

OBJETIVO

Este módulo de Patología Molecular se ha diseñado para evaluar las distintas etapas relacionadas con la determinación de mutaciones en el gen EGFR, incluidas tanto la fase pre-analítica como post-analítica.

ESQUEMA DEL PROGRAMA DE CONTROL DE CALIDAD

Desde la SEAP se remitió a los laboratorios participantes cuatro secciones sin teñir, con un grosor de 6µm, de tejido fijado en formol e incluido en parafina de 4 carcinomas de pulmón que podían ser portadores de mutaciones en el gen EGFR. Cada cristal se identificó de forma clara con el número correspondiente a la muestra y el número correspondiente a la sección.

Con el objeto de distribuir de forma equitativa las distintas secciones cortadas de cada muestra a cada uno de los laboratorios participantes, se evitó que un mismo laboratorio recibiera siempre las primeras o últimas secciones de cada muestra. Inicialmente se estimó la participación de 52 laboratorios y se prepararon muestras según este cálculo.

Modulo Patología Molecular GCP Ronda 8

Cada laboratorio participante debía realizar la determinación de mutaciones en el gen EGFR en dichas muestras, utilizando para ello los protocolos habituales en su práctica clínica. Con el fin de valorar el porcentaje de celularidad tumoral de las muestras remitidas, se solicitó que una de las secciones remitidas fuera teñida con hematoxilina y eosina, para que pudiera ser revisada, pudiéndose emplear el resto de secciones para realizar la determinación.

El envío de los resultados debía realizarse de forma anónima, utilizándose como identificador el número asignado a cada laboratorio al inicio de la ronda de control de calidad. Cada laboratorio debía remitir por vía electrónica (calidad@seap.es) la siguiente documentación:

- Genotipo y porcentaje de celularidad tumoral de cada una de las muestras analizadas.
- Formulario con la información solicitada relativa a las distintas etapas del análisis de mutaciones en el gen EGFR .

- Informe con los resultados del análisis para cada muestra (tomando como modelo el informe que, de forma habitual, se remite al médico que solicita la determinación de mutaciones).
- Resultados analíticos sin interpretar en los que se basa el genotipo establecido

PARTICIPANTES

Nº de centros: 52 centros estaban inscritos en el presente módulo de Patología Molecular. Cincuenta laboratorios han enviado resultados sobre la determinación de mutaciones de EGFR (96%).

Orientación de la técnica y tipo de centros.

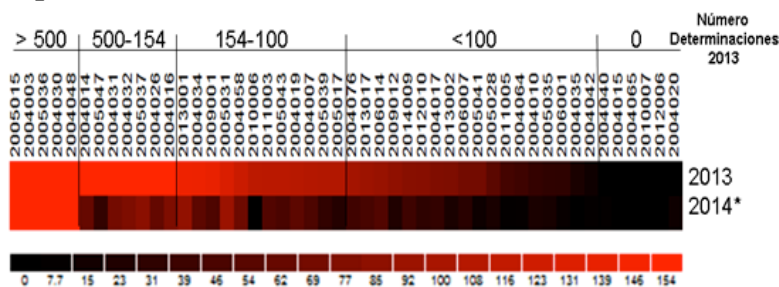
En 48 centros se ofrece la determinación del estado mutacional de EGFR como un servicio diagnóstico y en 5 de ellos también se realiza como investigación. En dos centros el análisis mutacional se realiza únicamente con carácter de investigación.

La información sobre el tipo de centro ha sido recogida para los 50 centros que respondieron el cuestionario. En total han participado 43 hospitales (en 4 casos se indica el carácter de Hospital Universitario), una universidad, un centro público de investigación (OPI) y cinco centros privados. En 40 de los 50 centros (80%) la determinación se realiza en los departamentos/laboratorios de Anatomía Patológica.

Nº de determinaciones anuales (Experiencia de los centros)

Los centros que han participado acumularon un total de 7424 determinaciones con carácter diagnóstico durante el 2013, con un promedio por centro de 154 determinaciones y una mediana de 101. Existe una gran dispersión de los datos con cinco centros que realizaron más de 500 determinaciones en el 2013, lo que representa el 49% del total de determinaciones realizadas. En este sentido 12 centros (25%)

Figura 1



realizaron un número de determinaciones superior al promedio global (n=154), mientras que 36 centros (75%) realizaron un número

inferior a dicho promedio, con 6 centros que no realizaron ninguna determinación durante el 2013 y cuatro de ellos tampoco durante el 2014 (figura 1).

Acreditación

Solamente 14 de los 50 centros refieren disponer de algún tipo de acreditación. Once de los laboratorios disponen de la ISO9001 y en dos casos de la ISO15189. También se refieren otros organismos acreditadores como ACSA (n=3), AENOR (n=1), CN Veritas (n=1) y ENAC (n=1).

METODOS DE ANALISIS y RESULTADOS

1. Procesamiento de la muestra previo al análisis

a) Análisis de celularidad tumoral.

El análisis del porcentaje de células tumorales ha sido valorado en 47 de los 49 centros que respondieron a las preguntas en referencia al análisis de la celularidad tumoral. Dos centros no analizaron el porcentaje de células tumorales.

Los 47 centros que valoraron el porcentaje de celularidad indican que en dicha evaluación participó un patólogo. En dos centros, junto al patólogo, participa un técnico de laboratorio, y en un tercer centro la evaluación se realiza de manera conjunta con un biólogo molecular.

42 de los 47 (89%) centros utilizan la información del porcentaje de células tumorales en la interpretación de los resultados. En 25 de estos casos el porcentaje de células tumorales es reportado en el informe final (60%), mientras que 17 centros (40%) no reflejan en el informe el porcentaje de células tumorales. En 5 casos el porcentaje de células tumorales no es utilizado para la interpretación de los resultados, pero uno de ellos indica que si refleja dicho porcentaje en el informe.

b) Extracción de ADN

49 de los centros aportaron información sobre el sistema de extracción. Casi en su totalidad los centros utilizan proteinasa k (n=47, 96%) y en un 55% de los centros (n=26) el tratamiento con proteinasa K se combina con un sistema comercial de extracción. En la mayoría de los casos se referencia el sistema Cobas DNA Sample

Preparation Kit, de Roche Diagnostics (n=16), en 5 casos se indican kits de Qiagen, en 2 casos el kit Maxwell de Promega, y los sistemas Gentra-PureGene, Nucleo Spin Tissue de Macherey-Nagel y Chelex 100 son referenciados por un solo centro.

2. Métodos de detección de mutaciones y análisis de los resultados de genotipado

Solamente 43 centros (86%) han indicado la tecnología utilizada para la determinación de mutaciones de EGFR. La mayoría de los centros (n=35, 81%) realizan las determinaciones de las mutaciones de EGFR mediante kits comerciales basados en la PCR a tiempo real (Cobas, TheRascreen EGFR, Entrogen). De los tres sistemas comerciales de PCR a tiempo real referidos la mayoría de centros utiliza el sistema COBAS de Roche (n=28, 80%). Los 8 centros que no han optado por kits comerciales de PCR a tiempo real utilizan metodologías desarrolladas en el laboratorio, adaptadas de trabajos publicados o comerciales. Tres centros utilizan la pirosecuenciación (dos en formato comercial) y otros 2 centros utilizan secuenciación directa por Sanger. Un único centro realiza un screening mutacional mediante análisis de fragmento, que combina con la secuenciación Sanger y ensayos de PCR a tiempo real. Un centro utiliza SNAPSHot. Destacar que un centro realiza la determinación mediante ultrasecuenciación con la plataforma GS Junior System 454.

En la presente ronda se remitieron 4 casos para realizar la determinación del estado mutacional de EGFR. Dos de los casos no presentaban mutación de EGFR en los exones 18 a 21 de EGFR (EGFR-9-2 y EGFR-9-4), uno de los casos mostraba una delección del exón 19 (EGFR-9-1) y el último caso tenía una mutación puntual en el exón 21 (c.2573T>G, p.L858R) (EGFR-9-3).

Un total de 45 centros identificaron correctamente el estado mutacional de EGFR en las cuatro muestras remitidas (90%). Este porcentaje es sensiblemente superior a los reportados en ediciones anteriores. De los 5 centros que no identificaron el total de las mutaciones tres de ellos reportaron falsos negativos y los otros dos un falso positivo. Uno de los centros no identificó ninguna de las dos muestras mutadas. Este centro realizó un número reducido de determinaciones durante el 2013 (n= 42). Este centro utiliza la secuenciación Sanger cuya sensibilidad es claramente inferior a otras

metodologías. Sin embargo, el hecho de que otros centros hayan reportado correctamente el resultado de las cuatro muestras mediante Sanger, y que el porcentaje de alelo mutado reportado por un centro que ha utilizado NGS es superior al 40% en ambas mutaciones, sugiere que los falsos negativos de este centro no se pueden achacar exclusivamente a la menor sensibilidad de la metodología Sanger. Los otros dos centros que reportaron un falso negativo correspondían a un centro con larga experiencia que procesó 500 muestras durante el 2013, y el segundo se trata de un centro con menor experiencia que solamente procesó 80 muestras durante el año pasado. Los dos centros que reportaron un falso positivo habían procesado un número parecido de muestras durante el 2013 (80 y 90 respectivamente).

La delección del exón 19 en la muestra EGFR-9-1 fue detectada por 49 de los centros (98%). Uno de los centros, junto a la delección del exón 19, reportó una mutación puntual en el exón 20 (p.S768I). Este mismo centro reportó la misma mutación puntual (p.S768I) en la muestra EGFR-9-3. Estas mutaciones no han sido identificadas por ningún otro centro, por lo que se trataría de falsos positivos que podrían estar asociados a la tecnología utilizada por este centro (SNAPshot).

La ausencia de mutación de la muestra EGFR-9-2 fue reportada por 49 de los 50 centros (98%). Un centro que utilizó un kit comercial basado en ARMS-PCR identificó una mutación puntual (p.G719S) en esta muestra. Al no haber sido referida por ningún otro centro consideramos que se trata de un falso positivo.

La mutación puntual del exón 21 presente en la muestra EGFR-9-3 fue identificada por la mayoría de los centros (n=47, 94%). Sin embargo, tres centros, incluido el que no reportó la delección del exón 19, no identificaron la mutación del exón 21. Estos falsos negativos no se asocian al uso de una determinada tecnología pues uno de los centros combina PCR tiempo real (ensayos TaqMan) con secuenciación directa, otro centro utiliza kit comercial de pirosecuenciación y el tercero únicamente secuenciación Sanger. Destacar que aunque 2 de los centros que dieron un falso negativo para esta muestra procesaron en el 2013 un número de muestras sensiblemente inferior a la media, el tercer centro procesó durante el 2013 más de 500 muestras, como ya se ha indicado anteriormente. Por otro lado, dos centros identificaron además de la mutación p. L858R otras mutaciones puntuales. Uno de los centros identificó, tal como hemos comentado anteriormente, la mutación p.S768I que creemos que se trata de un falso positivo asociado a la tecnología utilizada

(SnapShot). El otro centro identificó adicionalmente la mutación p.T790M. Esta mutación no ha sido identificada por ningún otro centro por lo que consideramos que se trata de un falso positivo. La importancia de este falso positivo radica en que se trata de una mutación asociada a la adquisición de resistencia a la terapia con inhibidores de tirosina kinasas. El centro indica que utiliza un kit comercial basado en ARMS-PCR.

La ausencia de mutación en la muestra EGFR-9-4 fue reportada por 49 de los 50 centros (98%). Un centro que utilizó un kit comercial de pirosecuenciación reportó una mutación puntual (p.L862P) en esta muestra que no fue identificada por ningún otro centro de los que analizaron dicha posición.

Tabla 1. Resultados Genotipado

Casos	Resultados Esperados	Resultados Correctos (%)	Comentarios
EGFR-9-1	EXON 19 DEL	49/50 (98%)	Un centro no detecta la mutación Un centro también identifica la mutación p.S768I
EGFR-9-2	Mutación No Detectada	49/50 (98%)	Un centro reporta la mutación G719S
EGFR-9-3	EXON 21 L858R	47/50 (94%)	Tres centros no detectan la mutación. Dos centros reportan mutaciones adicionales, T790M y p.S768I
EGFR-9-4	Mutación No Detectada	49/50 (98%)	Un centro reporta la mutación p.L862P

GENERALIDADES

Solamente 11 centros (22%) han contestado sobre el número de casos de cada tipo histológico y la frecuencia de mutaciones. Los resultados aparecen representados en la tabla 2.

Tabla 2. Frecuencia de mutaciones por tipo histológico

Tipo histológico	Nº de Casos	Promedio de mutados
CPNM	3003	12.2
Adenocarcinoma	1863	23.5
Epidermoide	435	3.2

Quince centros han indicado que participan en otros esquemas de Control de Calidad. De ellos 14 (87%) refieren el EMQM (<http://www.emqn.org>) y dos también refieren el ESP-EQA (<http://lung.eqascheme.org/>).

En el apartado de formación, 31 de los 44 grupos (70%) indicaron que algún miembro del equipo había realizado curso/s de formación.

RECOMENDACIONES

Tal como se había indicado en rondas anteriores sería muy recomendable realizar un esfuerzo para consensuar un formato de informe y la forma de anotar las variantes identificadas. De la misma forma se debiera consensuar como describir la ausencia de mutación. En la presente ronda se han utilizado los siguientes términos: WT, Wild-Type, Nativo, Negativo, No mutado, Mutación no detectada, N/A, Normal entre otros. En rondas anteriores se había indicado que para evitar términos que pueden inducir a error sería recomendable utilizar términos como “Mutación no detectada”