



SeAP-IAP
[Sociedad Española de Anatomía Patológica]
[International Academy of Pathology]



SEAP
Calle Ancora, 3, 2º B
28045 MADRID
Tfno. y Fax 91 539 86 28
MAIL: SEAP@SEAP.ES

Programa de Garantía de
Calidad en Patología

Análisis de Resultados

Programa de Garantía de Calidad en Patología

Módulo de PATOLOGÍA MOLECULAR

Ronda 9 (2014) KRAS

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 *KRAS* (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).

De los laboratorios inscritos, 40 han remitido los resultados correspondientes al análisis de *KRAS*.

39 de los laboratorios indican que el análisis de mutaciones en el gen *KRAS* se ha implementado como prueba diagnóstica en sus centros, además 3 de ellos realizan el análisis para fines de investigación y un laboratorio utiliza este análisis únicamente para investigación.

Esquema del programa de control de calidad

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

Cada laboratorio participante debía realizar la determinación de mutaciones en el gen *KRAS* 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, 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 *KRAS*.
- 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 3 de los laboratorios participantes enviaron toda la información solicitada. Los 40 laboratorios adjuntaron información sobre el genotipo obtenido (uno de ellos sólo valoró dos de las muestras recibidas sin especificar el motivo), aunque sólo 4 de ellos incluyeron dicha información en un informe con los resultados del análisis de mutaciones. 33 laboratorios no adjuntaron los datos brutos de los análisis realizados y 6 laboratorios no adjuntaron datos del porcentaje de tumor de las muestras (Tabla 1).

Métodos de análisis

La información relativa al método de extracción de ADN fue remitida por 39 laboratorios y respecto a la metodología empleada para la determinación de mutaciones en el gen *KRAS*, fueron 34 laboratorios los que aportaron dicha información (los seis restantes comentaron que el método empleado era comercial pero sin especificar cual).

En relación a la metodología para la extracción de ADN, destaca que de forma mayoritaria, los laboratorios optan por kit comercial (4 de ellos utilizaron un método desarrollado por el laboratorio).

En cuanto al método de detección de mutaciones (Tabla 2), 8 laboratorios emplearon secuenciación directa para el análisis. 23 utilizaron PCR cuantitativa en tiempo real alelo-específica, utilizando diferentes kits comerciales. 8 laboratorios emplearon la pirosecuenciación como método de análisis, 4 utilizaron un kit comercial no basado en la secuenciación del producto de PCR y uno de ellos utilizó una tecnología de secuenciación masiva de última generación. Sólo 2 laboratorios utilizaron un abordaje experimental que incluye el enriquecimiento del alelo mutado en la etapa de PCR, mientras que sólo dos laboratorios utilizaron un método previo de screening (no especificado y PCR cuantitativa en tiempo real alelo-específica respectivamente). En 3 casos, se indica que se emplearon tres métodos de análisis con distinta sensibilidad (1 caso con secuenciación, PCR cuantitativa en tiempo real alelo-específica y un kit comercial no basado en la secuenciación del producto de

PCR, 1 caso en el que se empleó secuenciación, pirosecuenciación y PCR cuantitativa en tiempo real alelo-específica y 1 caso en el que se empleó secuenciación, pirosecuenciación y un kit comercial no basado en la secuenciación del producto de PCR) y en 4 casos se indica que se emplearon dos métodos de análisis con distinta sensibilidad (3 de ellos con secuenciación y PCR cuantitativa en tiempo real alelo-específica y 1 caso en el que se empleó pirosecuenciación y PCR cuantitativa en tiempo real alelo-específica). 36 laboratorios aportaron información acerca de las mutaciones que detectaba la metodología utilizada (todos ellos mutaciones en los codones 12 y 13 del gen *KRAS*, 20 completaron con mutaciones en el codón 61 y 9 incorporan mutaciones en codones como el 58, 59, 117, 146, 147, 436, 437 ó 350).

Resultados

GENOTIPO

El genotipo de las muestras enviadas se indica en la Tabla 3a, así como el porcentaje de acierto de los distintos laboratorios al remitir los resultados (Tabla 3b). 33 laboratorios identificaron correctamente el genotipo de las cuatro muestras enviadas, con lo que podemos destacar que el porcentaje de laboratorios que muestran una buena concordancia con los resultados esperados es alta (82.5%). No se ha incluido en este porcentaje a un laboratorio que no ha analizado las muestras 9.3 y 9.4 sin mencionar el motivo. Ningún laboratorio da un resultado falso negativo, pero es interesante destacar que 6 laboratorios muestran algún resultado falso positivo (Tabla 3a).

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 aquellos laboratorios participantes que enviaron la documentación oportuna (4 laboratorios).

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

Uno de los laboratorios que incluyó informe de resultados entre la información aportada, indica las posibles implicaciones terapéuticas de este análisis. En cualquier caso, la ausencia de esta información en los informes puede justificarse por el hecho de que no se facilita ningún tipo de contexto clínico de las muestras incluidas en el control de calidad. Sería recomendable para el futuro incluir esta información con el fin de que los laboratorios participantes pudieran completar sus informes de acuerdo con su práctica clínica habitual.

En general, en los informes evaluados se incluye de forma clara la identificación correspondiente a la muestra analizada, el laboratorio responsable de la realización del análisis y se distingue de forma clara el resultado de la prueba, estando éste diferenciado del resto de la información recogida en el informe (datos de contacto del laboratorio, motivo del análisis o la información relativa al procesamiento de la muestra y al método de análisis).

Es importante destacar que de forma generalizada se incluye la información correspondiente a la parte pre-analítica de la prueba de análisis de mutaciones, como la naturaleza de la muestra o el porcentaje de tumor, así como el método empleado para la realización del análisis de mutaciones. Se ha observado que sólo dos de los laboratorios especifican la sensibilidad del método empleado para el análisis

(información necesaria para que el porcentaje de celularidad tumoral indicado en el informe sea interpretado en el contexto adecuado y se pueda valorar el resultado del análisis). De forma generalizada, sí indican expresamente especificaciones técnicas de su método de análisis, como por ejemplo las mutaciones que son cubiertas por el método en cuestión, con lo que quedarían cubiertas aquellas situaciones en las que pudiera darse la posibilidad de un falso negativo porque la muestra presentase una mutación no detectada por el método de análisis empleado, con la consiguiente implicación que dicha situación podría tener en el resultado.

En cualquier caso a la luz de los resultados recibidos de *KRAS* se puede ver que los resultados falsos positivos se han obtenido utilizando diversas técnicas, con lo que no se podrían justificar dichos resultados debido a un problema inherente a las metodologías empleadas sino quizá a la parte pre-analítica del proceso, siendo muy importante la revisión minuciosa de cada paso de este procedimiento.

Respecto a la utilización de la técnica de secuenciación directa para el análisis de mutaciones, esta técnica, debido a su menor sensibilidad, no debería ser utilizada para la caracterización de mutaciones somáticas, sobre todo en casos en los que el porcentaje de celularidad tumoral sea inferior al 50%. En general, las técnicas basadas en PCR cuantitativa en tiempo real y la pirosecuenciación, por su mayor sensibilidad, ofrecen los mejores resultados a la hora de asignar genotipos correctos, por lo que serían las técnicas más recomendables para la caracterización de mutaciones.

Tabla 1. Envío de resultados

Laboratorio	2004003	2004007	2004010	2004014	2004015	2004016	2004019	2004020	2004026	2004030	2004031	2004032	2004034	2004035	2004040	2004042	2004048	2004049	2004064	2004065	2005028	2005031	2005036	2005037	2005039	2005041	2005047	2006001	2006014	2008018	2009001	2009012	2010006	2011003	2012006	2012014	2013001	2013002	2014009	2014014							
Formulario resultados: % tumor																																															
Formulario resultados: genotipo																																															
Informe																																															
Resultados brutos																																															

Tabla 2. Métodos empleados para la detección de mutaciones

Laboratorio	2004003	2004007	2004010	2004014	2004015	2004016	2004019	2004020	2004026	2004030	2004031	2004032	2004034	2004035	2004040	2004042	2004048	2004049	2004064	2004065	2005028	2005031	2005036	2005037	2005039	2005041	2005047	2006001	2006014	2008018	2009001	2009012	2010006	2011003	2012006	2012014	2013001	2013002	2014009	2014014									
Secuenciación (Sanger)																																																	
Pirosecuenciación																																																	
KRAS Strip Assay																																																	
PCR cuantitativa en tiempo real alelo-específica																																																	
Secuenciación masiva																																																	

* Screening previo

* Enriquecimiento alelo mutado

Tabla 3a. Resultados: genotipo

	Genotipo	2004003	2004007	2004010	2004014	2004015	2004016	2004019	2004020	2004026	2004030	2004031	2004032	2004034	2004035	2004040	2004042	2004048	2004049	2004064	2004065	2005028	2005031	2005036	2005037	2005039	2005041	2005047	2006001	2006014	2008018	2009001	2009012	2010006	2011003	2012006	2012014	2013001	2013002	2014009	2014014					
9.1	G13D	G13D	C12H3	C12H3	C12H3	G13D	C12H3	C12H3	13A _{sp}	C12H3	G13D	C12H3	C12H3	G13D	C12H3	C12H3	C12H3	G13D	C12H3	C12H3	C12H3	Exón 2	13A _{sp}	G13D	G13D	C12H3	G13D	G13D	G13D	G13D	G13D	13A _{sp}	G13D	G13D	C12H3	G13D	G13D	G13D	G13D	G13D	13A _{sp}	G13D				
9.2	G12A	G12A	C12H3	C12H3	C12H3	G12A	C12H3	C12H3	12A _{la}	C12H3	G12A	C12H3	C12H3	G12A	C12H3	C12H3	C12H3	G12A	C12H3	C12H3	C12H3	Exón 2	12A _{la}	G12A	G12A	C12H3	G12A	G12A	G12A	G12A	G12A	12A _{la}	G12A	G12A	G12A	G12A	G12A	G12A	G12A	G12A	G12A	G12A	12A _{la}	G12A		
9.3	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	G12C	WT	WT	WT	WT	WT	N/A	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	G13D	WT	G12D	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	G12A	WT	WT	
9.4	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	N/A	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	12A _{sp}	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	G12D	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT

Tabla 3b. Resultados: genotipo

	Genotipo	% acierto laboratorios participantes	Tipo de error
9.1	G13D	100%	...
9.2	G12A	100%	...
9.3	WT	88%	4 laboratorios informaron un resultado falso positivo y 1 no analizó la muestra (sin indicación del motivo)
9.4	WT	92%	2 laboratorios informaron un resultado falso positivo y 1 no analizó la muestra (sin indicación del motivo)