

Verificación clínica de REALQUALITY RQ-HPV HR Multiplex de acuerdo con guías internacionales para la detección del Virus del Papiloma Humano (VPH)

Clinical verification REALQUALITY RQ-HPV HR Multiplex according to international guidelines for the detection of Human Papillomavirus (HPV)

Catalina Martínez Jaramillo

Doctora en Biología

Colombia, catalina.martinez@udea.edu.co



<https://orcid.org/0000-0001-6846-0140>

Mateo Raigosa Bedoya

Bacteriólogo

Colombia, mateotasa@gmail.com

Diana Marcela Montoya Rodríguez

Magister Microbióloga y analista

Colombia, catalina.martinez@udea.edu.co

Lina María Gómez Bahamón

Especialista en Bacteriología

Colombia, lina.gomez@primedx.co

Cómo citar / How to cite

Martínez Jaramillo, C., Raigosa Bedoya, M., Montoya Rodríguez, D., & Gómez Bahamón, L. M. (2023). Verificación clínica de REALQUALITY RQ-HPV HR Multiplex de acuerdo a guías internacionales para la detección del virus del papiloma humano : Clinical verification REALQUALITY RQ-HPV HR Multiplex according to international guidelines for the detection of human papillomavirus. *UNACIENCIA*, 16(30), 20-27.

<https://doi.org/10.35997/unaciencia.v16i30.720>

Fecha de recepción: 06 de julio de 2023

Fecha de aprobación: 10 de agosto de 2023

Resumen

La verificación de una prueba molecular antes de su uso en la práctica clínica es esencial para brindar un servicio seguro y útil tanto a médicos como a pacientes, por lo que es responsabilidad de cada laboratorio determinar y documentar que las afirmaciones del ensayo sean precisas, reproducibles y sólidas. Aunque existen pautas sobre cómo se pueden abordar los estudios de validación y verificación para los ensayos moleculares, en Colombia rara vez se publican los detalles específicos del enfoque utilizado por los laboratorios. Este artículo describe los principios de verificación de una prueba de biología molecular, dada la importancia de que una verificación bien diseñada definirá las características de rendimiento del ensayo y los posibles resultados generados por este. El kit de diagnóstico REALQUALITY RQ-HPV HR Multiplex es una PCR multiplex en tiempo real para la detección y genotipado simultáneo de 14 genotipos de VPH de alto riesgo (HR), incluidos VPH - 16 y VPH -18. Antes de su implementación en el laboratorio realizamos un proceso de verificación del método, con la finalidad de confirmar que las características de rendimiento del ensayo en el laboratorio clínico sean las indicadas por el fabricante. Utilizando como guía la norma CLSI MM-19 nosotros encontramos una alta sensibilidad y especificidad, así como también, una alta concordancia de este método comparado con la prueba de referencia.

Palabras clave: Virus del Papiloma Humano (VPH), Prueba de ADN del VPH, pruebas moleculares, PCR en tiempo real.

Abstract

The verification of a molecular test before their use in clinical practice testing is essential for providing a safe and useful service to both clinicians and patients, so it is the responsibility of each laboratory to determine and document that the claims of the assay are accurate, reproducible and sound. Although guidelines exist for how validation and verification studies may be approached for molecular assays, the specific details of the approach used by laboratories are rarely published in Colombia. This paper outlines the principles of verification of a molecular biology test, given the importance that a well-designed verification will define the performance characteristics of the assay and the possible results generated by it. The REALQUALITY RQ-HPV HR Multiplex Diagnostic Kit multiplex is a Real-Time PCR for the simultaneous detection and genotyping of 14 high-risk (HR) genotypes of HPV, including HPV16 and HPV18. Before its implementation in the laboratory, we carry out a verification process of the method, in order to confirm that the performance characteristics of the assay in the clinical laboratory. Using the CLSI MM-19 standard as a guide, we found a high sensitivity and specificity of this method.

Key words: Human Papilloma Virus (HPV), HPV DNA Test, Molecular Testing, Real-Time PCR.

1. INTRODUCCIÓN

Según la Organización mundial de la Salud (OMS), el Virus del Vapiloma Humano (VPH) es una de las infecciones de transmisión sexual más prevalentes a nivel mundial (W. H. O. WHO, 2022). Se estima que alrededor del 90% de la población sexualmente activa se infectará con el virus en algún momento de su vida. Hasta la fecha, se han descrito más de 200 variantes del virus y se conoce que alrededor de 40 tienen la capacidad de infectar las superficies mucosas del cuerpo (Sendagorta-Cudós et al., 2019). Estas variantes, se clasifican según su potencial oncogénico en VPH de bajo y alto riesgo (VPH-BR y VPH-AR, respectivamente). Los genotipos de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82) están relacionados directamente con el cáncer cervical, presentándose en el 95% de los casos, siendo los tipos 16 y 18 los más frecuentemente encontrados (Burd, 2003; *STD Facts - Human Papillomavirus (HPV)*, 2022; W. H. O. WHO, 2022).

El tamizaje del cáncer de cuello uterino conlleva a la realización de pruebas para la detección de la infección por VPH o la detección de lesiones precancerosas y cancerosas para tratarlas según sea necesario (W. H. O. WHO, 2022) (Ronco et al., 2014). La OMS recomienda utilizar la detección del ADN del VPH como la prueba de tamizaje primario en lugar de la citología en los enfoques de detección y tratamiento entre la población general de mujeres (G. W. H. O. WHO, 2021). El tamizaje basado en la detección del VPH proporciona entre un 60-70% más protección contra los carcinomas cervicales invasivos en comparación con la citología (Ronco et al., 2014).

El kit comercial REALQUALITY RQ-HPV HR Multiplex (AB ANALITICA, Italia) es una PCR en tiempo real (qPCR), que permite la detección cualitativa (positiva o negativa) en conjunto de 12 genotipos del VPH de alto riesgo (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68) y la genotipificación individual del VPH 16 y 18. Esta qPCR se basa en la amplificación de los genes E6 y E7 de los VPH-AR, lo que los convierte en un blanco de detección confiable de la infección, ya que en el proceso de integración del ADN viral en el genoma del huésped, los genes E6 y E7 siempre se conservan, excluyendo así los falsos negativos (Analítica Advance Biomedice, s. f.).

En Colombia, funciona el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA). Al ser un kit comercial, cuenta con un registro sanitario vigente (INVIMA 2015RD-0003402), que permite su implementación en el diagnóstico clínico. Para ello, el fabricante debe pasar por un riguroso proceso de validación que determina la idoneidad del método y las estimaciones de las características de rendimiento analítico y diagnóstico (Iacobellis et al., 2018). Estas especificaciones muchas veces no pueden reproducirse en el laboratorio de rutina, ya que existe una variabilidad intrínseca que depende del equipo utilizado, del operador, de las condiciones de trabajo y de los protocolos de evaluación empleados por el fabricante (Halling et al., 2012), por lo que antes de ser implementadas para su uso, deben pasar por un proceso de verificación del método, con la finalidad de confirmar que este es reproducible en el laboratorio clínico, analizando las características de desempeño y rendimiento establecidas previamente por el fabricante (Jennings et al., 2009; Mattocks et al., 2010). Por lo tanto, los estudios de verificación suelen ser más pequeños y de alcance más limitado que los de validación.

En Colombia no se cuenta con un protocolo establecido para la verificación de métodos moleculares, y en la literatura disponible son de estudios internacionales. Por esta razón, se hace necesario adaptarnos a guías internacionales como las sugeridas por el *Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI)*, las cuales brindan recomendaciones para su realización (*MM19-A*:

Establishing Molecular Testing in Clinical Laboratory Environments; Approved Guideline, s. f.). Según esta guía, para la verificación de pruebas moleculares hay que seguir tres pasos generales compuestos por: 1. una fase de planificación, en donde se definen los requisitos de la prueba. 2. una fase de generación de datos de verificación y 3. una fase de implementación de la prueba (*MM19-A: Establishing Molecular Testing in Clinical Laboratory Environments; Approved Guideline*, s. f.). Por todo lo anterior, el objetivo principal de este artículo es la verificación de un kit molecular para la detección de VPH-AR frente a una prueba de referencia según la guía internacional CLSI MM-19.

2. METODOLOGÍA

Población de estudio

Se trata de un estudio descriptivo de corte transversal a partir de 20 muestras cervicales. El número de muestras se consideró de acuerdo con la guía de la CLSI-MM19, la cual establece que, para una verificación, se necesitan al menos 20 muestras entre positivas y negativas como objeto de referencia. Estas muestras fueron donadas por un laboratorio de referencia, el cual las procesó mediante la prueba *HPV-HR Abbott RealTime* (Abbott, EE. UU.), la cual es una qPCR automatizada que permite la detección cualitativa (positiva o negativa) en conjunto de 12 genotipos del VPH de alto riesgo (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68) y la genotipificación individual del VPH 16 y 18.

Procesamiento de las muestras

Para la extracción del ADN viral a partir de las muestras cervicales se usó el equipo automatizado Maelstrom™ 4800 (TANbead, Taiwán), en combinación con el estuche comercial TANBead Nucleic Acid Extraction Kit, siguiendo el protocolo establecido por la casa comercial.

Para la PCR en tiempo real (qPCR) se empleó la plataforma analítica CFX96™ (BioRad, EE. UU.) eligiendo el protocolo térmico contenido en el inserto del kit REALQUALITY RQ-HPV HR Multiplex (AB ANALITICA, Italia). El kit comercial viene con la mastermix (HPV RX-1) y el control positivo (PC). La mastermix está lista para su uso y contiene todos los reactivos necesarios para la PCR. El kit está validado en ADN extraído a partir de hisopos con muestras cervicales, vaginales, uretrales, bucales y anales, igualmente a partir de biopsias uretrales, vaginales y de prepucio.

La PCR se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Como primera instancia, se comprobó que el control interno (β -globina) presentaba amplificación en todas las muestras cervicales y el control positivo. Posteriormente, se comprobó que el control negativo no amplificó para ningún gen, evidenciando las condiciones de calidad del laboratorio. La detección se realizó de forma ciega para los resultados obtenidos anteriormente con el kit *HPV-HR Abbott RealTime* (Abbott, EE. UU.).

Estrategia de verificación

Se realizó la planificación del diseño inicial considerando factores claves como el tipo, la calidad y el volumen de las muestras; el método y los dispositivos de recolección; y las condiciones

de transporte y almacenamiento. Se revisaron los requerimientos para la verificación de un método molecular cualitativo como son la comparación de métodos, la sensibilidad y la especificidad.

Para la generación de datos de verificación, se contó con un laboratorio molecular construido bajo la norma estándar BSL2 de la OMS, siguiendo estrictos protocolos para evitar la contaminación, esto con el fin de evitar falsos positivos por ácido nucleico, amplicón u organismos desconocidos en el entorno que puedan reaccionar de forma cruzada con los reactivos del ensayo. Además, se revisaron los estados de los lotes, equipos y método, desde la extracción hasta la amplificación y la detección.

Finalmente, para la gestión de datos se organizaron mediante la creación de carpetas de directorios, tanto impresas como electrónicas.

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación de la Corporación Universitaria Adventista (UNAC), de Colombia. Es de destacar que las muestras utilizadas para la verificación del ensayo son muestras derivadas de procedimientos del laboratorio clínico, que no interfirieron con el diagnóstico oportuno y veraz del paciente. Es decir, solo se utilizaron muestras cuando existía un excedente de las mismas de los procedimientos (contramuestras). No se empleó ningún dato, personal, demográfico y/o antropométrico del paciente, solamente se utilizó el resultado derivado del procedimiento médico, por lo que según la Resolución Número 8430 de 1993, en su artículo 11, se considera una investigación sin riesgo y no requiere de un consentimiento informado. Para futuras investigaciones se implementará en la toma de la muestra el consentimiento informado.

Análisis estadístico.

La información se analizó en el programa estadístico SPSS® (Statistical Package for Social Sciences) versión 24, y se determinaron las características de desempeño de la prueba distinguidas por la sensibilidad y la especificidad. Los valores predictivos positivos (VPP) y valores predictivos negativos (VPN) fueron calculados de acuerdo con lo recomendado por la Asociación Multidisciplinar de Investigación Educativa (AMIE).

Para evaluar la concordancia entre el método de referencia y el kit por verificar, se utilizó el índice Kappa (k), el cual es un indicador de relación inter-observador en variables categóricas, que permite estimar hasta qué punto dos observadores coinciden en su medición excluyendo la concordancia atribuible al azar.

3. RESULTADOS

Sensibilidad y especificidad clínica

La sensibilidad de las 20 muestras analizadas con el kit REALQUALITY RQ-HPV HR Multiplex (AB ANALITICA, Italia), para detectar VPH-AR ha sido del 100%; la especificidad del 100%, el valor predictivo positivo del 100% y el valor predictivo negativo del 100%, como se observa en la Tabla 1. De las 11 muestras previamente señaladas como positivas, 8 fueron para el grupo VPH-AR, 2 para el gen VPH 16 y 1 para el gen VPH 18, coincidiendo con el método de referencia.

Tabla 1.

REALQUALITY RQ-HPV HR Multiplex y HPV- HR Abbott Real Time

		HPV-HR Abbott RealTime		Total
		HR HPV negativo	HR HPV positive	
REALQUALITY RQ-HPV HR Multiplex Detección	HR HPV negativo	9	0	9
	HR HPV positivo	0	11	11
	Total	9	11	20

Fuente: Elaboración propia.**Concordancia entre laboratorios**

La concordancia interlaboratorios fue del 100 % (20/20), con un valor Kappa de 1,00 (Tabla 2).

La concordancia entre laboratorios cumplió con las métricas de validación. No se obtuvieron valores discrepantes.

Tabla 2.

Índice Kappa entre el método de referencia y el kit por verificar

	Valor	Error estándar asintótico ^a	T aproximada ^b
Índice Kappa	1,000	0,000	4,472
N de casos	20		

a. No presupone la hipótesis nula.

b. Utilización del error estándar asintótico que presume la hipótesis nula.

Fuente: Elaboración propia.**4. DISCUSIÓN**

Antes de que se utilice una prueba molecular para informar los resultados de los pacientes, es responsabilidad de cada laboratorio determinar (o verificar) y documentar que las afirmaciones del ensayo son precisas, reproducibles y sólidas. Una verificación bien diseñada definirá las características de rendimiento del ensayo y los posibles resultados generados por el ensayo (Seaton, 2006). El kit de referencia *HPV-HR Abbott RealTime* (Abbott, EE. UU.) y el kit por verificar REALQUALITY RQ-HPV HR Multiplex (AB ANALITICA, Italia) están diseñados para identificar el mismo grupo de genes de VPH-AR, así como también genotipificar los genes para VPH 16 y VPH 18 (9,13). Lo convierte en un excelente material de referencia para la comparación de métodos, pues ofrecen la detección de los mismos genotipos de VPH. Se obtuvo una concordancia

del 100% comparando los resultados de la qPCR entre ambos métodos y se obtuvo la genotipificación del gen VPH 16 en 2 muestras y del gen VPH 18 en una muestra, coincidiendo en ambos casos. Este resultado es importante porque confirma una característica de desempeño muy importante que ofrecen ambas casas comerciales y es la genotipificación del VPH 16 y 18, los cuales están mayormente implicados en la neoplasia intraepitelial cervical (Yu et al., 2022).

El proceso de verificación del kit REALQUALITY RQ-HPV HR Multiplex (AB ANALITICA, Italia) se realizó siguiendo los estándares de la CLSI MM19-A, los cuales proporcionan una guía integral para la planificación e implementación de pruebas de diagnóstico molecular, incluida la planificación estratégica, los requisitos reglamentarios, entre otros (*MM19-A: Establishing Molecular Testing in Clinical Laboratory Environments; Approved Guideline*, s. f.).

En este proceso de verificación se observó la existencia de una alta sensibilidad y especificidad del kit REALQUALITY RQ-HPV HR Multiplex (AB ANALITICA, Italia), en comparación con el kit de referencia, lo que indica que el kit es capaz de detectar la cantidad medible más baja de un ácido nucleico diana de manera específica, es decir, no produce un resultado positivo en presencia de objetivos no específicos (Seaton, 2006). La sensibilidad y la especificidad son medidas tradicionales de la eficacia diagnóstica de una prueba, ya que miden la discriminación diagnóstica de un test en relación a un criterio de referencia (Halling et al., 2012). El ensayo confirma las especificaciones de rendimiento establecidas por el fabricante en las condiciones de nuestro laboratorio. Es importante mencionar que este kit fue validado anteriormente siguiendo lineamientos internacionales, en los que concluyeron que REALQUALITY RQ-HPV cumple con todos los requisitos de las directrices internacionales y puede considerarse clínicamente validado para fines de detección primaria de cáncer de cuello uterino (Iacobellis et al., 2018).

5. CONCLUSIONES

En conclusión, los criterios de validación y verificación internacional son fundamentales en la toma de decisiones objetivas con respecto a la elección de las pruebas moleculares, en este caso de VPH permitidas en los programas de detección, en los que la reproducibilidad y la precisión representan un hito en la detección del cáncer de cuello uterino basada en el VPH (Arbyn et al., 2021). Con base en esto, podemos afirmar que el ensayo de REALQUALITY RQ-HPV HR Multiplex (AB ANALITICA, Italia), cumple completamente con los criterios actuales y que se puede implementar hoy en día en el laboratorio para la detección del cáncer de cuello uterino basado en el VPH utilizando muestras de cuello uterino.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen intereses contrapuestos

Bibliografía

Analitica Advance Biomedice. (s. f.). *REALQUALITY RQ-HPV HR Multiplex | AB ANALITICA - Advanced Biomedicine*. abanalitica. Recuperado 30 de marzo de 2023, de <https://www.abanalitica.com/en/catalogo/product/realquality-rq-hpv-hr-multiplex/>

- Arbyn, M., Simon, M., Peeters, E., Xu, L., Meijer, C. J. L. M., Berkhof, J., Cuschieri, K., Bonde, J., Ostrbenk Vanlencak, A., Zhao, F.-H., Rezhake, R., Gultekin, M., Dillner, J., de Sanjosé, S., Canfell, K., Hillemanns, P., Almonte, M., Wentzensen, N., & Poljak, M. (2021). 2020 list of human papillomavirus assays suitable for primary cervical cancer screening. *Clinical Microbiology and Infection*, 27(8), 1083-1095. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.04.031>
- Burd, E. M. (2003). Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin. Microbiol. Rev.*, 16(1), 1-17. DOI: 10.1128/CMR.16.1.1-17.2003
- Halling, K. C., Schrijver, I., & Persons, D. L. (2012). Test Verification and Validation for Molecular Diagnostic Assays. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 136(1), 11-13. <https://doi.org/10.5858/arpa.2011-0212-ED>
- Iacobellis, M., Violante, C., Notarachille, G., Simone, A., Scarfi, R., & Giuffrè, G. (2018). Clinical validation of REALQUALITY RQ-HPV Screen according to the international guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for cervical screening. *Virology Journal*, 15(1), 48. <https://doi.org/10.1186/s12985-018-0965-z>
- Jennings, L., Van Deerlin, V. M., & Gulley, M. L. (2009). Recommended Principles and Practices for Validating Clinical Molecular Pathology Tests. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 133(5), 743-755. <https://doi.org/10.5858/133.5.743>
- Mattocks, C. J., Morris, M. A., Matthijs, G., Swinnen, E., Corveleyn, A., Dequeker, E., Müller, C. R., Pratt, V., & Wallace, A. (2010). A standardized framework for the validation and verification of clinical molecular genetic tests. *European Journal of Human Genetics*, 18(12), 1276-1288. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2010.101>
- MM19-A: Establishing Molecular Testing in Clinical Laboratory Environments; Approved Guideline.* (s. f.).
- Ronco, G., Dillner, J., Elfström, K. M., Tunesi, S., Snijders, P. J. F., Arbyn, M., Kitchener, H., Segnan, N., Gilham, C., Giorgi-Rossi, P., Berkhof, J., Peto, J., & Meijer, C. J. L. M. (2014). Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: Follow-up of four European randomised controlled trials. *The Lancet*, 383(9916), 524-532. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62218-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62218-7)
- Seaton, B. L. (2006). Verification of Molecular Assays. En W. B. Coleman & G. J. Tsongalis (Eds.), *Molecular Diagnostics* (pp. 237-241). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-928-1:237>
- Sendagorta-Cudós, E., Burgos-Cibrián, J., & Rodríguez-Iglesias, M. (2019). Infecciones genitales por el virus del papiloma humano. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 37(5), 324-334. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2019.01.010>
- STD Facts—Human papillomavirus (HPV).* (2022, diciembre 20). <https://www.cdc.gov/std/hpv/stdfact-hpv.htm>
- WHO, G. W. H. O. (2021). *WHO guideline for screening and treatment of cervical pre-cancer lesions for cervical cancer prevention* (Second edition). World Health Organization.
- WHO, W. H. O. (2022, enero 20). *Cáncer cervicouterino*. Cáncer cervicouterino -OMS. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cervical-cancer>