fue demostrar los beneficios de la implementación de la tecnología de amplificación de ácidos nucleicos (NAT) en los bancos de sangre y la realización de los ensayos en conjunto con las pruebas serológicas de detección del virus Hepatitis B (HBV). Los ensayos triplex en minipools (MP-NAT) estaban constituidos por 16 muestras de donantes de sangre.

El estudio fue realizado en la American Red Cross (ARC) en colaboración con el National Genetics Institute por un año, desde 1 julio del 2009 hasta el 30 de junio del 2010, se utilizó el reactivo de Ultrio (MP-NAT) (ID-NAT) para la detección de ADN VHB, multipret ROCHE, y pruebas serológicas rutinarias para el antígeno de superficie (HBsAg), anticuerpos core (anti-HBc) de Abbott Diagnostics PRISM ChLIA, y la prueba para el anticuerpo de superficie (anti-HBs) de Monolisa Bio-Rad diagnostics, todas autorizadas por la Food and Drug Administration (FDA).

Las muestras que fueron reactivas para HBsAg y anti-HBc y las negativas en NAT fueron verificadas en ID NAT, mientras que las que tuvieron resultados reactivos en MP-NAT no fueron procesadas nuevamente. Todas las muestras que tuvieron resultados en uno o más marcadores serológicos fueron testadas en pruebas moleculares. La sensibilidad del MP-NAT Ultrio es de 95% y detecta alrededor de 700 copias/ mL mientras que el ID-NAT detecta hasta 20 copias/mL y la de Ultra Qual detecta hasta 5 copias/mL.

Se procesaron casi 6.5 millones de donaciones y el análisis de datos mostró que 16465 fueron reactivas por lo menos para uno de los marcadores de infección y 699 fueron confirmadas con infección por el virus de hepatitis B, es decir, el 0,01 % de donaciones 1 de cada 9240 personas son portadoras el virus; los ensayos efectuados en minipool (MP-NAT) determinaron 477 de los casos reactivos (68%), y solo dos donantes fueron confirmados por PCR real time con resultados negativos en serología.

Las cargas virales fueron fluctuantes de acuerdo con los casos y estadios de infección, dos muestras confirmadas por PCR fueron cuantificadas con 100 y 4100 copias/mL, ocho donantes presentaron cargas virales entre 50-400 copias/mL de estos seis previamente vacunados. Los casos no reactivos en el minipool (MP-NAT) se volvieron a evaluar de manera individual (ID-PCR), se obtuvo como resultado 121 casos definidos como infecciones ocultas por el virus de la Hepatitis B con cargas virales establecidas entre 100 – 800 copias/mL y anti HBc reactivo y no reactivos para HBsAg; sin embargo 100 donantes presentaron reactividad para ambos marcadores HBsAg y anti-HBc sus cargas virales oscilaron entre 100 -1900 copias/mL y solo uno no reactivo para anti-HBc fue confirmado por PCR individual con una carga viral de 5 copias/mL

Los donantes de sangre en período de ventana constituyen un alto riesgo para la transmisión del virus a través de las transfusiones, el análisis de estos resultados corroboran que la combinación de los marcadores tanto serológicos como moleculares ayudan a determinar los verdaderos positivos y los estadios de la infección, también determinaron que el agrupamiento de las muestras en minipool (MP- NAT) disminuye la sensibilidad de la prueba y que las cargas virales muy bajas dificultan su detección necesitando una serie de ensayos para ser identificadas.

Finalmente se demuestra que el MP-NAT tiene una sensibilidad reducida, pero es muy útil para la identificación de período de ventana porque la carga viral se manifiesta en forma temprana en comparación de los marcadores serológicos, por otra parte, se genera también polémica en la implementación única del MP-NAT como contribución a la seguridad transfusional. (Stramer, Zou, & Notari, 2012)

Artículo 5: Hepatitis B virus testing by minipool nucleic acid testing: does it improve blood safety?. Stramer, S. L., Notari, E. P., Krysztof, D. E., & Dodd, R. Y. (2013).

Este estudio fue la continuación del publicado en el año 2012, el propósito principal fue demostrar los beneficios de la implementación del NAT y verificar la incidencia del virus de la Hepatitis B (HBV) durante un periodo de dos años, se realizaron estimaciones del riesgo residual para donaciones en los Estados Unidos calculados de la siguiente manera:

a) incidencia calculada por el denominado *enfoque de rendimiento* de HBsAg que es el número de muestras HBsAg reactivas, anti-HBc no reactivo, mientras que la tasa de rendimiento para ADN-VHB lo definió como el número de muestras seronegativas que fueron confirmadas por MP-NAT dividido por el número total de donaciones.

b) incidencia dividiendo la tasa de rendimiento de HBsAg por *el período de ventana* que es de 44 días (0,12 años), el *riesgo residual* para HBsAg se determinó multiplicando la tasa de incidencia calculada por 100,000 personas-año por el período de ventana de prueba negativa (en años), los autores utilizaron las cifras publicadas de 30 o 38 días (0.104-0.082 años) dependiendo de una dosis infecciosa de 1 o 10 copias de ADN del VHB (Kleinman S. H., 2006).

c) el impacto de MP-NAT en el riesgo residual de hepatitis B se determinó restando el número de donaciones positivas ADN-HBV del total de donantes infectados obtenidos en el cálculo de riesgo de rendimiento de HBsAg (Zou, y otros, 2009), por último se utilizó un software llamado Crystal Ball, Decisioneering, Denver para estimar rangos de distribución triangular para simular aproximaciones de los intervalos de confianza a un 95%.

Determinación de la Incidencia del virus HBV y el riesgo residual

Incluyeron todos los tipos de donantes un total de 12,8 millones de donaciones fueron testadas para los marcadores serológicos y virológicos, 12'740951 fueron no reactivas en todas las pruebas (99,75%), mientras que 1368 (0,11% o 1:9337) tuvieron resultados reactivos y fueron confirmados en pruebas moleculares. De 29909 muestras reactivas para anti-HBc 1336 dieron resultados positivos para el virus de hepatitis B, la prueba de MP-NAT logró identificar 1112 muestras reactivas y se confirma la presencia del virus en 941, mientras que 171 fueron resultados falsos positivos.

Lograron evidenciar 936 muestras positivas para todos los marcadores tanto serológicos como moleculares y 5 muestras que fueron positivas para MP-NAT y 25 para HBsAg, es decir, un total de 30 muestras en infección aguda temprana por el virus de hepatitis B. También se determinó infección oculta por el virus de la hepatitis B (OBI) en 273 donaciones, de las cuales el MP-NAT solo detectó 35(12,8%) y las 238 (87,2%) restantes solo se detectaron por PCR con cargas virales entre 100 – 800 copias/mL; por otra parte, se obtuvieron dos determinaciones falsas positivas para el PCR una en cada año de evaluación.

Se estimó una tasa de incidencia para la infección por HBV de 1,62 por cada 100000 donaciones y se observó reducción en comparación a la última tasa de incidencia publicada basada en datos de noviembre del 2006 a julio del 2008 de 3.43 por cada 100000 donaciones; además con un intervalo de confianza del 95% se logró estimar un riesgo residual y un periodo de ventana de 30 -38 días lo que reflejó una dosis infectiva de 10 a 1 copia/20mL. (Kleinman S. H., 2006) El riesgo residual estimado en ausencia de implementación HBVMP-NAT fue 1:592.000 a 1:754.000 donaciones dependiendo del periodo de ventana seleccionado, mientras que con un intervalo de confianza del 95% va desde 1:1'031.000 a 1:350.000 y 1:1'351.000 a 1:452.000. Así, el riesgo residual de HBV disminuyó debido a la reducción de la incidencia por vacunas y mejoras proporcionadas por la implementación de MP-NAT, también se observó que todas las muestras con HBsAg positivo fueron confirmadas con el uso de algún marcador molecular, lo que conlleva a respaldar que la implementación del MP-NAT podría eliminar la necesidad de realizar pruebas serológicas de HBsAg, sin embargo se enfatizó que el 0,91% (273) del total de donantes seropositivos para anti-HBc tuvieron infección oculta por el virus, se sigue observando que el MP-NAT no pudo detectar gran cantidad de muestras de donantes seropositivos OBI en un 88% con cargas virales inferiores.

Durante el periodo 2009 – 2011, los autores evaluaron 10,54 millones de donaciones repetidas en los Estados Unidos y confirmaron una reducción del riesgo residual después de la implementación del ensayo triplex MP-NAT en un 23% también estimaron un periodo de ventana de 8,8 días para la metodología de MP-NAT antes de la detección por parte de la metodología PRISM HBsAg y que mientras las metodologías fueron más sensibles para el análisis del NAT como ID-NAT o Ultrio Plus estos ensayos detectarán hasta 19,9 días antes de que aparezca positividad para HBsAg. Con estos resultados los autores mencionan que las conclusiones relacionadas con la publicación anterior no han cambiado sin embargo se ha podido demostrar de forma medible el impacto

de MP-NAT con las medidas de incidencia y que anti-HBc es un indicativo de hepatitis oculta.

Por último, los autores afirman que el MP-NAT y sus tecnologías más sensibles, en conjunto con las políticas de vacunación para HBV de los Estados Unidos contribuyeron en la reducción del riesgo residual del HBV y tienen un impacto medible en la seguridad transfusional, afirmando con mucho énfasis que es requerida una examinación continua por los tres marcadores para HBV, HBsAg, anti-HBc y NAT. (Stramer, Notari, Krysztof, & Dodd, 2013).

Artículo 6: Occult Hepatitis Infection in Transfusion Medicine: Screening Policy and Assessment of Current Use of Anti-HBc Testing. Esposito, A., Sabia, C., Iannone, C., Nicoletti, G. F., Sommese, L., & Napoli, C. (2017)

El propósito de este estudio fue brindar una visión general de los diferentes enfoques para el tamizaje del HBV a través de pruebas rutinarias, enfatizando en la detección oportuna de la infección oculta de Hepatitis B (OBI), evaluando de manera crítica el papel de las pruebas serológicas y las pruebas moleculares de amplificación de ácidos nucleicos (NAT), pero principalmente se centraron en la viabilidad para la realización de pruebas anti-HBc.

Infecciones Ocultas de Hepatitis B

Durante un periodo cercano a los 30 años se demostró que donantes de sangre con infección de oculta de hepatitis B fueron capaces de transmitir el virus y han demostrado la existencia de donantes con resultados de HBsAg negativos y anti-HBc positivos. En este estudio se han analizado varios criterios y definiciones para el OBI, y también se consideró que el estándar de oro para el análisis del OBI es la biopsia hepática, pero al ser muy invasiva lo mejor es recurrir al análisis por pruebas serológicas y moleculares de HBV.

Según el taller internacional de definición sobre OBI, existen dos clasificaciones: el OBI seropositivo definido por no presentar HBsAg y positividad para anti-HBc y/o anti-HBs, este tipo de donantes expresan seroconversión de HBsAg después de algunos meses durante la fase aguda de infección, en cambio para la fase crónica el aclaramiento de HBsAg se logra en años; y el OBI seronegativo que es aquel que no presenta anti-HBc y anti-HBs, si están presentes los anticuerpos anti-HBs desaparecen progresivamente con una seroconversión anti-HBc sin HBsAg detectable (Manzini, y otros, 2009)

Otra de las definiciones dadas fue la de falso OBI cuando los niveles detectables de ADN HBV son similares a los que se presentan en las distintas fases de una infección por el virus, esto ocurre cuando existe una falta de sensibilidad de los métodos serológicos utilizados para la detección del antígeno de superficie HBsAg, misma que puede ser atribuida también a la variabilidad en el genoma del virus B alterando su antigenicidad e inmunogenicidad, así como también a mutaciones puntuales en regiones específicas del genoma como las que ocurren en la región hidrofílica mayor (MHR) que está relacionada con la disminución de HBsAg. (Huang, Yuan, Chen, Zhang, & Chen, 2012)

Infecciones en donantes de sangre por hepatitis oculta OBI

Estudios retrospectivos dentro y fuera de Europa ratificaron infectividad postransfusional por hemocomponentes de donantes portadores de OBI, en Italia se encontraron dos casos de hepatitis postransfusional, se realizó una secuenciación del genómica tanto en muestras del donante como el receptor, confirmándose la presencia del virus (Spreafico, Berzuini, Foglieni, & Candotti, 2015); en otro estudio la Cruz Roja Japonesa a través de su sistema de hemovigilancia confirmó la aparición de infecciones de HBV en 19 pacientes en los que no se detectó ADN viral en primera instancia, además se detalla que el riesgo residual no disminuyó con los años. (Taira, y otros, 2013)

La tasa de transmisión viral por hemocomponentes con OBI es 10 veces inferior a las observadas en casos de período de ventana previo a la seroconversión, este riesgo es evidente, sin embargo se han minimizado al incluir procesos estrictos de selección de donantes y exclusión de grupos de alto riesgo entre estos, hemodiálisis, pacientes transplantados, usuarios de drogas, coinfección de HIV/HCV, un dato de importancia para la detección de portadores es la dificultad de evidenciar la existencia de enfermedades hepáticas o signos clínicos de daño hepático.

La presencia del marcador anti-HBc, sin presencia de ADN detectable y HBsAg, sugiere que las cargas virales se encuentran por debajo del nivel de detección; la capacidad infectiva de OBI está dada por la carga viral, el estado serológico y el tipo de donante de sangre sea este voluntario o de reposición y el estado inmunológico del receptor, si este es inmunocomprometido la probabilidad de infección es elevada.

Detección de infecciones ocultas de hepatitis B en Donantes de sangre

Si bien no existe un algoritmo global para la determinación de infecciones ocultas por HBV, es necesario mantener un elevado criterio de interpretación de pruebas para identificar

portadores OBI, las pruebas han demostrado ser cada vez más sensibles, la detección HBsAg como primer ensayo es obligatoria, en los países desarrollados la metodología es basada en ensayos inmunológicos enzimáticos (ELISA) e inmunoensayos de quimioluminiscencia (CLIA) con límites inferiores a los 0,1 ng/mL de HBsAg y una eficaz detección de mutantes HBsAg, así también la inclusión de anti-core HBc y el uso de NAT. (Kuhns & Busch, 2006)

¿Incluir o no la prueba serológica de anti-HBc?

El marcador anti- HBc es introducido al cribado de HBV en 1980 por primera vez, usado para verificar la exposición previa al virus y aquellos casos OBI en los que el HBV ADN fue detectado discontinuamente, en Italia los dos casos de transmisión propusieron que las muestras deben ser probadas por anti-HBc, sin embargo los ensayos generan una gran cantidad de falsos positivos del 90% (Allain & Candotti, 2009). El instituto alemán Paul Ehrlich recomendó realizar dos ensayos anti-HBc, cuando el HBV ADN no ha sido identificado y el HBsAg no es detectable, se consideró liberar los Hemocomponentes que presentaron un título ≥ 100 UI/mL de anti-HBs. En la última década los laboratorios con bajos recursos realizan anti-HBc los mismos que no han implementado el NAT por su alto costo.

Para garantizar la seguridad en el banco de sangre de la Università degli Studi della Campania en Italia y reducir el riesgo de transmisión HBV, todos los donantes son evaluados por pruebas serológicas anti- HBc, HBsAg y HBV ADN MP-NAT, si solo existe reactividad para anti-HBc se realiza la prueba de anti-HBs para determinar la capacidad infectiva del hemocomponente; todos los marcadores serológicos son realizados por Architect i2000SR Abbott Diagnostics, mediante inmunoensayos de quimioluminiscencia de micropartículas (CMIA), se consideró una buena práctica de laboratorio repetir el ensayo del marcador anti-HBc por otra metodología, un sistema de confirmación secundario se puede realizar electro-quimioluminiscencia (ECLIA) por Cobas 411 Roche Diagnostics, se determinó que el 1,26% de donantes solo presentaron reactividad anti-HBc y que es recomendable diferir estos donantes para una seguridad optima transfusional, por otra parte donantes con títulos de anti HBs entre >10 UI/mL y <100 UI/mL deben esperar varias semanas para ser reevaluados y no ser excluidos. (Juhl, Knobloch, Görg, & Hennig, 2016)

Finalmente se concluye que el OBI se considera un problema grave en países en vías de desarrollo, mientras que en países desarrollados se considera un evento raro, respaldando implementar ID-NAT en zonas endémicas para HBV y en países no endémicos se manifestó que la implementación del MP-NAT podría ser suficiente, con el pasar del tiempo todos los estudios concluyen que la combinación de pruebas moleculares

con serológicas ayudan a respaldar la seguridad en los hemocomponentes y es necesario el tamizaje serológico anti-HBc a pesar de la elevada sensibilidad del NAT las cargas virales fluctúan por debajo de los límites de detección, siendo un posible portador de OBI; el anti-HBc simplemente sería una medida preventiva para la transmisión del OBI por transfusión. (Esposito, y otros, 2017) .

Artículo 7: Sensitivity of individual donor nucleic acid testing (NAT) for the detection of hepatitis B infection by studying diluted NAT yield samples. Arora, S., Doda, V., & Kirtania, T. (2015).

El propósito principal del presente estudio fue analizar la sensibilidad que tiene el NAT para la detección de la infección oculta por el virus de la Hepatitis B (OBI), sin la presencia de antígeno de superficie (HBsAg), tomando en consideración que los anticuerpos anti-HBc están presentes en un 80% de los casos.

Este estudio fue realizado en el banco de sangre del Hospital de Gobierno Central en la India entre enero del 2012 a diciembre del 2013, todas las muestras fueron tamizadas en ID-NAT un total de 28.465 donaciones fueron recolectadas, se realizaron análisis serológicos en inmunoensayos enzimáticos tipo sandwich (ELISA) para HBsAg, quimioluminiscencia de micropartículas para anti-HBc, anti-HBs y también todas las donaciones se sometieron a detecciones individuales de amplificación (ID-NAT) Procleix Ultrio, Novartis Diagnostis y el PCR en tiempo real por Abbott Illinois para la evaluación de cargas virales utilizando un factor de conversión de 1 IU/mL es equivalente a 3,4copias/mL, además se realizaron genotipificaciones del virus cuando la carga fue >5000 copias/mL.

El riesgo de transmisión del virus HBV por donaciones en período de ventana es elevado en países endémicos como la India (Agarwal, Chatterjee, Coshic, & Borgohain, 2014), en aproximadamente 2 años de estudio se recolectaron un total de 28.465 donaciones, 28.134 muestras fueron no reactivas para HBsAg y de éstas solo 25 donaciones fueron positivas en NAT individual (ID-NAT), utilizaron estas muestras para simular mipools diluyéndolas con plasma de grupo AB para la evaluación de la sensibilidad y el rendimiento del NAT se utilizaron diluciones (1:2,1:4,1:8,1:16) no se diluyeron las muestras para estudios serológicos ni para cargas virales, 7 muestras fueron eliminadas del estudio por demostrar deterioro. Las 18 muestras fueron testeadas por NAT de dos maneras, sin diluir y también diluyéndolas, 9 donaciones presentaron positividad en el NAT con títulos >1:4, 7 de éstas tenían reactividad para anti-HBc y solo 2 presentaron anti-HBs, la carga viral de las 9 donaciones varió entre 16 y 1×10^8 IU/mL, y las otras 9 presentaron positividad para títulos <1:4, 5 de éstas presentaron Anti-HBc reactivo y anti-HBs fue

reactivo en solo 2 donaciones; no se determinó carga viral en 3 donaciones y en las otras 6 se evidenciaron <10-38 IU/mL.

En la India se continúa observando la transmisión de Hepatitis B por donaciones de sangre, principalmente debido a donantes OBI y también en donaciones de período de ventana, aunque se realiza de forma obligatoria la detección de HBsAg no es suficiente, el riesgo del contagio es evidente ya que las cargas virales anteriores a la seroconversión de HBsAg son bajas y pueden escapar al MP-NAT, este es preferido en el mundo occidental donde la prevalencia para HBV es baja (Stramer, Notari, Kryzstof, & Dodd, 2013). En este estudio se observó que la combinación de las pruebas serológicas HBsAg y anti-HBc podrían ser adecuadas, sin embargo 6 muestras fueron negativas para anti-HBc y 4 de estas abrían escapado a la detección en MP-NAT, es decir, un tercio de las muestras no presentaron estos marcadores serológicos existiendo falla en la identificación del 30% de donantes HBV potencialmente infecciosos.

Los autores finalmente mencionan que la detección para el HBV en donantes de sangre ideal son el tamizaje con marcadores de HBsAg, anti-HBc y NAT, y que el ID-NAT ayuda a la detección de cargas virales bajas, y se evidenció que las determinaciones en Minipools pueden comprometer la seguridad de la sangre por la dinámica viral muy variante de HBV. (Arora, Doda, & Kirtania, 2015).

Artículo 8: Blood donor testing for hepatitis B virus in the United States: is there a case for continuation of hepatitis B surface antigen detection? Dodd, R. Y., Nguyen, M. L., Kryzstof, D. E., Notari, E. P., & Stramer, S. L. (2018).

El propósito principal de este estudio fue demostrar los beneficios de la implementación del NAT y verificar la tendencia de la incidencia del virus de la Hepatitis B (HBV) durante un periodo de cuatro años, fue realizado por la Cruz Roja Americana (ARC) en colaboración con el National Genetics Institute (NGI), desde julio del 2011 hasta junio del 2015 se analizaron alrededor de 22,4 millones de donaciones realizando los ensayos moleculares (MP-NAT) (ID-NAT) en conjunto con las pruebas serológicas para el virus Hepatitis B (HBV), antígeno de superficie HBsAg y anticuerpos anti-HBc.

Se realizaron ensayos en minipools triplex (MP-NAT) con dos metodologías para el análisis molecular Procleix Ultrio y Procleix Ultrio Plus con un límite de detección de 10UI/mL y de 3.1 UI/mL respectivamente, se analizaron 16 donaciones simultáneamente para la evaluación del HBV ADN (Stramer, Notari, Kryzstof, & Dodd, 2013). El análisis serológico tanto para HBsAg y anti-HBc fue efectuado por inmunoensayos de quimioluminiscencia en la plataforma Abbott PRISM, confirmándose la positividad

mediante el uso de (ID-NAT) y ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) UltraQual con muestras obtenidas desde las bolsas de plasma reactivas para marcadores serológicos o MP-NAT, y análisis por triplicado aquellas muestras solo anti-HBc reactivas, NAT negativas, por PCR Cobas Ampliscreen multiprep de Roche que tiene una sensibilidad de 1 a 2 IU/mL (4 – 10 copias /mL).

El análisis en 22'370.271 donaciones, evidenció anti-HBc reactivo en 49.567 donaciones, 2.987 fueron reactivas HBsAg y 1.632 fueron reactivas para ambos marcadores serológicos de manera repetida; MP-NAT tuvo capacidad de detectar 1.472 donaciones, 48 presentaron positividad únicamente para NAT y 29 confirmaron la positividad HBV ADN con cargas virales oscilantes entre 50 y 70.000 copias/mL. Las donaciones reactivas para anti-HBc y negativas para HBsAg con ADN viral detectable se definieron como OBI, se identificó 404 (0,82%) de OBI, de estas el 361 fueron detectadas por ID-NAT, es decir, 99,8% fueron falsos positivos, se identificó un total de 2.035 casos confirmados para HBV, de estos 1.453 (71,4%) detectables por MP-NAT y 582 (28,6%) detectadas por ID-NAT, 1.965 positivas confirmadas para anti-HBc, 1602 reactivas confirmadas para HBsAg con 1.170 falsos positivos, de las mismas se identificaron 144 no reactivas para ID-NAT, entre estos 47(33%) previamente vacunados, además se identificó 35 donaciones positivas para HBsAg y NAT, es decir muestras en período de ventana que confirmaron entre 4500 hasta 5000 millones de copias/mL de carga viral.

El análisis de datos demuestran que la incidencia y riesgo residual decrecieron en estos cuatro años posteriores a las primeras publicaciones de la Cruz Roja Americana, cuando se comparó los datos no tuvieron una variación significativa aunque existe una disminución desde 1,62 por cada 100.000 donaciones en la publicación anterior a 1,30 por cada 100.000, el rendimiento del NAT de 1: 2,6 millones de donaciones en el periodo anterior y 1:770.000 donaciones en este período, este incremento del rendimiento de la tecnología NAT se manifiesta gracias a la elevada sensibilidad del Ultrio Plus implementado, actualmente el riesgo residual de 1 en 1'060.000 o 1 en 1'520.000 para 26,5 o 18,5 días de período de ventana respectivamente, representa un declive que pudo ser evidenciado gracias a las políticas de vacunación obligatoria que existen en los Estados Unidos (Stramer, Notari, Krysztof, & Dodd, 2013). Al comparar los períodos de estudio no se observa un aumento en el rendimiento de la tecnología NAT para la evaluación del OBI, manifestando 0,91% en la anterior publicación y en esta actualización de datos 0,82%, sin embargo, el MP-NAT continua sin detectar gran cantidad del OBI y solo pudo detectar el 10,6 % de 404 muestras, entonces se acepta que la gran mayoría de donantes OBI poseen

cargas virales muy bajas que deben ser evaluadas por tecnologías ID-NAT de elevada sensibilidad.

Finalmente los autores mencionan que aunque algunas muestras exhiben resultados falsos positivos por contaminación, es extremadamente raro encontrar muestras que solo sean reactivas para HBsAg y negativas para los otros marcadores serológicos o molecular y que se requieren tecnologías moleculares altamente sensibles, y aun así no es suficiente para asegurar la transfusión sanguínea, además que las tendencias de la incidencia han disminuido con el pasar del tiempo, las estimaciones de la infección oculta e infección reciente también se han reducido en la población de donantes debido también a campañas de vacunación por lo que se debe analizar todo el contexto para determinar qué marcadores serológicos van a ser utilizados en conjunto con el molecular (Dodd, Nguyen, Krysztof, Notari, & Stramer, 2018).

Artículo 9: Comprehensive analysis of hepatitis B virus infections in blood donors in southern China that are surface antigen positive but nucleic acid testing negative. Ye, X., Li, T., Zhang, R., Liu, H., Zeng, J., Hong, W., Lu, L., Zhu, W., Li, S., Xu, M., Wu, S., & Chen, L. (2020)

El objetivo principal del estudio fue determinar las verdaderas infecciones de hepatitis B en donantes voluntarios de sangre ante la presencia de resultados reactivos en el marcador de ELISA HBsAg y negativas en la prueba molecular de NAT para ello incluyeron otras pruebas de mayor sensibilidad. Este estudio se realizó en el Shenzhen Blood Center en el Provincial Key Laboratory for Transfusion-transmitted Infectious Diseases en conjunto con el Instituto de Transfusión de Sangre, Academia China de Ciencias Médicas (CAMS) y Colegio Médico de la Unión de Peking (PUMC), se realizó el análisis de 10.025 donaciones desde el 2017 hasta el 2018. Todos los donantes fueron sometidos a pruebas rápidas (predonación) los que tuvieron resultados reactivos fueron diferidos, los restantes fueron sometidos a la prueba de ELISA y los que obtuvieron resultados reactivos por duplicado se realizaron pruebas de MP-NAT, aquellos que fueron negativos en el multiplex NAT fueron sometidos a pruebas complementarias para determinar HBsAg, anti-HBc, anti-HBs y HBe, ID- NAT.

Se efectuó el análisis simultáneo de dos inmunoensayos enzimáticos (ELISA-dual) para HbsAg, DiaSorin SPA –UK Branch y Wantai Diagnostics, para la confirmación HBsAg se realizaron pruebas suplementarias serológicas, entre estas, prueba adicional para HBsAg con un límite de detección (LOD) de 0,05UI/mL, anti-HBs con un LOD de 2UI/L, antígeno de Hepatitis B (HBeAg), anti-HBe y anti-HBc probadas por electro-quimioluminiscencia

(ECLI) en (HBsAg II quant, Elecsys), quimioluminiscencia de micropartículas (CMIA) y pruebas de neutralización de HBsAg en la plataforma Alinity de Abbott Diagnostics; además todas las muestras fueron analizadas en NAT individuales (ID-NAT) por la plataforma Ultrio Plus Tigris, Grifols con un límite de detección de 3,4 IU/mL; y para la confirmación del ADN se realizó el análisis en la plataforma de Roche MPX 2.0 ID- NAT con un LOD 2,3 UI/mL; en aquellas muestras indeterminadas se realizaron ensayos de PCR cuantitativo (qPCR) y PCR anidado con LOD de 5 y 10 UI/mL.

Los resultados permitieron a los autores clasificarlas en no confirmadas para hepatitis B aquellas que tuvieron resultados negativos en las pruebas complementarias; confirmadas las que fueron repetitivamente reactivas en serología y positivas en NAT, e indeterminadas las que fueron reactivas en serología, pero negativas en pruebas moleculares de ADN-VHB.

100.282 (99,26%) fueron HBsAg EIA / NAT negativo; 455 muestras HBsAg reactivo/ NAT positivo; 157 HBsAg EIA reactivo / NAT negativo, 131 donaciones negativas HBsAg en EIA fueron reactivas ID-NAT positivo. De las 157 muestras negativas en NAT; 35 (22,3%) presentaron resultados negativos en anti-HBc, CMIA, ECLIA y MP-ID-NAT negativo; de las cuales 23 tenían anti-HBs positivo y los 12 restantes fueron seronegativas por lo que fueron consideradas sin confirmación de hepatitis B; 45 con anti-HBc reactivo también fueron negativas para las pruebas complementarias observándose un total del 51% (80) de resultados falsos reactivos para HBsAg.

Las muestras que tuvieron resultados reactivos únicamente en anti-HBc (69) fueron también reactivas en las pruebas complementarias, 2 adicionales fueron negativas para ECLIA HBsAg, pero tuvieron resultados positivos en MP-ID NAT siendo consideradas como confirmadas para VHB, los niveles de ADN fue variables entre 6-2654 UI/mL.

Los ensayos cuantitativos de las 71 donaciones para HBsAg determinaron que 2 donaciones estaban bajo el límite de detección del ensayo, 39 donaciones estuvieron entre 0,05 y 1 UI/mL y 28 donaciones entre 1 - 100 UI/mL y que el nivel máximo detectado en estas donaciones fue de 398,70 UI/mL; al analizar las cargas virales solo 56 donaciones reflejaron niveles cuantificables de ADN HBV, entre éstas, dos < 10 UI/mL, 30 fueron entre 10 - 100 UI/ mL, 22 entre 101 y 1000 UI/mL, y dos con niveles >1000 UI/mL. La carga viral máxima fue 2654.3 UI/mL y la carga viral mínima fue de 6 UI/mL.

Los autores mencionan que más de la mitad de las donaciones que tuvieron resultados HBsAg reactivo/ NAT negativa fueron identificadas como falsos positivos por lo que se requiere un mejor manejo de la selección del donante y pruebas de detección, en contraste

con las muestras que fueron confirmadas con la infección de hepatitis B estas presentaron cargas virales bajas lo que sugiere la introducción de una prueba molecular sensible sin prescindir de las pruebas serológicas. (Ye, y otros, 2020).

Artículo 10: The Brazilian experience of nucleic acid testing to detect human immunodeficiency virus, hepatitis C virus, and hepatitis B virus infections in blood donors. Rocha, D., Andrade, E., Godoy, D. T., Fontana-Maurell, M., Costa, E., Ribeiro, M., Ferreira, A., Brindeiro, R., Tanuri, A., & Alvarez, P. (2018).

La propuesta de este estudio fue promover la seguridad transfusional evaluando la implementación, sensibilidad y especificidad de la plataforma NAT. El kit Bio Manguinhos es una prueba multiplex de amplificación y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real que identifica las secuencias virales de HCV, HIV y HBV, utiliza un control interno en cada prueba individual y puede procesar un máximo de 92 reacciones individuales y si se las agrupa en minipool de seis se logra el análisis de 552 muestras.

La sensibilidad analítica fue investigada mediante el manejo de diluciones seriadas dobladas de los estándares internacionales de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se probaron ocho réplicas de cada dilución durante tres días efectuando un total de 24 pruebas para cada virus. La especificidad del ensayo se realizó en 5520 muestras verdaderas negativas para Sífilis, Chagas, HIV-1/2, HCV, HBV y HTLV- I/II procesándolas nuevamente en el kit Bio-Manguinhos.

La genotipificación de los virus HIV, HCV y HBV se determinó mediante los paneles de genotipo del Instituto Nacional de Normas y Control Biológico (NIBSC), para HBV se utilizó el panel de genotipos Acrometrix HBV compuesto por ocho genotipos.

Durante el período 2008 – 2016 se analizaron un total de 13`610 536 donaciones y solo 5`795 424 se evaluaron para HBV los resultados demostraron que la plataforma NAT brasileña mostraba un límite de detección (LOD) de 9,08 UI/mL para HBV, en comparación con los ensayos comerciales Procleix Ultrio Plus y Cobas Taq Screen MPX se evidenció una sensibilidad menor. La FDA (administración de drogas y alimentos) de Estados Unidos requiere que los kits mantengan un límite de detección de 100 copias/mL para NAT y una sensibilidad mínima de 100UI/mL para ADN del VHB. Este kit demostró una buena especificidad sin evidenciarse falsos positivos al procesar 5520 muestras verdaderamente negativas y la robustez de la prueba se comprobó mediante un estudio de reproducibilidad, tanto interlote como intralote, además el rendimiento de la plataforma NAT brasileña fue de 7,24 por cada millón de donaciones superior con el rendimiento reportado en Europa y Norteamérica 2,97 y 3,1, todos los ensayos de las catorce plataformas instaladas utilizaron

reactivos de cuarta generación para la detección del antígeno de superficie HBsAg y anticuerpos contra el core (anti-HBc) que sumado a la prueba molecular se obtuvo una detección de casos de hepatitis logrando la anhelada seguridad transfusional. (Rocha, y otros, 2018).

Artículo 11. Prevalence, incidence and residual risk of transfusion-transmitted HBV infection before and after the implementation of HBV-NAT in northern Brazil. Corrêa, A., Lamarão, L. M., Vieira, P., de Castro, R., de Almeida, N., de Castro, J., de Lima, M., Palmeira, M. K., Meireles, A., & Burbano, R. R. (2018).

El propósito del estudio fue evaluar la prevalencia y comparar el riesgo residual de la infección por hepatitis B en donantes de sangre antes y después de la implementación de la prueba de NAT en los bancos de sangre brasileños.

Las pruebas serológicas utilizadas para la detección de hepatitis B en el principal centro de sangre de Brasil, HEMOPA son la detección de HBsAg y anti-HBc en la plataforma Architect (Abbott Laboratories, Alemania). La prueba molecular elegida fue la fabricada por Bio-Manguinhos minipool MP-NAT (6 muestras) con límite de detección de 50UI/mL aplicándose el ID NAT para la identificación de pruebas positivas detectadas en los minipools. Para el cálculo de la prevalencia de la infección tomaron en cuenta los resultados reactivos en el marcador de HBsAg, anti-HBc y confirmados con MP-NAT. La tasa de seroconversión se calculó en base a los donantes de sangre repetitivos que presentaron resultados de anti-HBc reactivos y confirmados con MP-NAT. Los autores de esta investigación consideraron de gran importancia establecer el riesgo residual como herramienta estadística para el cálculo de una seguridad transfusional.

Los cálculos que utilizaron fueron: incidencia año-persona (py)= número de donantes con resultado (HBsAg o HBV-NAT) positivo/número total de (py) en riesgo; el número de (py) en riesgo= suma de los días de intervalo entre donaciones.

Tiempo de riesgo= donante no infectado es desde la primera a la última donación en donantes repetitivos, este cálculo asume el riesgo de seroconversión.

El riesgo residual lo obtuvieron multiplicando la incidencia (py) para el período de ventana expresado como una fracción del año $RR = \text{incidencia (py)} \times (\text{prueba de screening período de ventana (WP)} / 365 \text{ días})$. WP antes de la implementación era 38,3 días y después 12 días de acuerdo con los fabricantes.

La investigación demostró que la introducción de la prueba MP-NAT HBV permitió detectar 6 casos de hepatitis oculta de las 45 332 muestras de donantes repetitivos que

fueron testadas anteriormente en el marcador HBsAg siendo negativas sinónimo de donantes con infección oculta de hepatitis B (OBI), la falta de detección de estos donantes ocasiona la transmisión de hepatitis B postransfusional. El riesgo residual calculado por los autores demostró que la introducción del NAT permite una detección más temprana de la infección que las pruebas serológicas, los resultados fueron antes de NAT 1:114,92 y después 1:294,11, con estos datos los autores establecen la importancia de la prueba NAT para evitar transmisión del HBV. (Corrêa, y otros, 2018).

Artículo 12. High rate of seromarkers for HIV, HBV and syphilis among blood donors using confidential unit exclusion, before and after HIV-NAT implementation at a major public blood bank in the Brazilian Amazon. Souza JC, Crispim MAE, Abraham C, Fraiji NA, Kiesslich D, Stefani MMA (2019).

El propósito del presente estudio fue describir las tasas de infecciones transmisibles por transfusión (TTIs) con el uso de exclusión confidencial (CUE) antes y después de la implementación de la tecnología de amplificación de ácidos nucleicos (NAT) en el Hemocentro de Manaus (HEMOAM) a partir de junio del 2010 a noviembre del 2015.

Esta metodología (CUE) fue usado desde la década 1980 con la finalidad de promover mayor seguridad de transfusión permitiendo al donante excluir sus donaciones de manera confidencial en base algún factor de riesgo no informado durante la entrevista. En la última década fue descontinuado el uso de CUE en los Estados Unidos mientras que en Brasil, Bélgica y Canadá se ha reportado su uso; en el año 2010 el Hemocentro de Manaus ofreció la opción de excluir las unidades de sangre para transfusiones a sus respectivos donantes, la controversia sobre su utilidad aumentó desde la implementación del NAT en Julio del 2012, por ser una metodología altamente sensible capaz de reducir riesgo de transmisión en período de ventana.

En lo que concierne al virus de la Hepatitis B (HBV) y su análisis serológico se analizó mediante la tecnología Abbott Diagnostics, anti-HBc II Architect System para anticuerpos “core” y HBsAg Qualitative II Architect System Abbott, Germany para antígeno de superficie, además se realizaron pruebas confirmatorias individuales para HBV en usuarios de CUE y no CUE, la opción CUE fue utilizada por 2154 donaciones (0,75%) y 11768 (4,1%) fueron reactivas para al menos un marcador serológico de infecciones transmisibles por transfusión (TTIs) de un total de 287588 donaciones, se evidenció que las donaciones asociadas a CUE tuvieron mayor probabilidad de resultados seropositivos que las no CUE, los donantes CUE tuvieron una mayor positividad confirmada para anti-HBc y HBsAg a un intervalo de confianza del 95 % OR= 1.81, 2.24–2.64 ; HBsAg OR = 5.68, 1.78–13.06. Se

identificaron un total de 2084 donaciones positivas para anti-HBc la mayoría fueron hombres de 16 a 34 años y la positividad para HBsAg se determinó en 73 donaciones.

Finalmente se concluye que uno de los mayores desafíos es la identificación de donantes potencialmente infecciosos en áreas endémicas para infecciones transmisibles por transfusión (TTIs), los cuales niegan comportamientos de riesgo y que el uso de CUE en los bancos de sangre ofrece una capa adicional para la seguridad de los hemocomponentes, además del uso de marcadores serológicos y moleculares (Souza, y otros, 2018)

3.2 Conclusiones basadas en análisis de artículos

Del análisis realizado de los 12 artículos elegidos para esta revisión bibliográfica se determina que las pruebas que deben implementarse en cada país para evitar la transmisión de hepatitis B dependerán de la incidencia, programas de vacunación, políticas propias de cada región, pero debe tomarse en cuenta las características propias de cada país.

Busch, M, (2004) concluye que la introducción del MP-NAT para detección del virus de hepatitis B es posible para incrementar la seguridad transfusional en relación con las pruebas serológicas, sin embargo, el dejar de utilizar el marcador serológico de HBsAg, anti-HBc y reemplazarlo por ID-NAT, es un riesgo debido a la existencia de donantes considerados “raros” portadores del HBV que carecen de antígenos detectables en marcadores serológicos, presencia de anticuerpos sumado a una carga viral baja, además sugiere que los costos de la prueba MP-NAT son altos para el rendimiento que puede ofrecer.

Bouchardeau, F; Girault, A; Razer, A; Servant-Delmas, A, et al., (2006) demostró que el ADN del HBV no es detectado en todas las muestras de donantes de sangre que son reactivas para HBsAg y que la prueba de NAT es eficiente cuando se realizan en pruebas individuales ID-NAT y sensibles es decir que detecten entre 1000 a 2000 copias/mL además señalan que la interrupción de la prueba del antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg) debe ser analizada especialmente en países donde no se usan pruebas de anti-HBc, recomiendan un análisis muy cauteloso especialmente en países con bajos recursos para la implementación de pruebas moleculares y que el reemplazo de HBsAg por NAT altamente sensible sumado a la realización de pruebas de anti-HBc podría realizarse luego de ser validado.

Allain, J.P & Candotti, D. (2009) mencionan que los donantes de sangre con hepatitis B oculta (OBI) han sido mayoritariamente identificados a través de pruebas serológicas que moleculares y que pertenecían al grupo etario >50 años característica que debería ser tomada en cuenta en el momento de la selección del donante, estos individuos se caracterizan por poseer cargas virales bajas de tal manera que la prueba de MP-NAT no las detecta.

También encontraron casos excepcionales de donantes de sangre con resultados negativos en los marcadores serológicos de anti-HBc y anti-HBs con resultados positivos en ID-NAT, estos resultados permitieron a los autores concluir que debe validarse cuidadosamente el algoritmo de detección para hepatitis B y debe considerarse a los dos tipos de marcadores serológicos y moleculares con el objetivo de prevenir la transmisión del virus.

Stramer, S.L, Zou,S, Notari, E.P, et al., (2012), demostraron que la introducción de triplex MP-NAT es una metodología para identificar donantes infectados por HBV de forma temprana a las pruebas serológicas, es decir durante el período de ventana, sin embargo no detecta donantes con niveles bajos de ADN-HBV, demostrando que el uso de MP-NAT, HBsAg y encuesta de donación ya no son suficientes para contribuir a la seguridad de los hemocomponentes y recomienda la introducción de pruebas moleculares sensibles e individuales así como mantener los marcadores serológicos existentes y obligatorios en cada país.

Stramer, S.L, Notari, E.P, Krysztof, D.E, et al., (2013) determinan que la introducción de NAT para el virus de hepatitis B en los Estados Unidos en mini pools, más la vacunación contribuyó a la seguridad transfusional y afecto en la presencia del riesgo residual lográndose una disminución, pero persiste la necesidad de continuar la utilización de los tres marcadores serológicos, insiste en que debe realizarse la disminución en el número de muestras que forman los MP e incluso la utilización de ID-NAT para maximizar el rendimiento de detección, esta investigación logró demostrar en forma estadística la disminución del riesgo residual de hepatitis B y la incidencia con la introducción de estrategias de detección y vacunación obligatoria por lo que recomiendan el estudio estadístico de riesgo residual.

Esposito, A, Sabia, C, Iannone, C, et al., (2017) consideraron que debe mantenerse la utilización de pruebas serológicas y moleculares en conjunto como prevención de transmisión del HBV relacionada con la transfusión. También recomiendan que debe resolverse la detección del virus B (HBV) durante el período de ventana y cuando existe

concentraciones bajas del ADN-HBV en pacientes asintomáticos, así como la presencia de donantes de sangre portadores de OBI en países en vías de desarrollo donde es considerado un problema grave de salud, y recomiendan que en regiones endémicas debe implementarse ID-NAT en lugar de MP-NAT además concluyen que las estrategias implementadas para el virus B son múltiples pero no lo suficientemente efectivas y el marcador anti-HBc debe ser considerado como ensayo complementario especialmente en países donde la implementación del ID-NAT no es posible.

Arora, S, Doda, V, Kirtania, T, et al., (2015) enfatizan que, a pesar de la detección obligatoria del marcador serológico de HBsAg, aún existe transmisión pos transfusional del virus de hepatitis B debido a la variabilidad que existe en la respuesta inmune en las personas infectadas por lo que afirman que es necesario la combinación serológica y molecular NAT ya sea esta en mini pools o individual (MP-ID), y que el uso de muestras diluidas en mini pools compromete la seguridad transfusional por la baja carga viral que existe en hepatitis B y escapan a la detección.

Dodd, R.Y, Nguyen,M.L, Krysztof, D.E., et al., (2018) sugieren que podría analizarse la exclusión de la prueba de HBsAg a donantes de sangre, pero debe considerarse la introducción de una prueba NAT sensible y la utilización del marcador serológicos de anti-HBc, pero en caso de pruebas inicialmente reactivas o seguimiento de los donantes reactivos se deben realizar la prueba de HBsAg como parte de algoritmos confirmatorios o de detección de la etapa de la enfermedad.

Ye, Xianlin et al., ponen de manifiesto el comportamiento de la replicación viral en donantes de sangre, los autores demuestran que existen una variedad en los resultados tanto en las pruebas serológicas como moleculares en la detección de la infección por hepatitis B y que estos dependen de su límite de detección y la existencia de mutantes del virus. Los autores establecen que los resultados obtenidos sugieren que incluso la prueba molecular sensible ID-NAT no detecta a todos los donantes portadores del virus B durante el período de ventana donde la carga viral aún es baja, de igual manera el marcador de anti-HBc no es completamente efectivo ya que determinaron una muestra anti-HBc no reactiva/ NAT positiva, pero las donaciones que fueron confirmadas como positivas para la infección tenían resultados de HBsAg reactivo/NAT negativo; HBsAg reactivo /anti-HBc reactivo /ID-NAT positivo de esta manera se afirma la necesidad de la combinación de pruebas moleculares y reactivos serológicos sensibles.

Rocha D, Andrade E, Godoy DT, et al. muestran la factibilidad de la introducción de la prueba de NAT automatizada para la selección de donantes de sangre, demostrando que

se requiere la medición de la sensibilidad, especificidad y verificación de requisitos establecidos por las autoridades para su implementación en los bancos de sangre especialmente en criterios de límite de detección para un adecuado tamizaje de donantes de sangre. Los autores concluyen estableciendo que un número significativo de donaciones de riesgo fueron detectados en NAT y de esta manera puedo evitar la transmisión postransfusional sumada al uso de marcadores serológicos de HBsAg y anti-HBc.

Corrêa ASM, Lamarão LM, Vieira PCM, et al., afirman que la seguridad transfusional en Brasil tuvo un aumento considerable con la introducción de la prueba MP-NAT, pero sin exclusión de ningún marcador serológico, considerando que el excluir anti-HBc constituye un riesgo en la detección de hepatitis oculta. Además, mencionan que las estrategias de selección del donante y reclutamiento constituyen una de las herramientas más importantes para la seguridad y optimización de la transfusión sanguínea.

Souza, J. C., Crispim, M., Abrahim, C., Fraiji, et al., identificaron que una tasa alta de infecciones de transmisión por transfusiones sanguíneas presentó los donantes que utilizaron los registros de autoexclusión (CUE), adicional a ello la asociación de los marcadores anti-HBc, HBsAg y NAT ofrecen una seguridad sanguínea, sin embargo, continúa siendo un desafío determinar las estrategias que optimicen el uso de sangre y su eficacia.

Tabla N°3.1: Marcadores serológicos y moleculares para la detección del virus hepatitis B en donantes de sangre

| Estudio | Institución/País | Muestras | Mediciones | Marcadores Serológicos | | Análisis Molecular | | Recomendaciones de los autores |
|--|--|------------------------------|---|---|--|---|---|--|
| | | | | HBsAg | anti-HBc | MP-NAT | ID-NAT | |
| Michael P Busch, 2004 | Epidemiología en los donantes (REDS) Food and Drug Administration (FDA) Donantes de Estados Unidos | 100 muestras 28 controles | Disminución del período de ventana Prevención de infecciones transmitidas por transfusión Aumento/disminución del número de donaciones no mejora la sensibilidad Detección de hepatitis B oculta | 2-9 días 31 – 63% de casos NA HBsAg (no reactivo) | NM NM NA Anti-HBc (reactivo) | 9-11 días 55 -71% de casos 16-14 muestras por pool de 512-1200 muestras No detecta baja carga viral | 25-36 días 82 – 99% casos tempranos de infección NA <50 copias/mL | La unión de los marcadores evita la transmisión del virus. Los test más sensibles logran evitar la transmisión de 20-35 donaciones infecciosas por año |
| Bouchardeau F, Girault A, Razer A, Servant-Delmas A, Mercier M, Laperche S, 2006 | Instituto Nacional de Transfusión Sanguínea Paris - Francia Donantes de Francia | 253 muestras | 50 muestras (10 no reactivas en un marcador serológico) 203 muestras solo reactivas para un marcador serológico Medición de la Carga Viral | 50 muestras HBsAg reactivo 203 muestras reactivas en HBsAg | 40 muestras (R) (NR) | 5 (Positivas) Retesteo:16(Pos) 19(Neg) 163 (Postivas) (CV 17000 copias/ mL) No detecta: <186 copias/ mL | 35 (Positivas) 198 (Positivas) (CV 1470 copias/CV 200 copias/ mL); | Se requiere metodologías moleculares sensibles que detecten <1000 copias/mL Marcadores en conjunto. |
| Jean-Pierre Allain, Daniel Candotti, 2009. | Cambridge Blood Centre Donantes de USA | Donantes adultos mayores | Detección de hepatitis B oculta | HBsAg no reactivo | anti-HBc reactivo | No detectan cargas virales bajas | NA | Se requieren pruebas moleculares que detecten cargas <1000 copias(mL). Deben utilizarse marcadores en conjunto. |
| Stramer, S. L., Zou, S., Notari, E. P., Foster, G. A., Kryzstof, D. E., Musavi, F., & Dodd, R. Y. (2012) | American Red Cross (ARC). National Genetics Institute Donantes de USA | 6,5 millones de donaciones | Detección de infección para HBV 699 casos confirmados HBV Detección de infección oculta OBI Carga Viral | HBsAg reactiva /no reactivo 555(Reactivos) 144(No reactivos) 100 (Reactivo) | Anti-HBc reactivo 142(Reactivos) 557(No reactivo) 100 (Reactivo) | No detectó 477 (Positivo) 2(Positivos) 21 OBI CV 700 UI/mL | Detectó (CV 800-1000 copias/mL) 222(Positivos) 2(Positivos) 100 OBI CV 100-800 copias/mL) CV <100 UI/mL | El agrupamiento de las muestras en minipool (MP- NAT) disminuye la sensibilidad de la prueba. |

| Estudio | Institución/País | Muestras | Mediciones | Marcadores Serológicos | | Análisis Molecular | | Recomendaciones de los autores |
|---|--|-------------------------------------|--|---|--|--|---|---|
| | | | | HBsAg | anti-HBc | HBsAg | anti-HBc | |
| Stramer, S. L., Notari, E. P., Krysztof, D. E., & Dodd, R. Y. (2013). | American Red Cross (ARC). National Genetics Institute Donantes de USA | Donantes de sangre. 12,8 millones | Detección de infección para HBV 1368 casos confirmados HBV Detección de infección oculta OBI Carga viral | HBsAg no reactiva 427(Reactivo) 5(No Reactivo) 238 (No Reactivo) | Anti-HBc reactivo 427(Reactivo) 5(No Reactivo) 238 (Reactivo) | MP-NAT tríplex detecto la presencia del virus B 936(Positivo) 5 (Positivo) 35 (Positivo) (CV100-800 copias/mL) | 427(Positivo) 187(Positivo) (CV100-1900 copias/mL) | Incluye además del uso de los tres marcadores estrategias de vacunación Reducción de la incidencia y riesgo residual para HBV |
| Esposito, A., Sabia, C., Iannone, C., Nicoletti, G. F., Sommese, L., & Napoli, C. (2017) | Napoles, Italia Regional Reference Laboratory of Transplant Immunology | 4300 donantes de sangre | Detección de hepatitis oculta en donantes de sangre 4300 donaciones en estudio | HBsAg no reactiva /reactiva 13(Reactivo) 4287(No Reactivo) | Anti-HBc reactivo / no reactivo 453(Reactivo) 3847(No Reactivo) | Implementar en zonas no endémicas 11(Positivo) | Implementar en zonas endémicas | Anti-HBc como medida preventiva de donantes OBI |
| Arora, S., Doda, V., & Kirtania, T. (2015) | Banco de sangre del Hospital de Gobierno Central en la India | 28465 donantes | Combinación de las pruebas determina detectar infección por VHB 25 muestras en estudio Cargas virales | HBsAg no reactivo/reactivo 18(Reactivo) | Anti-HBc reactivo/no reactivo 5 (Reactivo) | Detecta en cargas virales altas 9(+) diluciones <1:4 9(+) diluciones >1:4 | Puede detectar cargas virales bajas CV < 50 IU/mL CV16-10 ⁸ IU/mL 6(Positiva) CV <10 - 38 IU/mL | Uso de mini-pools compromete la seguridad transfusional 1 IU/mL= 3.41 copias/mL |
| Dodd, R. Y., Nguyen, M. L., Krysztof, D. E., Notari, E. P., & Stramer, S. L. (2018) | American Red Cross (ARC). National Genetics Institute Donantes de USA | 22,4 millones de donantes de sangre | Screening de donantes de sangre para HBV 2035 casos activos de infección Detección de infección oculta OBI/WP Carga viral | 2.987 (Reactivo) 1632 (Reactivo) 1602 (Reactivo) 35(Reactivo) (CV 4500 - 5 billones copias/mL) No reactivas en HBsAg | 49.567 anti-HBc reactive 1632 (Positivo) 1965 (Positivo) 404 OBI Anti-HBc reactivo | 1.472 (+) MP-NAT 1453(Positivo) No detecta No detecta | 582(Positivo) 361 (Positivo) (CV 50 - 400 copias/mL) Positivo | No se observa un aumento en el rendimiento de la tecnología NAT para la evaluación del OBI |
| Ye, X., Li, T., Zhang, R., Liu, H., Zeng, J., Hong, W., Lu, L., Zhu, W., Li, S., Xu, M., Wu, (2020) | Shenzhen Blood Center, Shenzhen, Guangdong Donantes Chinos | 101 025 Donantes de sangre | Screening de donantes de sangre para HBV Carga viral | 455 (Reactivo) 157 (Reactivo) | (No reactivo) (No reactivo) | (Positivo) (Negativo) | 71 (Positivo) 2 CV <10IU/mL 30 CV 10 100 IU/mL 22 CV 101 1000 IU/mL 2 CV >1000 IU/mL | La prueba molecular sensible ID-NAT no detecta a todos los donantes portadores del virus B durante el período de ventana donde la carga viral aún es baja |
| Rocha, D., Andrade, E., Godoy, D. T., Ferreira, A., Brindeiro, R., Tanuri, A., & (2018). | BioManguinhos, Fundación Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) Donantes brasileños | 5795424 donantes de sangre. | Screening de donantes de sangre para HBV Sensibilidad de la Plataforma BioManguinhos brasileña | HBsAg no reactivo/reactivo | Anti-HBc Reactivo/no reactive | Detecta en cargas virales altas | Puede detectar cargas virales bajas 4.86 IU/mL | La introducción del NAT permite una detección más temprana de la infección que las pruebas serológicas |

| Estudio | Institución/País | Muestras | Mediciones | Marcadores Serológicos | | Análisis Molecular | | Recomendaciones de los autores |
|--|--|----------------------------|--|----------------------------|-------------------------------|---------------------------------|---|--|
| | | | | HBsAg | anti-HBc | HBsAg | anti-HBc | |
| Corrêa, A., Lamarão, L. M., Vieira, P., de Castro, R., de Almeida, N., de Castro, J., de Lima, M., Palmeira, M. K., Meireles, A., & Burbano, R. R. (2018). | Centro de Hemoterapia y hematología de Pará (HEMOPA) Donantes del norte de Brasil | 294881 donantes de Sangre | Screening de donantes de sangre para HBV Carga Viral | HBsAg no reactivo/reactivo | Anti-HBc reactivo/no reactivo | Detecta en cargas virales altas | Puede detectar cargas virales bajas CV 50 IU/mL | El riesgo residual calculado por los autores demostró que la introducción del NAT permite una detección más temprana de la infección que las pruebas serológicas |
| Souza JC, Crispim MAE, Abrahim C, Fraiji NA, Kiesslich D, Stefani MMA (2019) | Fundacion de Hematología y Hemocentro de Manaus Donantes Brasileños | 287,588 Donantes de Sangre | Screening de donantes de sangre para HBV 2154 usuarios de CUE | HBsAg no reactivo/reactivo | Anti-HBc reactivo/no reactivo | Detecta en cargas virales altas | Puede detectar cargas virales bajas | Los usuarios de unidades de exclusión confidencial se asocian fuertemente con HBsAg y Anti- HBc |

Palabras Clave: HBV: Virus de Hepatitis B; OBI: Infección oculta por el virus de Hepatitis B; (+): positivo/reactivo; (-): negativo/no reactivo; (R): Rendimiento; HBsAg: Antígeno de superficie del virus de Hepatitis B; anti- HBc: anticuerpos frente al núcleo de Hepatitis B; NA: no amerita; NM: no menciona; CV: carga viral; MP-NAT: multiplex NAT/Mini pool NAT; ID- NAT: Amplificación de ácidos nucleicos individual; CUE: Unidad de exclusión confidencial

¿Qué marcadores serológicos deben ser incluidos o excluidos en el algoritmo de detección de la infección por el virus de hepatitis B en donantes de sangre?

Los marcadores serológicos anti- HBc y HBsAg no deben ser excluidos del algoritmo de detección para el virus de Hepatitis B, aunque la técnica de amplificación de ácidos nucleicos NAT implementado en pool MP-NAT (muestras de 8-16) permita una detección más temprana de agentes infecciosos como VIH y VHC no es suficiente para el virus de B, debido que la gran mayoría de casos de hepatitis B con cargas virales bajas no fueron detectadas por MP-NAT y se demuestra que el excluir uno de estos marcadores aumentaría el riesgo de transmisión del virus B. También existe la presencia de donantes de sangre con infecciones ocultas por el virus de hepatitis B, la replicación lenta de HBV y los mutantes de HBV (MHR) interfieren con el límite de detección de la pruebas serológicas y moleculares lo que dificulta su identificación por un solo marcador o prueba, por otra parte, se demuestra que la combinación de ensayos serológicos y moleculares ayudan a evitar transmisiones postransfusionales aumentando la seguridad en los hemocomponentes.

Tabla 3.2 Comparación de técnicas de amplificación de ácidos nucleicos para hepatitis B

| Estudio | Carga viral | Pruebas Moleculares | | Marcadores incluidos en donantes de sangre para determinar una seguridad transfusional |
|--|--|-----------------------------|--------|--|
| | | MP-NAT | ID-NAT | |
| Michael P Busch, 2004 | <50 copias/mL | 16 -24 muestras/pool (-) | (+) | Anti- HBc, HBsAg, Anti -HBs, MP- NAT, ID-NAT |
| Bouchardeau F, Girault A, Razer A, Servant-Delmas A, Mercier M, Laperche S, 2006 | 183 – 187 copias/ mL | 8 muestras/pool (+) | (+) | Anti- HBc, HBeAg, Anti -HBe, MP- NAT, ID-NAT |
| | <100 copias/mL | (-) | (+) | |
| Jean-Pierre Allain, Daniel Candotti, 2009 | WP > 100 - 2000 UI/mL | (-) | (+) | Anti- HBc, HBsAg, Anti -HBs, MP- NAT, ID-NAT |
| | OBI < 100 UI/mL | (-) | (+) | |
| | MHR >1000 UI/mL | (+/-) | (+) | |
| Stramer, S. L., Zou, S., Notari, E. P., Foster, G. A., Krysztof, D. E., Musavi, F., & Dodd, R. Y. (2012) | Portadores crónicos 100- 1900 copias/mL | 16 muestras/pool (-) | (+) | Anti- HBc, HBsAg, MP- NAT, ID-NAT |
| | OBI 100 -800 copias/mL | (-) | (+) | |
| | 20 copias/mL | (-) | (+) | |
| Stramer, S. L., Notari, E. P., Krysztof, D. E., & Dodd, R. Y. (2013). | WP 100- 1900 copias/mL | 16 muestras/pool (+) | (+) | Anti- HBc, HBsAg, anti-HBs, MP- NAT, ID-NAT |
| | OBI 100 -800 copias/mL | (+/-) | (+) | |
| | 8 – 25 copias/mL | (-) | (+) | |
| Esposito, A., Sabia, C., Iannone, C., Nicoletti, G. F., Sommese, L., & Napoli, C. (2017) | OBI 20 – 40 copias/mL | 6 – 50 muestras/pool (-) | (+) | Anti- HBc, HBsAg, anti-HBs, MP- NAT, ID-NAT |
| | | | | |
| Arora, S., Doda, V., & Kirtania, T. (2015) | WP 100 – 10000 copias/mL | 16 muestras/pool (+/-) | (+) | Anti- HBc, HBsAg, anti-HBs, MP- NAT, ID-NAT |
| | OBI 100 – 1900 copias/mL | (-) | (+) | |
| | <40 - 152 copias/mL | (-) | (+) | |
| Dodd, R. Y., Nguyen, M. L., Krysztof, D. E., Notari, E. P., & Stramer, S. L. (2018) | WP 4500 – 5 billones copias/mL | 16 muestras/pool (+) | (+) | Anti- HBc, HBsAg, anti-HBs, MP- NAT, ID-NAT |
| | 50 – 400 copias/mL | (-) | (+) | |
| | OBI 5 – 10 copias/mL | (-) | (+) | |

| Estudio | Carga Viral | Pruebas Moleculares | | Marcadores incluidos en donantes de sangre para determinar una seguridad transfusional |
|--|------------------------|------------------------|--------|--|
| | | MP-NAT | ID-NAT | |
| Ye, X., Li, T., Zhang, R., Liu, H., Zeng, J., Hong, W., Lu, L., Zhu, W., Li, S., Xu, M., Wu, S., & Chen, L. (2020) | >1000 UI/mL | (+) | (+) | Anti- HBc, HBsAg, anti-HBs, HBeAg, anti- HBe, MP- NAT, ID-NAT |
| | 101- 1000 UI/mL | (-) | (+) | |
| | 10 and 100 UI/mL | (-) | (+) | |
| | <10 UI/mL | (-) | (+/-) | |
| Rocha, D., Andrade, E., Godoy, D. T., Fontana-Maurell, M., Costa, E., Ribeiro, M., Ferreira, A., Brindeiro, R., Tanuri, A., & Alvarez, P. (2018). | >100 -5000 UI/mL (FDA) | 6 muestras/pool (+) | (+) | MP-NAT Biomanguinhos, ID-NAT, Anti –HBc, HBsAg |
| Corrêa, A., Lamarão, L. M., Vieira, P., de Castro, R., de Almeida, N., de Castro, J., de Lima, M., Palmeira, M. K., Meireles, A., & Burbano, R. R. (2018). | >50 UI/mL | 6 muestras/pool (+) | (+) | MP-NAT Biomanguinhos, ID-NAT, Anti –HBc, HBsAg, Anti-HBs |
| Souza JC, Crispim MAE, Abraham C, Fraiji NA, Kiesslich D, Stefani MMA (2019) | >50 UI/mL | 6 muestras/pool (+) | (+) | MP-NAT Biomanguinhos, ID-NAT, Anti –HBc, HBsAg, Anti-HBs |
| Palabras: WP=Período de ventana; OBI=hepatitis B oculta; MP-NAT mini pool de técnicas de amplificación de ácido nucleico; MHR= mutantes de virus de hepatitis B, FDA | | | | |

¿Qué prueba molecular debe ser utilizada en el screening de donantes de sangre?

El número de muestras agrupadas en el “pool” comprometen la detección oportuna del virus de hepatitis B, es decir, mientras más muestras son incluidas en el MP-NAT la sensibilidad se reduce y la seguridad transfusional también es afectada, determinándose que la prueba molecular óptima a implementarse es la prueba individual ID-NAT, sin embargo, debe realizarse una evaluación previa de prevalencia, costo beneficio y riesgo residual para HBV. La gran mayoría de casos de HBV son detectados en pruebas individuales de NAT puesto que el límite de detección permite detectar cargas virales. Los autores recomiendan que la implementación de MP-NAT es factible en áreas no endémicas mientras que ID-NAT en áreas endémicas para HBV

Tablas 3.3 Algoritmos de detección para el virus de hepatitis B

| Bancos de Sangre del Ecuador | Ministerio de Salud Pública del Ecuador (MSP) | OMS y OPS | Revisión bibliográfica |
|--|---|---|---|
| <p>Las pruebas que se realizan en los bancos del Ecuador son HBsAg y MP-NAT, últimamente se está realizando la prueba de ID-NAT en uno de los servicios de sangre.</p> <p>*Anti-HBc (solo algunas entidades)</p> | <p>Indica la obligatoriedad de prueba serológica de HBsAg y la técnica de amplificación de ácidos nucleicos NAT a todas las donaciones de sangre.</p> | <p>La organización mundial de la salud determina que se debe realizar a cada donación HBsAg, anti-HBc y NAT</p> | <p>Los autores recomiendan realizar el análisis de HBsAg, anti-HBc total y la técnica de amplificación de ácidos nucleicos individual ID-NAT para brindar una seguridad transfusional además de implementar estrategias como vacunación masiva y otros marcadores serológicos. Considerar la existencia de OBI en personas con antecedentes y mayores de 50 años.</p> <p>NOTA: Se recomienda realizar el análisis de anti- HBs puesto que títulos >100 UI/mL confieren seguridad a los hemocomponentes</p> <p>*Realizar el análisis de HBeAg y anti - HBe permite conocer si el hemocomponentes es altamente infeccioso.</p> |

¿Qué marcadores serológicos y moleculares deben ser incluidos en el algoritmo de detección del HBV que garantice un nivel óptimo de seguridad transfusional?

Las conclusiones y recomendaciones es incluir los marcadores serológicos de HBsAg, anti-HBc y molecular ID-NAT para garantizar una seguridad transfusional e incluir otras estrategias como vacunas, entrevista adecuada a los donantes de sangre y mediciones adicionales con otros marcadores serológicos.

CAPÍTULO IV

4.1 Discusión

El análisis realizado a los artículos científicos seleccionados de acuerdo a los criterios establecidos en este estudio permiten comprender que la implementación de uno u otros marcadores serológicos y moleculares no aseguran por sí solos la detección del virus de la hepatitis B en donantes de sangre; es importante recordar que para la selección de donantes de sangre se aplica una encuesta aprobada por la autoridad sanitaria (Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2016), cuyo objetivo es determinar la existencia de factores de riesgo y prevenir transmisión de enfermedades infecciosas, además se realiza un examen clínico y respuestas colocadas en la encuesta para establecer que el donante se encuentra en perfecto estado de salud, constituyendo así la primera barrera para la obtención de una seguridad transfusional, actividad que debería ser ejecutada por personal competente y calificado.

El propósito de la selección adecuada de marcadores serológicos y moleculares es ofrecer un acceso universal a sangre segura este fue planteado en la 66^a. Sesión del Comité Regional de la Organización Mundial de la Salud realizado en el año 2014, este plan de acción tuvo un plazo de 5 años para mejorar la cobertura de sangre segura uno de los acuerdos incluye el tamizaje para VIH, HBV, HCV, sífilis y T.cruzi. (Organización Mundial de la Salud, 2014-2019), con estos antecedentes se analizan los criterios de cada autor desde el año 2004 en que se inicia la introducción de metodologías más sensibles para detección de HBsAg y moleculares en varias presentaciones así *Bush, 2004* en su estudio expone claramente que el uso de un solo marcador no asegura la detección del virus de hepatitis B y que la utilización de MP-NAT no detecta cargas virales bajas, pero ID-NAT tampoco detecta todos los casos de infección, por lo que un marcador de detección del HBV no excluye a otro (Busch M. , 2004). *Bourchadeu. et all*, confirma en su estudio que donantes portadores de cargas virales bajas no son detectados en pruebas MP-NAT debido al límite de detección que estas presentan. *Alian & Candotti*, también corrobora lo de los autores anteriores, pero propone mejorar la metodología con el aumento de concentración de partículas virales o la utilización de prueba molecular de real time afirmando la baja sensibilidad del MP-NAT. *Stramer et al.*, en su investigación menciona que MP-NAT no detecta una hepatitis B oculta (OBI) similar al estudio de *Alian & Candotti*,

complicándose la detección del virus de la hepatitis B, por otro lado, los autores mencionan que la vacunación y la inclusión de varios marcadores lograron reducir el riesgo residual de hepatitis B en donantes de sangre.

En el año 2017, se enfatiza la detección de la hepatitis oculta por ser un riesgo de transmisión de hepatitis B, *Esposito et al.*, proponen una metodología de detección en la que juega un papel importante la presencia o ausencia del marcador serológico anti-HBc, molecular NAT y HBsAg para promover la identificación de la presencia del virus B o su respuesta inmune y que el MP-NAT no detecta a donantes OBI de igual manera. *Dod et al.*, menciona exactamente lo mismo confirmándose que debe utilizarse varios marcadores y que donantes OBI solo son detectados con técnicas moleculares sensibles y anti-HBc y aun así no es suficiente para asegurar la transfusión sanguínea. *Ye et al.*, también afirma que no puede realizarse una correcta identificación de donantes de sangre portadores de la infección por hepatitis B utilizando únicamente un solo marcador serológico o molecular debe ser una combinación que permita la identificación oportuna y evitar transmisiones.

Por otro lado, *Corrêa ASM, Lamarão LM, Vieira PCM, et al.* proponen además de la evaluación de la introducción del NAT nuevos estudios que demuestren que esta estrategia ayuda a la reducción del riesgo residual y por ende mejorar la seguridad transfusional.

Rocha D, Andrade E, Godoy DT, et al. ponen de manifiesto la importancia de un control de calidad y verificación de la metodología a ser utilizada para la detección del HBV de esta manera se asegura que la prueba detecte al virus y evite su transmisión sumándose a la sugerencia dada por *Corrêa ASM, et al.* Adicionalmente *Souza, J. C., Crispim, M, et al.*, similar a los dos autores anteriores proponen el uso de la autoexclusión del donante con factores de riesgo y sumado a la introducción de NAT y marcadores serológicos se puede evitar la transmisión del virus HB y lograr de esa manera evitar la transmisión de infecciones transmitidas por transfusiones.

Por lo tanto, para obtener una seguridad transfusional no debe excluirse ningún marcador serológico por un molecular sin un previo estudio del riesgo residual de la infección, así también el uso de marcadores serológicos y moleculares en conjunto disminuirá en lo posible una infección residual de hepatitis B, sin embargo, la implementación y uso del marcador de anti-HBc para HBV aún es de libre elección en algunos países incluido Ecuador, por otro lado debe realizarse un estudio de costo-beneficio para la implementación de nuevos algoritmos de detección de hepatitis B.

Otras estrategias que proponen los autores es la mejora en la selección del donante, uso de autoexclusión y por último la verificación del método antes de su implementación aspectos que deberían considerarse en el país.

4.2 Conclusiones del estudio

La seguridad transfusional dependerá de las políticas de cada país basado en análisis de investigaciones realizados en cada población que permitan determinar la inclusión o exclusión de uno de los marcadores y examinar el efecto en la disminución de la transmisión de hepatitis B.

La revisión bibliográfica permite determinar que la técnica individual de amplificación de ácidos nucleicos (ID NAT) es la que debería implementarse en los bancos de sangre para la detección del virus de hepatitis B por la sensibilidad de detección de cargas virales bajas especialmente en donantes de sangre con hepatitis oculta (OBI).

La conclusión del autor de este trabajo es que debe mantenerse el marcador serológico de HBsAg, incluir en los bancos de sangre la detección de anti-HBc e implementar la técnica ID-NAT.

Para establecer la implementación o exclusión de marcadores serológicos y molecular para la detección del virus de hepatitis B se debe realizar análisis epidemiológicos que establezcan la verdadera prevalencia de la enfermedad esto permitirá definir qué pruebas son las más idóneas en la población y de esa manera obtener una seguridad transfusional.

4.2 RECOMENDACIONES

Se recomienda la implementación de la técnica de amplificación de ácido nucleicos individual ID-NAT para detección del virus de hepatitis B y el mantenimiento de la detección de marcadores serológicos HBsAg y anti-HBc la combinación de estas técnicas ofrece una seguridad transfusional.

Se recomienda la verificación de las metodologías a implementarse en el banco de sangre para la detección de infecciones transmitidas por transfusiones especialmente del virus de hepatitis B con material de referencia certificado y acreditado.

Se sugiere al Programa Nacional de Sangre del Ministerio de Salud Pública promover y apoyar investigaciones relacionadas al tema que permitan conocer la verdadera situación epidemiológica de la población en relación con Hepatitis B, así como estudios de riesgo residual de este virus, costo-beneficio de implementación de técnicas de amplificación de ácido nucleicos y de esa manera establecer políticas específicas para los bancos de sangre y hemocentro del Ecuador basadas en la realidad nacional.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal, N., Chatterjee, K., Coshic, P., & Borgohain, M. (2014). Nucleic acid testing for blood banks: An experience from a tertiary care centre in New Delhi, India. *Asian J Transfus Sci*, 8(1):26-8. doi: 10.4103/0973-6247.126684. doi: 10.1016/j.transci.2013.03.004
- Akira Yosikawa, Gotanda, Y., & Minegishi, K. (2007). *Lengths of Hepatitis B Viremia and Antigenemia in Blood Donors: Preliminary Evidence of Occult (Hepatitis B Surface Antigen-Negative) Infection in the Acute Stage*. Recuperado el 10 de Junio de 2020, de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17581150/>
- Allain, J., & Candotti, D. (2009). Diagnostic algorithm for HBV safe transfusion. *Blood transfusion, Trasfusione del sangue*. 7(3), 174–182 <https://doi.org/10.2450/2008.0062-08>.
- Arora, S., Doda, V., & Kirtania, T. (2015). *Sensitivity of individual donor nucleic acid testing (NAT) for the detection of hepatitis B infection by studying diluted NAT yield samples*. doi: 10.2450/2014.0048-14
- Block, T., Alter, H., London, W., & Bray, M. (2016). A historical perspective on the discovery and elucidation of the hepatitis B virus. *Antiviral Res.*, 31:109-23, doi: 10.1016/j.antiviral.2016.04.012.
- Bouchardeau, F., Girault, A., Razer, A., Servant-Delmas, A., Mercier, M., & Laperche, S. (2006). Sensitivity of hepatitis B virus DNA transcription-mediated amplification testing in hepatitis B surface antigen-positive blood donations. *Transfusion*, 46(12): 2047–2052. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2006.01031.x>.
- Busch, M. (2004). Should HBV DNA NAT replace HBsAg and/or anti-HBc screening of blood donors?. *Transfusion clinique et biologique. Journal de la Societe francaise de transfusion sanguine*, 11(1), 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.tracli.2003.12.003>.
- Candotti, D., & Laperche, S. (2018). Hepatitis B Virus Blood Screening: Need for Reappraisal of Blood Safety Measures?. *Frontiers in medicina*, Vol 5:29.

- Candotti, D., Grabarczyk, P., & Ghiazza, P. (2008). Characterization of Occult Hepatitis B Virus From Blood Donors Carrying Genotype A2 or Genotype D Strains. *J Hepatol*, 49(4):537-47. doi: 10.1016/j.jhep.2008.04.017. Recuperado el 11 de Junio de 2020
- Corrêa, A., Lamarão, L., Vieira, P., de Castro, R., de Almeida, N., de Castro, J., . . . Burbano, R. R. (2018). Prevalence, incidence and residual risk of transfusion-transmitted HBV infection before and after the implementation of HBV-NAT in northern Brazil. *Transfusion PloS one*, 3(12), e0208414. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208414>.
- Dodd, R., Nguyen, M., Krysztof, D., Notari, E., & Stramer, S. (2018). *Blood donor testing for hepatitis B virus in the United States: is there a case for continuation of hepatitis B surface antigen detection?* doi: 10.1111/trf.14784
- Esposito, A., Sabia, C., Iannone, C., Nicoletti, G., Sommese, L., & Napoli, C. (2017). *Occult Hepatitis Infection in Transfusion Medicine: Screening Policy and Assessment of Current Use of Anti-HBc Testing*. doi: 10.1159/000460301
- Gerlich, W. (2013). Medical Virology of Hepatitis B: how it began and where we are now. *Virology Journal*, 10, 239. doi:10.1186/1743-422X-10-239
- Huang, C.-H., Yuan, Q., Chen, P.-J., Zhang, Y.-L., & Chen, C.-R. (2012). *Influence of Mutations in Hepatitis B Virus Surface Protein on Viral Antigenicity and Phenotype in Occult HBV Strains From Blood Donors*. doi:10.1016/j.jhep.2012.05.009
- Juhl, D., Knobloch, J.-M., Görg, S., & Hennig, H. (2016). *Comparison of Two Test Strategies for Clarification of Reactive Results for Anti-HBc in Blood Donors*. doi:10.1159/000441676
- Kleinman, S. H. (01 de Mayo de 2006). Assessing the Impact of HBV NAT on Window Period Reduction and Residual Risk. *J Clin Virol*, 36 Suppl 1:S23-9. doi: 10.1016/s1386-6532(06)80005-3. Recuperado el 11 de Junio de 2020, de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16831689/>
- Kleinman, S., Strong, D. M., Tegtmeier, G. G., Holland, P. V., Gorlin, J. B., Cousins, C., . . . Pietrelli, L. A. (2005). Hepatitis B virus (HBV) DNA screening of blood donations in minipools with the COBAS AmpliScreen HBV test. *Transfusion*, 45(8) 1247-1257.
- Kuhns, M., & Busch, M. (2006). New strategies for blood donor screening for hepatitis B virus: nucleic acid testing versus immunoassay methods. *Mol Diagn Ther.*, 10(2):77-91. doi:10.1007/BF03256447.

- Manzini, P., Abate, M., Valpreda, C., Milanese, P., Curti, F., Rizzetto, M., & Smedile, A. (2009). Evidence of Acute Primary Occult Hepatitis B Virus Infection in an Italian Repeat Blood Donor. *Transfusion*, 49(4):757-64. doi: 10.1111/j.1537-2995.2008.0204. doi: 10.1111/j.1537-2995.2008.02041.x
- Márquez-Fernández, A., Ramos-Ligonio, A., & López-Monteón, A. (2015). ¿Qué sabe Ud. acerca de... la validación de pruebas diagnósticas? *Rev Mex Cienc Farm* , 46 (3) .
- Matsumoto C, T. K. (2001). Analysis of HBV infection after blood transfusion in Japan through investigation of a comprehensive donor specimen repository. . *Transfusion* , 41:878-84.
- Ministerio de Salud Pública del Ecuador. (2016). Llenado de los registros únicos de información para servicios de sangre. *Instructivo*, 1-46.
- Moraga C, J., & Cartes-Velásquez, R. (2015). PAUTAS DE CHEQUEO, PARTE II: QUOROM Y PRISMA. . *Revista chilena de cirugía*, 67(3), 325-330.
- Organización Mundial de la Salud. (2014-2019). 66.a SESIÓN DEL COMITÉ REGIONAL DE LA OMS PARA LAS AMÉRICAS. 53a. *Consejo Directivo*, 1-9.
- Organización Mundial de la Salud. (2016). *Estrategia Mundial del Sector de la Salud contra las hepatitis vírica 2016-2021*. Ginebra-Suiza: WHO Document Production Services.
- Organización Mundial de la Salud. (19 de Julio de 2019). *Hepatitis B*. Recuperado el 06 de Julio de 2020, de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>
- Organización Mundial de la Salud. (10 de Junio de 2020). *Disponibilidad y seguridad de la sangre a nivel mundial*. Recuperado el 12 de Julio de 2020, de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/blood-safety-and-availability>
- Organización Panamericana de la Salud. (2011). *Estandares de trabajo para servicios de de sangre (Tercera Edición)*. Recuperado el 07 de 12 de 2020, de <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2012/LatinAmericanVFF.pdf>
- Organización Panamericana de la Salud. (02 de Abril de 2011). *Prevention of Hepatitis B and C infection*. Recuperado el 29 de Septiembre de 2020, de <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2011/Prevention-of-Hepatitis-B-and-C-Infection.pdf>

- Organización Panamericana de la Salud. (07 de Julio de 2016). *Hepatitis B y C bajo la lupa*. Recuperado el 29 de Septiembre de 2020, de <https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/31447/9789275319291-spa.pdf?sequence=5&isAllowed=y>
- Organización Panamericana de la Salud. (2020). *Suministro de sangre para transfusiones en los países de América Latina y el Caribe 2016-2017*. Recuperado el 12 de Julio de 2020, de https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/52150/9789275321720_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Rocha, D., Andrade, E., Godoy, D., Fontana-Maurell, M., Costa, E., Ribeiro, M., . . . Alvarez, P. (30 de Febrero de 2018). The Brazilian experience of nucleic acid testing to detect human immunodeficiency virus, hepatitis C virus, and hepatitis B virus infections in blood donors. *Transfusion*, *58*, 862-870. doi:10.1111/trf.14478
- Slagle, B., & Bouchard, M. (2018). Role of HBx in hepatitis B virus persistence and its therapeutic implications. *Curr Opin Virol*, *30*:32-38. doi:10.1016/j.coviro.2018.01.007.
- Sloand, E. M. (1995). Safety of the blood supply. *JAMA*, *274*(17), 1368–1373.
- Souza, J., Crispim, M., Abraham, C., Fraiji, N., Kiesslich, D., & Stefani, M. (2018). High rate of seromarkers for HIV, HBV and syphilis among blood donors using confidential unit exclusion, before and after HIV-NAT implementation at a major public blood bank in the Brazilian Amazon. *Transfusion*, *59*, 629-638. doi:10.1111/trf.15045
- Spreafico, M., Berzuini, A., Foglieni, B., & Candotti, D. (2015). Poor Efficacy of Nucleic Acid Testing in Identifying Occult HBV Infection and Consequences for Safety of Blood Supply in Italy. *J Hepatol*, *63*(5):1068-76. doi: 10.1016/j.jhep.2015.06.016. doi: 10.1016/j.jhep.2015.06.016
- Stramer, S., Notari, E., Krysztof, D., & Dodd, R. (2013). Hepatitis B virus testing by minipool nucleic acid testing: does it improve blood safety? *Transfusion*, *53*(10 Pt 2):2449-58. doi: 10.1111/trf.12213. doi: 10.1111/trf.12213
- Stramer, S., Zou, S., & Notari, E. (2012). *Blood donation screening for hepatitis B virus markers in the era of nucleic acid testing: are all tests of value?* Recuperado el 12 de Junio de 2020, de <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1537-2995.2011.03283.x>

- Stramer, S., Zou, S., & Notari, E. e. (2012). Blood donation screening for hepatitis B virus markers in the era of nucleic acid testing: are all tests of value?. . *Transfusion.*, 52(2):440-446.
- Taira, R., Satake, M., Momose, S., Hino, S., Suzuki, Y., & Murokawa, H. (2013). *Residual Risk of Transfusion-Transmitted Hepatitis B Virus (HBV) Infection Caused by Blood Components Derived From Donors With Occult HBV Infection in Japan*. doi:10.1111/j.1537-2995.2012.03909.x
- Terrault, N., Lok, A., McMahon, B., Chang, K.-M., Hwang, J., Jonas, M., . . . Wong, J. (2018). *Update on Prevention, Diagnosis, and Treatment of Chronic Hepatitis B: AASLD 2018 Hepatitis B Guidance*. Obtenido de https://www.aasld.org/sites/default/files/2019-06/HBVGuidance_Terrault_et_al-2018-Hepatology.pdf
- Toro Montoya, A., & Restrepo Gutierrez, J. (2011). Hepatitis B. *La Clínica y el Laboratorio*, Vol 17: 311-327.
- Vandenbroucke, J. P. (2009). Mejorar la comunicación de estudios observacionales en epidemiología (STROBE): explicación y elaboración. *Gaceta Sanitaria. Gaceta Sanitaria*, 23(2), 158e1-158e28.
- Ye, X., Li, T., Zhang, R., Liu, H., Zeng, J., Hong, W., . . . Chen, L. (2020). Comprehensive analysis of hepatitis B virus infections in blood donors in southern China that are surface antigen positive but nucleic acid. *Transfusion*, 10.1111/trf.15824.
- Zou, S., Stramer, S., Notari, E., Kuhns, M., Krysztof, D., & Musavi, F. (2009). *Current Incidence and Residual Risk of Hepatitis B Infection Among Blood Donors in the United States*. doi:10.1111/j.1537-2995.2009.02195.x