



Validación de métodos serológicos y moleculares para la certificación viral de la materia prima del HEBERTRANS®

Validation of serological and molecular methods for the viral certification of the raw material of HEBERTRANS®

Kenia Romero Martínez^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-9820-1374>

María T. Pérez Guevara¹ <https://orcid.org/0000-0001-8112-9911>

Madeline Blanco de Armas¹ <https://orcid.org/0000-0002-9243-066X>

Liuber Yans Machado Zaldívar¹ <https://orcid.org/0000-0001-5309-8062>

Alicia Fleites Vázquez¹ <https://orcid.org/0000-0002-5950-0283>

Esperanza Sánchez Dieguez¹ <https://orcid.org/0000-0002-4085-2836>

¹Centro de Investigaciones Científicas de la Defensa Civil. Mayabeque, Cuba.

*Autor para la correspondencia. Correo electrónico: keniaromero7606@gmail.com

RESUMEN

Introducción: La selección y desarrollo de métodos analíticos siempre ha sido un tema importante para los laboratorios de ensayo. Para adoptar un método se hace necesario validarlo, pues el objetivo de la validación es probar su aptitud, así como la competencia del laboratorio para realizar determinado ensayo. El extracto dializado de leucocitos, constituye la materia prima fundamental en la fabricación del HEBERTRANS®. Para su certificación viral se emplea el sistema serológico HIV Ab & Ag (DIA.PRO, Italia) y 2 sistemas moleculares desarrollados en Cuba, basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cualitativa para la detección de los virus de la hepatitis C y de inmunodeficiencia humana tipo 1, los cuales deben ser validados para demostrar que funcionan con este tipo de muestras.

Objetivo: Validar los sistemas que se emplean en la certificación viral del HEBERTRANS®.

<http://scielo.sld.cu>

<http://www.revmedmilitar.sld.cu>



Métodos: Se realizaron estudios de especificidad, concordancia, límite de detección y robustez, para lo cual se emplearon muestras de extracto dializado de leucocitos negativas y positivas; estas últimas se simularon por contaminación con muestras clínicas positivas a hepatitis C y VIH-1, previamente caracterizadas.

Resultados: Los elevados índices de especificidad y robustez, muy buena concordancia con sistemas de referencia, así como límites de detección capaces de detectar bajas concentraciones de analito, mostraron un buen desempeño de los sistemas con muestras de extracto dializado de leucocitos.

Conclusiones: Los resultados demuestran la factibilidad del uso de estos sistemas en la certificación del Extracto Dializado de Leucocitos como materia prima del HEBERTRANS®.

Palabras clave: diagnóstico; métodos; VIH; hepatitis C; reacción en cadena de la polimerasa.

ABSTRACT

Introduction: The selection and development of analytical methods has always been an important issue for testing laboratories. To adopt a method, it is necessary to validate it, since the objective of validation is to test its suitability, as well as the competence of the laboratory to perform a certain test. The Dialyzed Extract of Leukocytes constitutes the fundamental raw material in the manufacture of HEBERTRANS®. For its viral certification, the HIV Ab & Ag serological system (DIA.PRO, Italy), and two molecular systems developed in Cuba are used, based on qualitative polymerase chain reaction (PCR) for virus detection. of hepatitis C and human immunodeficiency type 1, which must be validated to demonstrate that they work with this type of samples.

Objective: To validate the systems used in the viral certification of HEBERTRANS®.

Methods: Studies of specificity, concordance, detection limit and robustness were performed, with the use of simulated positive and negative Leukocyte Dialyzed Extract samples.

Results: The high rates of specificity and robustness, very good concordance with reference systems, as well as detection limits capable of detecting low concentrations of analyte, showed a good performance of the systems with samples of Dialyzed Leukocyte Extract.

Conclusions: The results obtained demonstrated the feasibility of using these systems in the certification of the Leukocyte Dialyzed Extract as raw material for HEBERTRANS®.



Keywords: diagnosis; methods; HIV; hepatitis C; polymerase chain reaction.

Recibido: 17/10/2022

Aprobado: 26/04/2023

INTRODUCCIÓN

La selección y desarrollo de métodos analíticos siempre ha sido un tema importante para los laboratorios de ensayo. Para adoptar un método se hace necesario validarlo, pues el objetivo de la validación es probar la aptitud de los métodos, así como la competencia del laboratorio para realizar determinado ensayo.^(1,2) Esto cobra cada día mayor vigencia en la certificación de la sangre, órganos y tejidos, para garantizar su seguridad durante las transfusiones sanguíneas, transplantes de órganos o producciones que emplean como materia prima, la sangre o sus derivados.⁽³⁾

El extracto dializado de leucocitos (EDL), constituye la materia prima fundamental en la fabricación del HEBERTRANS[®] o factor de transferencia, producido por el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB). Este medicamento se utiliza en el tratamiento de la inmunodeficiencia celular, herpes simple, herpes zóster, dermatitis atópica, queratoconjuntivitis, entre otras enfermedades⁽⁴⁾ y recientemente ha sido empleado con eficiencia en el tratamiento y prevención de la COVID-19, durante la pandemia en Cuba.⁽⁵⁾ Para complementar las estrategias de seguridad, con el objetivo de disminuir el riesgo de transmisión viral asociado al uso de este hemoderivado, se hace necesario el estudio de marcadores virales para el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el virus de la hepatitis C (VHC) en los EDL, lo cual constituye una etapa fundamental en el aseguramiento de la calidad durante su fabricación.^(6,7)

El laboratorio de control de la calidad del Centro de Investigaciones Científicas de la defensa Civil es el designado por el Centro Estatal para el Control de los Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CECMED), para llevar a cabo esta función. Cuenta para ello con ensayos serológicos de ELISA de cuarta generación, para la detección del antígeno p24 (Agp24) y anticuerpos dirigidos contra el VIH-1/2,

<http://scielo.sld.cu>

<http://www.revmedmilitar.sld.cu>



incluyendo el grupo O y ensayos moleculares para la detección de ARN del VIH y VHC respectivamente. En este momento, los sistemas utilizados son el ELISA HIV Ab & Ag (DIA.PRO, Italia), RT-PCR cualitativa para la detección de ARN del VHC y PCR para la detección del ADN del VIH-1. ELISA se encuentra diseñado para suero o plasma y no contempla dentro de su aplicación las muestras de EDL. Los ensayos moleculares son técnicas desarrolladas en el laboratorio, por tanto, deben ser validados para demostrar que funcionan con este tipo de muestras.

El objetivo de este trabajo es validar los sistemas que se emplean en la certificación viral del HEBERTRANS®.

MÉTODOS

Diseño

Se realizó un estudio analítico prospectivo de validación, para el sistema serológico HIV Ab & Ag (DIA.PRO, Italia) y para los ensayos moleculares de RT-PCR desarrollados en el laboratorio del Centro de Investigaciones Científicas de la Defensa Civil, para la detección cualitativa de ARN de los virus VIH y VHC.

El sistema serológico validado tiene la categoría de ser un método modificado, pues se ensayaron muestras que se encuentran fuera del alcance de esta técnica. Los ensayos moleculares son métodos desarrollados por el laboratorio, por lo que requirieron validación exhaustiva de los parámetros aplicables a los ensayos de identidad, que es su clasificación según el propósito para el cual fueron diseñados.⁽⁸⁾

Aspectos generales y regulatorios

Se siguieron las normas establecidas por las agencias reguladoras nacionales e internacionales.^(8,9,10)

Métodos de ensayo a validar

HIV Ab & Ag (DIA.PRO, Italia)

El HIV Ab & Ag (DIA.PRO, Italia) es un ensayo inmunoenzimático de fase sólida para el diagnóstico *in vitro* de todos los subtipos del VIH-1 y VIH-2, así como el antígeno (p24) del VIH-1 en suero y plasma humano. Utiliza como fase sólida microplacas recubiertas con péptidos sintéticos, que representan



epítopes inmunodominantes de VIH-1 e incluyen el grupo O y VIH-2, junto con un anticuerpo monoclonal para el AgP24 del VIH-1.

En los ensayos se siguieron las indicaciones de uso recomendadas por el fabricante.⁽¹¹⁾

La lectura de los resultados se realizó con el lector PR-621, con el Strip Reader Software 9.0, para la lectura de Absorbancia, producidos por el Centro de Inmunoensayo (CIE) de Cuba.

Para los ensayos moleculares, previamente las muestras se concentraron 5 veces mediante centrifugación a 23 600 g durante una hora, a una temperatura de 4 °C, para mejorar el recobrado de las posibles partículas virales que pudieran estar presentes en el producto biológico. Se realizó la extracción de ácidos nucleicos para la detección de ARN de VHC y ADN proviral de VIH-1, según los procedimientos descritos por el fabricante del estuche QIAamp Viral DNA Mini Kit (QIAGEN).⁽¹²⁾

RT-PCR para VHC

La detección del ARN del VHC se realizó mediante una RT-PCR anidada, con el empleo de cebadores específicos para la región 5'NC, según los procedimientos descritos por *González* y otros.^(12,13,14)

PCR para VIH

La detección del ADN proviral de VIH-1 se realizó mediante PCR anidada, con el empleo de cebadores específicos para el gen gag, según los procedimientos descritos por *Heyndrickx* y otros,⁽¹⁵⁾ y *Chang* y otros.⁽¹⁶⁾

Parámetros validados

Especificidad

Método serológico

Para analizar la especificidad diagnóstica, se ensayaron en el sistema HIV Ab & Ag (DIA.PRO, Italia) 39 lotes de EDL, previamente caracterizados por HIV 1+2 Ag-Ab ELISA Test (CTK Biotech, EE. UU.). Para estudiar la especificidad analítica se analizaron los resultados falsos positivos o cercanos en un 10 % por debajo del valor de corte, generados por el efecto matriz que pueden producir 3 lotes de PBS 1X (solución salina tamponada), empleados como diluentes.

Se calculó la especificidad diagnóstica y analítica.⁽⁸⁾



Métodos moleculares

Se ensayaron por RT-PCR anidada para VHC, y PCR anidada para VIH, 10 muestras de EDL previamente caracterizadas como negativas, por los sistemas COBAS AmpliScreen HCV Test, V 2.0 (Roche, Panamá) y COBAS AmpliScreen HIV-1 Test, V 1.5 (Roche, Panamá). Se calculó la especificidad diagnóstica.⁽⁸⁾

Concordancia

Método serológico

Se compararon los resultados para los 39 lotes de EDL, al ensayarlos por los sistemas HIV Ab & Ag (DIA.PRO, Italia) y HIV 1+2 Ag-Ab ELISA Test (CTK Biotech, EE. UU.). Se calculó la concordancia entre ambos sistemas y el índice Kappa (K).⁽¹⁷⁾

Métodos moleculares

Se compararon los resultados de 15 muestras negativas a VHC y VIH-1, al ser ensayadas por los sistemas a validar RT-PCR anidada para VHC, y PCR anidada para VIH; y con los sistemas de referencia COBAS AmpliScreen HCV Test, V 2.0 (Roche, Panamá) y COBAS AmpliScreen HIV-1 Test, V 1.5 (Roche, Panamá). Se calculó la concordancia entre ambos sistemas y el índice Kappa (K).⁽¹⁷⁾

Límite de detección

Método serológico

Para analizar la sensibilidad analítica, se simuló la posibilidad de que una muestra positiva a VIH se incluyera en el proceso productivo, teniendo en cuenta el efecto de dilución que acompaña al EDL. Para modelar este experimento se contaminó una muestra de EDL con un suero de título medio de anticuerpos dirigidos contra el VIH y se realizaron diluciones desde 1/100 a 1/5 000; se ensayaron por duplicado. Se determinó el límite de detección en las condiciones de ensayo.⁽⁸⁾

Métodos moleculares

En RT-PCR anidada para VHC se simuló la contaminación de 3 lotes de EDL, con una donación positiva a VHC; el primero con carga viral alta (1 970 000 UI/mL), el segundo con carga viral media (1 000 UI/mL) y el tercero con carga viral baja (100 UI/mL).



Para el estudio del límite de detección en PCR anidada para VIH, se simuló la contaminación de 3 lotes de EDL con una donación positiva a VIH; el primero con carga viral alta (227 120 UI/mL), el segundo con carga viral media (1 670 UI/mL) y el tercero con carga viral baja (167 UI/mL).

En ambos casos los ensayos se realizaron por duplicado, en una dilución 1/300, según lo que se establece en el proceso productivo para la obtención de este hemoderivado. Se tomó como criterio de aceptación que todas las muestras deben resultar reactivas.⁽⁸⁾

Robustez

Métodos moleculares

Para este estudio se realizaron modificaciones mínimas en los procedimientos de 10 de los ensayos realizados para VHC y VIH-1, entre las que se encuentran:

- Se realizaron los ensayos en 2 equipos diferentes de PCR: PCT-100 (MJ Research) y Master Cycler Nexus (Eppendorf), este último basado en un formato más moderno y mayores prestaciones para desarrollar PCR en tiempo final.
- Se emplearon para la extracción de los ácidos nucleicos 2 estuches diferentes de extracción: Qiamp Viral DNA Mini Kit (Qiagen) y High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche), ambos basados en el mismo principio de separación por columnas de afinidad, pero con diferentes procedimientos de ensayos.
- Durante los ensayos se alternaron en la misma corrida, muestras positivas y negativas para demostrar que no existe contaminación cruzada entre las muestras durante los procedimientos de extracción, amplificación y detección.

Metodología de ensayo

Como algoritmo de trabajo, para los ensayos serológicos se ensayaron las muestras de EDL por duplicado y para los ensayos moleculares de forma simple. Las muestras no concordantes con el resultado esperado, se repitieron por duplicado. Las discrepancias fueron resueltas con el sistema DAVIH BLOT (DAVIHLAB, Cuba) como prueba confirmatoria para el sistema serológico y con los sistemas COBAS AmpliScreen HCV Test, V 2.0 (Roche, Panamá) y COBAS AmpliScreen HIV-1 Test, V 1.5 (Roche,



Panamá) para las técnicas moleculares. Las muestras con resultados indeterminados no se tuvieron en cuenta para el cálculo de la especificidad.

RESULTADOS

Especificidad

Método serológico

Los 39 lotes de EDL resultaron no reactivos por HIV Ab & Ag (DIA.PRO, Italia), para un 100 % de especificidad, lo cual significa que no se detectaron resultados falsos reactivos. No se obtuvo resultados falsos positivos o cercanos en un 10 %, por debajo del valor de corte producido por el efecto matriz de los tres lotes de PBS 1x, para una especificidad analítica de 100 %.

Métodos moleculares

Las 10 muestras de EDL resultaron negativas por RT-PCR anidada para VHC y PCR anidada para VIH, para un 100 % de especificidad diagnóstica.

Concordancia

Método serológico

Al comparar los resultados de los 39 lotes de EDL, en el sistema HIV Ab & Ag (DIA.PRO, Italia), con los obtenidos en el sistema HIV 1+2 Ag-Ab ELISA Test (CTK Biotech, EE. UU.), la concordancia fue de 100 % y el índice Kappa de 1 (muy bueno).

Métodos moleculares

Los resultados mostraron un 100 % de concordancia y un índice Kappa de 1 (muy bueno) en las muestras estudiadas entre los procedimientos comparados. Los 15 lotes de EDL ensayados resultaron negativos.

Límite de detección

Método serológico

El ensayo fue capaz de detectar un efecto de dilución del EDL superior a 1/5 000 en las condiciones del ensayo.



Métodos moleculares

Ambos ensayos fueron capaces de detectar una muestra positiva con diferentes niveles de carga viral en los lotes de EDL, al simular la contaminación del lote durante el proceso productivo. El ensayo para VHC fue capaz de detectar hasta 100 UI/mL del ARN del virus de VHC, y en el caso de VIH, hasta 167 UI/mL o 100 copias/ mL del ADN del virus de VIH-1.

Robustez

Métodos moleculares

En la evaluación de la robustez para cambios en 10 % de los ensayos realizados fueron identificadas el 100 % de las muestras positivas y negativas. No hubo contaminación cruzada entre muestras durante los procedimientos de ensayos.

DISCUSIÓN

La factibilidad de uso del ELISA HIV Ab & Ag (DIA.PRO, Italia) y de los métodos moleculares RT-PCR anidada para VHC y PCR anidada para VIH, para la certificación viral del EDL, materia prima fundamental de la fabricación del HEBERTRANS[®], se demostró con los resultados del desempeño de los sistemas.

En el caso de la especificidad, los resultados cumplen con el criterio de aceptación y están acordes a los requisitos descritos para la validación de ensayos de identidad por las agencias reguladoras cubanas e internacionales.^(8,9,10)

El hecho de que todas las muestras de PBS ensayadas en el estudio de especificidad analítica resultaran negativas demostró que el PBS, cuando se emplea como diluyente, no contribuye a la obtención de falsos positivos. El haber obtenido un 100 % de especificidad para todas las técnicas serológicas y moleculares validadas, resulta alentador para el uso de estos sistemas en la detección de marcadores virales en el EDL. En cuanto a la concordancia, tanto el HIV Ab & Ag (DIA.PRO, Italia), como los ensayos RT-nested PCR para VHC, y nested PCR para VIH, demostraron parámetros de desempeño similares a los sistemas de referencia comerciales con los cuales fueron comparados. Estos resultados no difieren de otros estudios comparativos^(18,19) realizados entre diferentes técnicas para el diagnóstico de VIH y VHC.



El resultado del límite de detección con el sistema HIV Ab & Ag permite demostrar la capacidad de este ensayo para detectar bajas concentraciones de marcadores virales para el VIH, lo cual se encuentra acorde con lo regulado por el CECMED cuando se diseña este tipo de ensayo.⁽⁸⁾ Los valores observados para el límite de detección de los sistemas moleculares resultan comparables con las exigencias internacionales para ensayos de PCR.⁽²⁰⁾ La capacidad de estas técnicas, de detectar bajas concentraciones de marcadores virales para VIH y VHC en los lotes de EDL, conlleva a la retirada del proceso productivo, lo que evita la posterior fabricación y comercialización de un producto final contaminado.

En este trabajo, los cambios realizados en el desarrollo de los ensayos moleculares, no afectaron la caracterización de las muestras, lo cual demostró su robustez. Los estudios de robustez reflejan la insensibilidad de un ensayo a pequeños cambios en la realización de la técnica.⁽²¹⁾ Cobran importancia desde el punto de vista de que, en ocasiones, las condiciones en que se trabajan las muestras no son las óptimas, en cuanto a temperatura, equipamiento, ni se cuenta siempre con el mismo proveedor de ensayos, lo cual se traduce en la posibilidad de obtener resultados que no cumplen con los criterios de aceptación del sistema.

El empleo de métodos validados contribuye al aseguramiento de la calidad, seguridad y eficacia de los hemoderivados.⁽²²⁾

La validación de los métodos de ensayo, empleados para la certificación de los EDL como materia prima, cobra una vital importancia pues, para el caso del estudio de marcadores serológicos, los sistemas diagnósticos disponibles en el mercado no están diseñados para su detección en los productos hemoderivados, por lo que requieren de una modificación en el alcance de estos sistemas, al introducir cambios en las muestras a analizar.

Para la detección de los marcadores moleculares, se hace necesario contar con sistemas elaborados en el laboratorio, como alternativa a los estuches comerciales, pues la adquisición resulta a veces difícil en Cuba, debido a las limitaciones económicas derivadas del bloqueo económico y financiero de los EE. UU., la descatalogación cada vez más rápida de los sistemas y el costo elevado. Además, estos métodos tienden a ser cerrados y de tecnología propia para determinada casa comercial, por lo que realizar cambios se hace más complejo. En estudios futuros se validarán estuches de PCR en tiempo real



para la certificación de muestras de productos hemoderivados, que son sistemas abiertos, cuya detección se puede realizar sobre más de una plataforma, que ya se producen en territorio nacional.^(23,24)

Por otra parte, contar con métodos validados constituye uno de los requisitos para el otorgamiento de la licencia de fabricación por parte del CECMEC, como órgano regulador de la República de Cuba, pues a través de un diseño riguroso, es que el fabricante puede establecer, con un alto grado de confianza, que todos los lotes producidos cumplen con las especificaciones de calidad.⁽⁷⁾ En este caso se puede garantizar que las materias primas que van a formar parte del HEBERTRANS[®] como producto final se encuentran negativas a los virus VIH y VHC, respectivamente.

Los resultados demuestran la factibilidad del uso de estos sistemas en la certificación del Extracto Dializado de Leucocitos como materia prima del HEBERTRANS[®].

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cuba. Oficina Nacional de Normalización. NC-ISO/IEC 17025:2017. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. ISO/ NC/CTN56; 2017. [acceso: 20/10/2021]. Disponible en: <https://www.iso.org/obp/ui#iso:std:iso-iec:17025:ed-3:v1:en>
2. World Health Organization. Expert Committee on Biological Standardization Sixty-seventh report. Guidelines on estimation of residual risk of HIV, HBV or HCV infections via cellular blood components and plasma. Geneva: WHO, Technical Report series; 2017. [acceso: 20/10/2021]; 1004. Disponible en: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/biologicals/blood-products/document-migration/resriskgl_who_trs_1004_web_annex_4.pdf?sfvrsn=55dd09d3_3
3. Organización Mundial de la Salud. Disponibilidad y seguridad de la sangre. OMS, Nota descriptiva. 2022 [acceso: 20/10/2021]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/blood-safety-and-availability>
4. MINSAP. Formulario Nacional de Medicamentos. 4ta edición. La Habana: Editorial de Ciencias Médicas; 2019. [acceso: 20/12/2019]. Disponible en: <https://instituciones.sld.cu/hospmiguelenriquez/files/2018/01/Formulario-nacional-de-medicamentos.pdf>



5. Martínez E, Pérez R, Herrera L, Lage A, Castellanos L. La industria biofarmacéutica cubana en el combate contra la pandemia de COVID-19. *Anales de la Academia de Ciencias de Cuba*. 2020 [acceso: 20/10/2021]; 10(2):[aprox. 28 p.]. Disponible en:
<http://revistaccuba.sld.cu/index.php/revacc/article/view/906/894>
6. CECMED. Regulación No. 36/2003: Requerimientos para la producción y control de los derivados plasmáticos. La Habana: CECMED. 2003. [acceso: 20/10/2021]. Disponible en:
https://www.cecmecmed.cu/sites/default/files/adjuntos/Reglamentacion/Reg_36-03.pdf
7. World Health Organization. Communication risk in public health emergencies. WHO, Guideline; 2018. [acceso: 20/10/2021]. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241550208>
8. CECMED. Regulación 41/2007: Validación de métodos analíticos. La Habana: CECMED; 2007. [acceso: 20/10/2021]. Disponible en: https://www.cecmecmed.cu/file/1928/download?token=LNNzr_h6
9. Nash RA, Watcher AH. *A Pharmaceutical process Validation*. New York: Marcel Dekker Inc.; 2003.
10. Oficina Nacional de Normalización. NC-TS-368: 2010: Guía para la Validación de Métodos de Ensayos Químicos para Alimentos. 1ra ed. Anexo A, A 1-3. La Habana: ONN; 2010.
11. Dia.Pro Diagnostic Bioprobes Srl. HIV Ab&Ag Fourth generation Enzyme Immunoassay for the determination of antibodies to Human Immunodeficiency Virus or HIV type 1&2&O and P24 HIV-1 Antigen in human serum and plasma. Italy: Dia.Pro Diagnostic Bioprobes Srl; 2013. [acceso: 20/10/2021]. Disponible en: <http://weldonbiotech.com/wp-content/uploads/2018/04/IVCOMB.CE-Insert-Rev.5-0713-Eng.pdf>
12. QIAGEN. QIAamp DNA Mini Kit, for isolation of genomic, mitochondrial, bacterial, parasite or viral DNA in human samples; QIAGEN trademaeks, 2018. [acceso: 20/10/2021]. Disponible en: <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/genomic-dna/qiaamp-dna-kits>
13. Okamoto H, Okada S, Sugiyama Y, Tanaka T, Sugai Y, Akahane Y, et al. Detection of hepatitis C virus RNA by a two stage polymerase chain reaction with pairs of primers deduced from the 5' noncoding region. *Jpn. J. Exp. Med.* 1990; 60: 222-225. [acceso: 20/10/2021]. Disponible en: <https://europepmc.org/article/med/1963453>



14. González I, González YJ, Armas A, Vina A, Medina A, Trujillo N, et al. Validation of a nested PCR assay UMELOSA® HCV CUALITATIVO for the detection of Hepatitis C virus Biologicals. 2003; 31:55-61. DOI: 10.1016/S1045-1056(02)00093-3
15. Heyndrickx, L, Janssens W, Zekeng L, Musonda R, Anagonou S, Van Der Auwera G, et al. Simplified Strategy for Detection of Recombinant Human Immunodeficiency Virus Type 1 Group M Isolates by gag/env Heteroduplex Mobility Assay. Journal of Virology. 2000; 74(1): 363-370. DOI: 10.1128/JVI.74.1.363-370.2000
16. Cham F, Heyndrickx L, Janssens W, Vereecken K, De Houwer K, Coppens S, et al. Development of a One-Tube Multiplex Reverse Transcriptase-PCR Assay for the Simultaneous Amplification of HIV Type 1 Group M gag and env Heteroduplex Mobility Assay Fragments. AIDS Research and Human Retroviruses. 2000; 16(15): 1503-5. DOI: 10.1089/088922200750006029
17. CECMED. Regulación 47/2007. Requisitos para la evaluación del desempeño de los diagnosticadores. La Habana: CECMED; 2007. [acceso: 20/10/2021]. Disponible en: https://www.cecmecmed.cu/sites/default/files/adjuntos/Reglamentacion/Reg_47-07.pdf
18. Chevaliez S, Onelia F, Pacenti M, Goldstein E, Galán JC, Martínez L, et al. Multicenter clinical evaluation of alinity m HCV assay performance. Journal of Clinical Virology. 2020; 129:104531. DOI: 10.1016/j.jcv.2020.104531
19. Braun P, Glass A, Mareeb L, Krugel M, Pacenti M, Onelia F, et al. Multicenter clinical comparative evaluation of Alinity m HIV-1 assay performance. Journal of Clinical Virology. 2020; 129:104530. DOI: 10.1016/j.jcv.2020.104530
20. Albertoni G, Castelo Girão MJ, Schor N. Mini review: current molecular methods for the detection and quantification of hepatitis B virus, hepatitis C virus, and human immunodeficiency virus type 1. Int J Infect Dis. 2014; 25:145-9. DOI: 10.1016/j.ijid.2014.04.007
21. Majid GS, Abdulmir AS, Ahmed AM, Aufi IM, Abdullah OI. The using of multiplex RT-qPCR for pooled samples to detect hepatitis B virus, hepatitis C virus, human immunodeficiency virus within Iraqi blood donors. Iraqi JMS. 2021; 19(1):99-106. DOI: 10.22578/IJMS.19.1.13



22. Krause SO, Badoux F, Douette P, Gibelin N, Grebanier AE, Krishnamurthy S, et al. Report No.57. Analytical Method Validation and Transfer for Biotechnology Product. Bathesda; 2012. [acceso: 20/10/2021]. Disponible en: https://store.pda.org/TableOfContents/TR57_TOC.pdf
23. Blanco M, Pérez MT, Valdés N, Romero K, Machado L, Ruíz N, Izquierdo M. Improvement of hemoderivatives Quality Control in Cuba. *Vaccimonitor*. 2010; 19(Supl 2):267-8.
24. Pérez MT, Izquierdo M, Blanco M, Romero K, Rolo FM. Seguridad viral en la producción de hemoderivados, política para la reducción del riesgo de transmisión de agentes infecciosos en Cuba. *Revista de la Defensa Civil*. 2012; (1):28-30.

Conflictos de interés

Los autores declaran que no existen conflictos de interés.

Contribuciones de los autores

Conceptualización: *Kenia Romero Martínez, María T. Pérez Guevara, Madeline Blanco de Armas.*

Curación de datos: *Kenia Romero Martínez, Liuber Yans Machado Zaldívar, Alicia Fleites Vázquez.*

Análisis formal: *Kenia Romero Martínez, Liuber Yans Machado Zaldívar, Alicia Fleites Vázquez.*

Adquisición de fondos y financiamiento: *María T. Pérez Guevara, Madeline Blanco de Armas.*

Investigación: *Kenia Romero Martínez, María T. Pérez Guevara, Madeline Blanco de Armas, Liuber Yans Machado Zaldívar, Alicia Fleites Vázquez, Esperanza Sánchez Dieguez.*

Metodología: *Kenia Romero Martínez, María T. Pérez Guevara, Madeline Blanco de Armas, Liuber Yans Machado Zaldívar.*

Administración del proyecto: *Kenia Romero Martínez, María T. Pérez Guevara, Madeline Blanco de Armas.*

Recursos: *María T. Pérez Guevara, Madeline Blanco de Armas.*

Software: *Kenia Romero Martínez, Liuber Yans Machado Zaldívar, Alicia Fleites Vázquez.*

<http://scielo.sld.cu>

<http://www.revmedmilitar.sld.cu>



Supervisión: *María T. Pérez Guevara, Madeline Blanco de Armas.*

Validación: *Kenia Romero Martínez, María T. Pérez Guevara, Madeline Blanco de Armas, Liuber Yans Machado Zaldívar, Alicia Fleites Vázquez.*

Visualización: *Kenia Romero Martínez.*

Redacción-borrador original: *Kenia Romero Martínez.*

Redacción- revisión y edición: *Kenia Romero Martínez.*