

Análisis de Resultados

Programa de Garantía de Calidad en Patología Módulo de Patología Molecular “Mirando al Gen”, Ronda 9 BRAF

Objetivo

Parte del módulo de Patología Molecular, dentro del Programa de Garantía de Calidad en Patología, se ha diseñado para evaluar las distintas etapas relacionadas con la determinación de mutaciones en el gen *Braf* (RONDA 9-2014), incluidas tanto la fase pre-analítica como post-analítica (interpretación de resultados).

Participantes

Los laboratorios interesados pudieron registrarse a través de la página web de la Sociedad Española de Anatomía Patológica (SEAP). Número de laboratorios participantes: 37 laboratorios han remitido los resultados correspondientes al análisis de EGFR.

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 melanomas que podían ser portadores de mutaciones en el gen *BRAF*. 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 siguió el siguiente esquema de corte, evitándose de esta forma que un mismo laboratorio recibiera siempre las primeras o últimas secciones de cada muestra. Inicialmente se estimó la participación de 45 laboratorios y se prepararon muestras según este cálculo.

Modulo Patología Molecular GCP Ronda 9

El resultado esperable de cada caso se realizó tras analizar las muestras por 3 metodologías: SANGER, COBAS y Genómica, con resultados coincidentes.

Cada laboratorio participante debía realizar la determinación de mutaciones en el gen *BRAF* 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 BRAF .

- 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

Recepción de resultados

Tras la recepción de los resultados se comprobó que 37 de los laboratorios participantes enviaron la información solicitada.

Métodos de análisis

La información relativa al método de extracción de ADN y a la metodología empleada para la determinación de mutaciones en el gen *BRAF* fue remitida por 36 laboratorios. En relación a la metodología para la extracción de ADN, destaca que de forma mayoritaria, los laboratorios optan por kit comercial.

En cuanto al método de detección de mutaciones 12 laboratorios emplearon secuenciación directa, 4 pirosecuenciación, 19 utilizaron PCR cuantitativa en tiempo real alelo-específica (Cobas).

Resultados

GENOTIPO

32/37 laboratorios identificaron correctamente el genotipo de las muestras enviadas (86.5%), aunque 3 no fueron capaces de analizar la muestra nº2 y 2 la nº4. Hay 5/37 con resultados incorrectos (13.5%). En el caso nº2 (resultado esperado WT) 3 laboratorios encontraron mutaciones, todos por métodos SANGER. Y en el caso nº4 (esperado V600E) 2 laboratorios lo dieron WT (falso negativo) todos por métodos SANGER. Caso nº1 y 3, 100% de acierto.

INFORME

La evaluación de los informes se ha realizado con el único objetivo de valorar la información referida por los distintos laboratorios en respuesta a la solicitud del análisis de mutaciones con el fin de consensuar la información mínima que debería recoger todo informe de una prueba de estas características. En ningún caso repercutiría en la valoración de los laboratorios participantes en el presente control de calidad, estimándose solamente el porcentaje de acierto del genotipo establecido para cada muestra como criterio para la emisión de los correspondientes certificados. La valoración de los informes pudo realizarse en los laboratorios participantes que enviaron la documentación oportuna.

Los puntos considerados para la emisión de un informe son los siguientes:

- Título del informe
- Datos de contacto del médico solicitante
- Identificador del laboratorio responsable de la prueba (datos de contacto)
- Fecha de recepción de la muestra
- Identificador de la muestra
- Fecha del informe
- Firma del responsable de la determinación
- Número de páginas
- Motivo/justificación del análisis
- Tipo de muestra
- Porcentaje de celularidad tumoral
- Método de análisis empleado
- Especificaciones relativas a especificidad y sensibilidad del método de análisis empleado.
- Resultado: genotipo

- Nomenclatura correcta de mutaciones
- Interpretación de los resultados
- Valoración de los resultados según contexto clínico
- Número de casos analizados 2010 y 2011
- Tipo de tumores analizados (adenocarcinomas, epidermoides...)
- Porcentaje de mutaciones obtenidas

Celularidad tumoral:

Es importante para utilizar técnicas con sensibilidad adecuada al porcentaje de células tumorales. Creemos que las muestras remitidas representan de manera adecuada la realidad del diagnóstico molecular de EGFR que en muchas ocasiones se tiene que hacer en biopsias pequeñas e incluso con menor presencia de células tumorales. Determinar la celularidad tumoral es especialmente importante para los laboratorios que emplean secuenciación directa que requiere una población tumoral (tras macro o microdissección) superior al 50%.

Casos con resultado erróneo:

Todos los laboratorios con resultado erróneo empleo secuenciación directa como método de detección.

Casos con resultado no valorable, no concluyente:

5 laboratorios no pudieron dar un diagnóstico en alguno de los casos.

Tipo de laboratorios:

La mayoría de los laboratorios que especificaron su filiación hacían la determinación en Anatomía Patológica (28/37), la mayor parte en instituciones públicas.

Conclusiones:

El 13.5% de errores entre los laboratorios participantes es una tasa mejorable. Es bueno, pero mejorable el % de laboratorios que no puede dar un resultado concluyente. Las características de las muestras no deberían ser la causa, ya que la celularidad tumoral es similar a la que tenemos en la mayoría de los Hospitales para hacer la determinación. Las técnicas de PCR a tiempo real tienen, en esta Ronda, una mejor efectividad que la secuenciación directa.