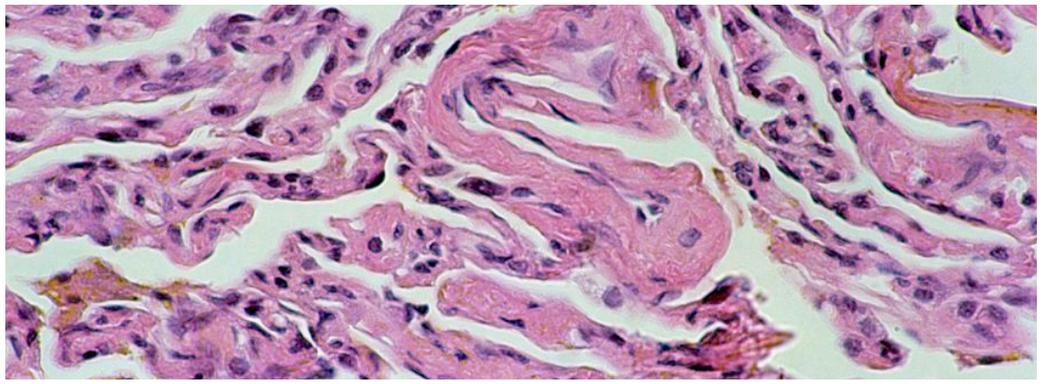
Abordaje del diagnóstico molecular del cáncer de pulmón no microcítico mediante NGS: Opinión de expertos

Ihab Abdulkader, Edurne Arriola, Beatriz Bellosillo,
Michele Biscuola, Sarai Palanca y Federico Rojo

AZINGenius

AstraZeneca



INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha producido un cambio paradigmático en el diagnóstico y tratamiento del cáncer de pulmón no microcítico (CPNM). La investigación realizada en la biología molecular ha permitido identificar numerosas alteraciones oncogénicas que son responsables del desarrollo y progresión del tumor, permitiendo clasificar el CPNM en subgrupos o entidades moleculares distintas. Paralelamente, se impulsa el desarrollo de nuevos medicamentos produciéndose una revolución terapéutica que permite el acceso de los pacientes a tratamientos dirigidos e implanta la medicina de precisión personalizada (MPP) en la asistencia sanitaria.

La posibilidad de utilizar dichos tratamientos se debe a una mejora en el diagnóstico molecular del CPNM. En 2004, se identifica el primer biomarcador molecular de beneficio en cáncer de pulmón, el receptor del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*), iniciándose la era de las terapias dirigidas en CPNM. Desde entonces, múltiples alteraciones oncogénicas han sido descritas en esta enfermedad (*ALK*, *ROS1*, *MET*, *BRAF*, NTRK, *RET*, *KRAS*, *ERBB2*, etc.) y hay disponibles tratamientos específicos altamente eficaces para dichas alteraciones. Existe, por tanto, una necesidad de realizar un diagnóstico molecular integral en los pacientes con CPNM avanzado y así poder ofrecer el mejor tratamiento.

Clásicamente, estas determinaciones se han realizado por orden de frecuencia, gen a gen, con la posibilidad de agotar el escaso material de la biopsia diagnóstica. En este contexto, la secuenciación masiva o *next-generation sequencing* (NGS) adquiere un valor fundamental, permitiendo la determinación de todas las alteraciones genéticas relevantes en un único análisis. Esta importante ventaja ofrecida por la NGS, ya instaurada en algunos centros de nuestra geografía, viene acompañada de nuevos retos de selección de pacientes, procesamiento de las muestras, implementación de nueva tecnología y otros que revisaremos a continuación.

Abordaje del diagnóstico molecular del cáncer de pulmón no microcítico mediante NGS:
Opinión de expertos

ÍNDICE

TEMA 1 6

Consideraciones clínicas previas al diagnóstico molecular mediante NGS: indicación, circuito y consentimiento informado.

TEMA 2 10

Recomendaciones preanalíticas para el estudio mediante NGS en muestras de tejido y sangre.

TEMA 3 24

Selección, validación y verificación técnica de los estudios de NGS.

TEMA 4 36

Informe de resultados de NGS.

TEMA 5 50

Comité Molecular.

TEMA 6 54

Gestión de la calidad en NGS.

TEMA 7 62

Coste-eficiencia en el uso de NGS.

GRUPO DE EXPERTOS

Dr. Ihab Abdulkader
Departamento de Anatomía Patológica, Hospital Clínico Universitario (SERGAS), Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela.

Dr. Michele Biscuola
Laboratorio Patología Molecular y Dianas Terapéuticas, Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Virgen del Rocío, Sevilla.

Dra. Edurne Arriola
Jefa de Sección Cáncer de Pulmón y genitourinario, Oncología Médica, Hospital del Mar, Barcelona.

Dra. Sarai Palanca Suela
Especialista en Análisis Clínicos, Unidad de Biología Molecular (UBM), HUiP La Fe. Profesora Asociada Asistencial, Departamento. Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Valencia, Valencia.

Dra. Beatriz Bellosillo
Jefe de Sección de Diagnóstico Molecular, Servicio de Patología, Hospital del Mar, Barcelona.

Dr. Federico Rojo
Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz, Madrid.

1. PACIENTES CANDIDATOS

Existe consenso general en que los pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) avanzado de histología no escamosa son candidatos a estudio molecular. Se recomienda que dicho estudio garantice el análisis de las alteraciones genómicas que son dianas terapéuticas de fármacos aprobados. Esto puede presentar diferencias geográficas, pero la NGS con un panel que evalúe dichos genes se considera un método eficiente de diagnóstico molecular completo debido a la posibilidad de obtener múltiples resultados en un solo test con una muestra generalmente limitada. En cuanto a la histología escamosa, también se recomienda realizar estudio molecular en pacientes no fumadores o con baja carga tabáquica (<10 paquetes/año), o jóvenes (menores de 50 años) (1,2).

Recientemente han emergido como relevantes algunos biomarcadores de respuesta a fármacos ya aprobados en algunos países como *RET*, *NTRK* y *MET,* con una frecuencia baja en carcinomas escamosos, pero que ha llevado a incluir esta histología en los *screenings* de ensayos con fármacos contra dichas dianas. En pacientes que no responden bien al estándar de tratamiento o sin opciones terapéuticas, y con una situación clínica adecuada, realizar NGS en busca de estas dianas infrecuentes podría considerarse en pacientes con histología escamosa.

En estos casos, si el paciente es finalmente candidato a tratamiento dirigido, en el momento de la progresión se podría plantear la realización de NGS para la identificación de mecanismos de resistencia. En este caso, puede orientar al oncólogo tratante a la inclusión o derivación del paciente a ensayos clínicos de los que se pueda beneficiar. La dificultad de la rebiopsia tumoral en muchos casos ha llevado a la propuesta de realizar el estudio molecular en el momento de la progresión en biopsia líquida (3).

No existe una recomendación explícita para la histología de carcinoma neuroendocrino de célula grande. Las alteraciones genómicas de este subgrupo infrecuente pueden a veces ser similares a los carcinomas neuroendocrinos de célula pequeña y, por tanto, no ser susceptibles de tratamientos dirigidos.

En estadio III, la indicación de tratamiento de consolidación con inmunoterapia (durvalumab) tras quimioradioterapia se realiza basada en la expresión de PD-L1 por inmunohistoquímica (4). Sin embargo, existe evidencia de que los pacientes con mutaciones de *EGFR* en este contexto no se benefician de durvalumab, independientemente de PD-L1 (5,6). El diagnóstico de *EGFR* en estadio III, por tanto, puede ser útil para la toma de decisiones terapéuticas; sin embargo, el papel de la NGS en esta situación no está definido de momento.

En adyuvancia, a la luz de los resultados del ensayo ADAURA (7), la determinación de *EGFR* ya se contempla en países donde existe la indicación de osimertinib adyuvante. La NGS en este contexto podría ampliar la información sobre otras posibles dianas terapéuticas y facilitar así el desarrollo eficiente de ensayos clínicos para estas terapias en adyuvancia.

2. SOLICITUD

En cuanto a la solicitud de estos biomarcadores en el paciente candidato, existen dos posibilidades. La primera es que, tras la visita por el oncólogo médico, este profesional, una vez valorado el paciente como candidato a NGS, realice la petición de los biomarcadores a patología. La mayor limitación de esta estrategia es el retraso en el diagnóstico completo, que puede implicar un deterioro clínico importante del paciente y, en ocasiones, ser suficiente para que el paciente deje de ser candidato al tratamiento oncológico activo.

La segunda opción y preferible es que, tras el diagnóstico y la valoración inicial en el comité multidisciplinar, el patólogo derive la muestra (*reflex testing*) a los estudios de biomarcadores pertinentes (PD-L1 y NGS) en paralelo para que esta información esté disponible en la primera visita del oncólogo tratante (2). La limitación de esta aproximación es que a veces es difícil para el patólogo saber el estadio de la enfermedad y el estado general del paciente y, por tanto, la indicación del test en un paciente que quizá no sea candidato a tratamiento dirigido. De ahí la importancia del comité multidisciplinar, donde se revisan los casos desde el inicio y donde el patólogo puede ser informado de la necesidad específica de biomarcadores.

Un escenario particular es el de un paciente en tratamiento (dirigido) que presenta una progresión de la enfermedad y donde se quieren evaluar mecanismos de resistencia. Debido a la diversidad de dichos mecanismos (8) la NGS puede ser una herramienta fundamental en este contexto. Es importante que el oncólogo señale adecuadamente en la petición el contexto clínico del paciente y qué se busca, ya que, si existen diversos paneles de NGS disponibles, puede que algunos sean más adecuados para la situación de resistencia a determinado fármaco. En la clínica, la obtención de una rebiopsia tumoral a la progresión no es siempre factible, por lo que la NGS en biopsia líquida tiene un valor importante en esta situación de la enfermedad (3). En este escenario, y para la valoración completa del paciente y las necesidades diagnósticas, además de la interpretación de los hallazgos son de gran utilidad los comités de tumores moleculares (9). Este punto se discutirá en mayor profundidad más adelante.

3. CONSENTIMIENTO INFORMADO

La NGS ha revolucionado el diagnóstico molecular en cáncer de pulmón, pero también ha derivado en un proceso de información y consentimiento más complejo.

El estudio por NGS puede por un lado estar dirigido a la obtención de resultados con implicación terapéutica directa. Sin embargo, en algunos casos, el panel puede contener información adicional que cae en la categoría de lo investigacional, bien porque son alteraciones sin fármaco asociado en la realidad de ese país o paciente, o incluso hallazgos que puedan no tener ninguna aplicación terapéutica en ese momento, pero sí puedan tener una implicación pronóstica en el paciente o su familia (10). Otro de los hallazgos que podemos obtener en paneles amplios son alteraciones responsables de síndromes hereditarios (alteraciones germinales). El aspecto de línea germinal y consejo genético debe contemplarse para aquellos paneles que puedan cubrir genes de predisposición o asociación. Estos hallazgos deben ser manejados conjuntamente con la unidad de consejo genético debido a su implicación en el paciente y su familia. Existen diversas publicaciones con recomendaciones sobre el proceso de consentimiento informado y sobre la transmisión de los resultados (principalmente en cuanto a las variantes de significado incierto). En cuanto al proceso de consentimiento, se recomienda utilizar material con lenguaje sencillo y entendible para los distintos niveles de educación de los diversos pacientes que invite al paciente a realizar preguntas importantes sobre el test al que se va a someter. En cuanto a los hallazgos incidentales, se considera que entre el 1-4% de los individuos puede presentar alteraciones genómicas incidentales potencialmente accionables (11,12). Una de las principales preocupaciones sobre estos hallazgos es la posibilidad de falsos positivos, por lo que en algunos casos se requiere validación de dichos resultados (13). Además, en algunos casos, identificar con certeza si una variante es deletérea puede no ser fácil. Por tanto, hay que considerar la necesidad de informar sobre dichas variantes a los pacientes o la posibilidad de que ellos rechacen recibir esta información. Estas pueden ser deletéreas con implicación por ejemplo en su planificación familiar, o incluso accionables en un futuro. Una dificultad añadida es saber si es responsabilidad del médico actualizar la información sobre el significado de dicha variante durante toda la vida del paciente o incluso de su familia, con la dificultad logística que esto representa. Una alternativa es que el paciente posea dicha información y pueda solicitar una actualización de la misma en cualquier momento futuro (14). Todos estos aspectos deben estar considerados en el proceso de consentimiento informado y deben formar parte de la conversación previa a test. La información también dependerá de la amplitud del panel y de la cantidad de genes que evalúe, haciendo más probable la aparición de hallazgos incidentales en paneles más amplios (15).

BIBLIOGRAFÍA

1. Kalemkerian GP, Narula N, Kennedy EB, *et al*. Molecular Testing Guideline for the Selection of Patients With Lung Cancer for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: American Society of Clinical Oncology Endorsement of the College of American Pathologists/International Association for the Study of Lung Cancer/ Association for Molecular Pathology Clinical Practice Guideline Update. J Clin Oncol. 2018 Mar 20;36(9):911-919.

2. Garrido P, Conde E, de Castro J, *et al*. Updated guidelines for predictive biomarker testing in advanced non-small-cell lung cancer: a National Consensus of the Spanish Society of Pathology and the Spanish Society of Medical Oncology. Clin Transl Oncol. 2020 Jul;22(7):989-1003.

3. Rolfo C, Mack PC, Scagliotti G V, *et al*. Liquid Biopsy for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): A Statement Paper from the IASLC. J Thorac Oncol. 2018 Sep;13(9):1248-1268.

4. Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, *et al*. Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III Non–Small-Cell Lung Cancer. N Engl J Med. 2017;377(20):1919–29.

5. Gray JE, Villegas A, Daniel D, *et al*. Three-Year Overall Survival with Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III NSCLC—Update from PACIFIC. J Thorac Oncol. 2020;15(2):288–93.

6. Aredo JV, Mambetsariev I, Hellyer JA, *et al*. Durvalumab for Stage III EGFR-Mutated NSCLC After Definitive Chemoradiotherapy. J Thorac Oncol. 2021 Jun;16(6):1030-1041.

7. Wu Y-L, Tsuboi M, He J, *et al*. Osimertinib in Resected EGFR -Mutated Non–Small-Cell Lung Cancer. N Engl J Med. 2020;383(18):1711–23.

8. Oxnard GR, Hu Y, Mileham KF, *et al*. Assessment of Resistance Mechanisms and Clinical Implications in Patients with EGFR T790M-Positive Lung Cancer and Acquired Resistance to Osimertinib. JAMA Oncol. 2018;4(11):1527–34.

9. Luchini C, Lawlor RT, Milella M, Scarpa A. Molecular Tumor Boards in Clinical Practice. Trends Cancer. 2020 Sep;6(9):738-744.

10. Colomer R, Mondejar R, Romero-Laorden N, *et al*. When should we order a next generation sequencing test in a patient with cancer? EClinicalMedicine. 2020 Jul 31;25:100487.

11. Dorschner MO, Amendola LM, Turner EH, *et al*. Actionable, pathogenic incidental findings in 1,000 participants' exomes. Am J Hum Genet. 2013;93(4):631–40.

12. Amendola LM, Dorschner MO, Robertson PD, *et al*. Actionable exomic incidental findings in 6503 participants: Challenges of variant classification. Genome Res. 2015;25(3):305–15.

13. Federici G, Soddu S. Variants of uncertain significance in the era of high-throughput genome sequencing: A lesson from breast and ovary cancers. J Exp Clin Cancer Res. 2020;39(1):1–12.

14. Kost RG, Poppel SM, Coller BS. Informed consent for next-generation nucleotide sequencing studies: Aiding communication between participants and investigators. J Clin Transl Sci. 2017;1(2):115–20.

15. Strom SP. Current practices and guidelines for clinical next-generation sequencing oncology testing Cancer Biol Med. 2016;13(1):3–11.

1. TIPOS DE MUESTRAS PARA ANÁLISIS MEDIANTE SECUENCIACIÓN MASIVA

1.1. Muestras tisulares y citológicas

Según la localización y el tamaño del tumor existen distintos tipos de muestras en función de la técnica que se ha empleado para obtenerlas, tales como biopsias bronquiales, mediastinoscopia, piezas quirúrgicas, biopsias con aguja gruesa (BAG), biopsias guiadas por ultrasonido endobronquial (EBUS), punción-aspiración con aguja fina (PAAF), citología exfoliativa o citología en base líquida (CBL) (1).

Las muestras tumorales adquiridas mediante PAAF se pueden procesar como bloques celulares e incluirlos en parafina al igual que se hace con las biopsias. Además, los sobrenadantes procedentes de la PAAF tras la centrifugación y la sedimentación celular pueden ser una fuente valiosa de ácidos nucleicos de alta calidad para fines moleculares (2).

Otro tipo de muestras citológicas sobre las que cada vez existe una mayor evidencia sobre su utilidad para la NGS son las extensiones citológicas, ya sean secadas al aire, fijadas con alcohol o en base líquida, ya que permiten obtener ácidos nucleicos en una cantidad y calidad adecuadas para la realización de la técnica (3,4). La última guía publicada por el Colegio Americano de Patólogos (CAP), la Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón (IASLC) y la Asociación de Patología Molecular (AMP) sugiere encarecidamente el uso de extensiones citológicas como material de partida para pruebas moleculares. Además de ser adecuados para el análisis de NGS basado en DNA, las extensiones también pueden ser válidas para las pruebas de NGS basadas en RNA (2).

A diferencia de las muestras histológicas, las muestras citológicas no sufren el efecto de fijadores a base de formol o de periodos de fijación prolongados, lo que genera unos resultados moleculares con menos falsos positivos (5).

Las principales limitaciones de las muestras citológicas están relacionadas con (i) la multitud de sustratos citológicos y fijadores que requieren validación adicional, ya que la mayoría de los ensayos moleculares se desarrollan en bloques de tejido fijado en formol y embebido en parafina (FFPE), (ii) la celularidad limitada y el rendimiento de los ácidos nucleicos, especialmente cuando las células neoplásicas están presentes en una sola extensión o concentradas en pequeñas áreas del portaobjetos, (iii) cuando la muestra tiene un bajo contenido tumoral con una gran cantidad de células no neoplásicas, y (iv) problemas médico-legales si se utilizan extensiones para los análisis moleculares, sacrificándose el material para una futura revisión morfológica (6).

Algunas de estas limitaciones pueden resolverse mediante las siguientes estrategias: (i) enriquecimiento de las muestras en contenido tumoral mediante la microdisección de áreas ricas en células tumorales para optimizar las muestras de baja fracción tumoral para las pruebas moleculares; (ii) digitalización o escaneado de la muestra para usar como registro de archivo para eludir los requisitos legales; y (iii) se pueden emplear diversas preparaciones citológicas para diferentes ensayos, tales como bloques celulares o extensiones directas para análisis de mutaciones (6).

1.2. Muestras de biopsia líquida

Los ácidos nucleicos libres circulantes (cfNA) incluyen varios tipos de moléculas de DNA y RNA que están presentes en los fluidos extracelulares. Los cfNA se originan a partir de células de tejido sano, células inflamatorias o células tumorales (DNA tumoral circulante, ctDNA; RNA tumoral circulante, ctRNA) que lo liberan tras la apoptosis, necrosis o por procesos de transporte activos (7). Este último implica la formación de microvesículas (exosomas) o complejos de proteína-cfNA que hace que muestren una elevada estabilidad en los fluidos corporales (8). Aunque el cfDNA y el ctDNA son medibles en muestras de sangre, la detección del ctDNA es clínicamente más relevante que el cfDNA, que deriva tanto de tumores como de fuentes no tumorales. El ctDNA representa entre el <0,01% a 10% de cfDNA y su cantidad depende de varios factores: naturaleza del tumor primario, grado del tumor y vascularización, aclaramiento fisiológico y degradación, velocidad de liberación, y tratamiento (7). Aunque el análisis de los ácidos nucleicos circulantes se puede realizar tanto en suero como en plasma, según la revisión conjunta de la Sociedad Estadounidense de Oncología Clínica (ASCO) y el CAP, el tipo de muestra óptimo es el plasma, ya que este permite evitar la contaminación con el DNA genómico (gDNA) procedente de la lisis de los glóbulos blancos (9,10).

2. RECOMENDACIONES PREANALÍTICAS PARA MUESTRAS DE TEJIDO, CITOLÓGICAS Y MUESTRAS DE SANGRE

Las variables preanalíticas, que abarcan desde la adquisición de la muestra hasta su análisis, pueden afectar a los resultados obtenidos en los estudios moleculares (1). La implementación sistemática de procedimientos preanalíticos en la rutina

garantiza un nivel de calidad de las muestras biológicas del paciente y proporciona una mayor confianza en la veracidad de los datos del análisis (9).

2.1. Variables preanalíticas en muestras de tejido

La variabilidad metodológica, tanto en la prefijación como en la preservación del tejido, puede afectar a la calidad del procesamiento del mismo, ya que puede generar cambios en los perfiles moleculares de las células a medida que se obtienen, almacenan y procesan. Entre las principales variables a tener en cuenta se encuentran el transporte de la muestra, el tiempo de isquemia fría, así como su fijación y almacenamiento **(Tabla 1).**

2.1.1. Transporte de la muestra y tiempo de isquemia fría

Se debe establecer un procedimiento estándar para el transporte de muestras a fin de evitar errores y retrasos en el procesamiento de tejidos (1).

El tiempo de isquemia frío se define como el período transcurrido entre la obtención de la muestra y el inicio de la fijación, la cual detiene su actividad biológica. Dependiendo del tipo de biomolécula y del espécimen, este tiempo tendrá un efecto distinto sobre la calidad biomolecular, la cantidad extraíble o los resultados de las pruebas moleculares. Los datos actuales sugieren que los efectos de la isquemia son, al menos parcialmente, específicos del tipo de cáncer y biomolécula, y dependientes de la plataforma de análisis. Estudios de comparación de los efectos de la isquemia fría en el tejido tumoral y en tejido normal del mismo órgano han demostrado que el primero es más vulnerable a los efectos de la misma. Un tiempo de isquemia fría de 1 hora se considera una pauta prudente y alcanzable y está respaldado por la bibliografía (9). Es especialmente importante que este tiempo sea corto para el análisis de RNA ya que este se degrada fácilmente (1).

2.1.2. Fijación

La preservación de tejidos se puede realizar mediante su inclusión en parafina o por congelación a temperatura ultrabaja (-80°C a -190°C). La inclusión en parafina, con una fijación previa de la muestra, es el método más común para preservar y almacenar muestras de biopsia en la práctica clínica (11, 12).

Un aspecto importante es el tipo de fijador empleado, así como su mecanismo de acción, la temperatura a la que se realiza el proceso de fijación y su duración. El volumen del fijador debe ser el adecuado y depende del tamaño de la muestra (13). El formaldehído, como una solución de formol tamponada neutra al 10%, es capaz de preservar la estructura morfológica y la arquitectura de una variedad de tejidos, de ahí su estatus como el fijador más utilizado (1). Tanto la penetración como la fijación del tejido son procesos dependientes de la temperatura, ralentizándose a temperaturas más bajas y acelerándose a temperaturas más elevadas; siendo siempre la velocidad de fijación más lenta que la de penetración independientemente de la temperatura. Una fijación adecuada del tejido requiere un mínimo de 6 horas a temperatura ambiente (25°C) (9). La fijación a temperaturas superiores a la temperatura ambiente (37°C o 60°C) da lugar a la reducción en el rendimiento, la integridad y el éxito de los análisis moleculares (14).

El tiempo de fijación es un aspecto crucial, ya que la subfijación puede conducir a la degradación de ácidos nucleicos y proteínas o a un cambio en la expresión génica dentro de las regiones del tejido que no han sido permeadas por la solución fijadora, mientras que la sobrefijación puede resultar en una extensa reticulación y fragmentación del DNA, lo que dificulta la extracción de proteínas y ácidos nucleicos (1). Su duración, en el caso del formol, debe ser inferior a 72 h para evitar efectos adversos sobre la integridad y el rendimiento del DNA (14). Se considera que el tiempo adecuado para biopsias pequeñas está entre las 6h y 12h (no más de 24 horas) y 24 horas para piezas grandes con un límite de 72 horas (15). En cuanto al efecto sobre el RNA, varios estudios coinciden en que la duración óptima de la fijación para especímenes de FFPE está entre las 8h y 48h (14).

Otra variable importante a tener en cuenta es el pH. El pH es un parámetro crítico que afecta a la calidad del rendimiento de los ácidos nucleicos; el tejido fijado en formaldehído a pH bajo se caracteriza por un daño extenso del DNA en comparación con el tejido fijado en pH neutro (1).

La fijación en formol genera una serie de daños sobre los ácidos nucleicos entre los que se incluyen: (i) entrecruzamientos inducidos por el formol (*cross-linking*); (ii) fragmentación molecular; (iii) desaminación de bases de citosina que producen mutaciones de C a T; y (4) producción de sitios abásicos. Estos daños interfieren en los análisis moleculares (9). La desaminación se incrementa con el tiempo de fijación, incrementándose de forma exponencial a partir de las 48h (1).

Las muestras de biopsia de lesión ósea requieren descalcificación. La descalcificación ácida puede causar hidrólisis ácida del DNA con un tratamiento prolongado, lo que afecta negativamente al análisis molecular posterior. Por ello se recomienda el uso de agentes quelantes como el EDTA o el uso de un protocolo de descalcificación limitado que incluya un ácido débil que sea compatible tanto con la evaluación morfológica como con las pruebas moleculares sin degradar el DNA, como el ácido fórmico (16).

El uso de parafina de alta calidad que se licua a bajas temperaturas puede ayudar a evitar el daño molecular creado por las altas temperaturas. El uso de parafinas de alto punto de fusión se asocia con una desparafinización inadecuada y una menor recuperación de biomoléculas del tejido (9).

2.1.3. Almacenamiento

La mayoría de los estudios muestran que el almacenamiento en bloque de FFPE tiene un efecto limitado en el posterior análisis molecular, pudiendo afectar a la longitud del DNA amplificable. El almacenamiento de bloques de FFPE a temperatura ambiente (18°C-25°C) durante más de 3 años afecta negativamente a su posterior uso en estudios de NGS. Sin embargo, incluso el DNA extraído de bloques almacenados durante 32 años podría utilizarse con éxito en la secuenciación, aunque con menor cobertura y profundidad de lectura. En cuanto al efecto sobre el RNA los estudios indican que el RNA extraído a partir de bloques de FFPE almacenados durante más de 2 años posee una menor eficiencia a la hora de la amplificación del mRNA (RNA mensajero) ya que la fragmentación del RNA es mayor en comparación con los bloques almacenados durante un año o menos (14).

Con respecto al almacenamiento de secciones de bloques de FFPE montadas en portaobjetos, algunos estudios muestran que las tasas de éxito son superiores cuando las secciones se almacenan a temperatura ambiente durante menos de 90 días en comparación con el almacenamiento a 4°C o a -80°C. Por el contrario, otros estudios no reportan diferencias significativas entre el almacenamiento de los portaobjetos a temperatura ambiente y a 4°C (14).

La labilidad molecular es un factor importante a considerar cuando las muestras pasan mucho tiempo almacenadas, especialmente cuando se van a realizar análisis de RNA, a diferencia de lo que ocurre con el DNA y las proteínas que pueden permanecer intactos a -70°C durante largos períodos de tiempo (1).

Tabla 1. Factores preanalíticos esenciales para el análisis mediante NGS en tejido

MUESTRA DE TEJIDO	
Parámetro	**Recomendación**
Tiempo de isquemia fría	1 hora o inferior
Tiempo de fijación	6-24 horas (según tamaño espécimen)
Tipo de fijador	Formaldehído (solución tamponada neutra al 10%)
Descalcificación	EDTA, ácido fórmico
Almacenamiento	Temperatura ambiente

2.2. Variables preanalíticas en muestras citológicas

Habitualmente, se utilizan una multitud de medios de transporte y fijadores para preservar las muestras de citología desde el momento de la recolección hasta el procesamiento de la muestra. Estos permiten mantener las características morfológicas óptimas para la realización del diagnóstico y previenen la degradación de ácidos nucleicos y proteínas para ensayos moleculares. Algunos medios de transporte también pueden servir como fijadores. En general, las muestras de citología se recolectan y transportan hasta su procesamiento usando uno o más de los siguientes medios: (i) fresco (sin fijador), (ii) etanol, (iii) fijación con secado al aire, (iv) fijación por aspersión, (v) soluciones conservantes a base de alcohol, (vi) formol, (vii) solución salina estéril, (viii) solución salina tamponada con fosfato (PBS), (xix) medio del *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI), (x) medios de CBL patentados a base de alcohol como CytoLyt (*Hologic, Bedford*, MA) y CytoRich Red (*Fisher Scientific,* Reino Unido). Independientemente de las diferencias en la preparación de la muestra, los diferentes fijadores sin formol empleados proporcionan resultados superiores en términos de calidad del DNA en comparación con el material fijado con formol (6). No obstante, varios estudios han demostrado diferencias cuantitativas/cualitativas en el rendimiento y la preservación de los ácidos nucleicos según el método de recolección empleado (4).

2.3. Variables preanalíticas en muestras de sangre

Idealmente, el procesamiento de cualquier muestra de sangre debe comenzar lo más rápido posible tras su extracción (<6 horas), por lo que se debe minimizar el tiempo entre su extracción y el primer paso del procesamiento, la separación del plasma de la sangre, así como emplear tubos especiales de estabilización celular para evitar la lisis de leucocitos (9).

Los tubos de extracción de sangre pueden tener un gran impacto en la fase analítica. Los de uso más común son los tubos que contienen EDTA, que requieren un breve intervalo de tiempo entre la extracción de sangre y el procesamiento de la muestra, ya que se ha demostrado que la lisis de leucocitos que se produce después de la extracción provoca un aumento en la concentración de DNA con el tiempo (17).

Actualmente se encuentran disponibles diferentes dispositivos de recolección con reactivos conservantes que previenen la contaminación con gDNA durante su almacenamiento a temperatura ambiente e incluso a temperaturas más elevadas (10,17).

Para la obtención de cfRNA se han desarrollado tubos de extracción que contienen reactivos que inhiben la RNAasa, previenen la liberación inespecífica de RNA de fondo y que son más estables frente a fluctuaciones de temperatura (17).

Cuando se utilizan tubos con aditivos, como tubos con EDTA o tubos especiales para la estabilización celular, el nivel de llenado del tubo y el número de inversiones del mismo son factores críticos. Estos factores alteran la concentración final del aditivo en el contenido del tubo y la uniformidad de distribución del aditivo a través del contenido del tubo, respectivamente. Cualquiera de los dos factores puede alterar el rendimiento y provocar una calidad de analítico deficiente y resultados de análisis sesgados (9).

El procesamiento óptimo de la sangre es otro requisito fundamental para obtener resultados fiables. La centrifugación permite separar el suero/plasma a analizar del resto de componentes celulares de la sangre. Una velocidad inadecuada o un número inadecuado de pasos de centrifugación pueden provocar la contaminación de la muestra de plasma/suero con contenido celular. Las células suelen separarse adecuadamente del plasma mediante centrifugación de 1000g a 2000g durante 10 minutos (9). Algunos estudios sugieren que un protocolo de centrifugación en dos pasos, primero a baja velocidad y posteriormente a alta velocidad, es el método más efectivo para la separación de plasma y el posterior aislamiento de los ácidos nucleicos (9,18,19).

La temperatura de centrifugación también puede influir en la separación del plasma, por lo que varios protocolos recomiendan una doble centrifugación a 4°C. Asimismo, los tiempos de almacenamiento del plasma antes de la extracción son importantes. Se deben evitar los ciclos de congelación-descongelación que causan la degradación molecular, por ello se recomienda preparar alícuotas de las muestras de suero/plasma antes de congelarlas (9,19) **(Tabla 2).**

Tabla 2. Factores preanalíticos esenciales para el análisis mediante NGS en muestras de sangre

MUESTRA DE SANGRE	
Parámetro	**Recomendación**
Método de adquisición (tipo de tubo)	EDTA o tubos con estabilizadores celulares
Tiempo inicio procesamiento	≤6 horas para tubos EDTA, ≤48 horas para tubos con estabilizadores celulares
Método de procesado (centrifugación)	2 centrifugaciones (inicial a baja velocidad, final a alta velocidad)
Condiciones almacenamiento	≤1 ciclo congelación-descongelación

3. DETERMINACIÓN DE LA CELULARIDAD TUMORAL EN MUESTRAS DE TEJIDO Y MUESTRAS CITOLÓGICAS

El tamaño de las áreas tumorales seleccionadas y el número de células tumorales viables dentro de esas áreas determinan el rendimiento de DNA/RNA, un paso de control de calidad crítico para NGS (11). Un porcentaje tumoral bajo puede afectar a la fiabilidad de los diagnósticos moleculares, dando lugar a falsos negativos. Se puede aumentar el porcentaje de células tumorales usando métodos de macro/micro disección. La probabilidad de éxito de NGS es generalmente menor en muestras pequeñas (muestras de citología y biopsia con aguja gruesa) en comparación con muestras de resección que permiten obtener una mayor cantidad de ácidos nucleicos, pero que también pueden incluir un mayor número de células no tumorales (células inflamatorias o estromales) (1).

El porcentaje tumoral requerido para la NGS depende de la sensibilidad analítica (límite más bajo de detección) de la plataforma. La sensibilidad analítica para

las variantes de baja frecuencia es aproximadamente del 5% al 10%. Dado que la mayoría de los tumores son heterocigotos y las mutaciones somáticas suelen afectar a uno de los dos alelos de los oncogenes, la fracción tumoral mínima dentro de áreas seleccionadas debe ser, al menos, del 10% al 20% (11). Diversos estudios sugieren que el contenido mínimo de células tumorales recomendado debería ser el doble del límite de detección de la plataforma empleada. Se ha visto que la NGS puede detectar variantes de un solo nucleótido en muestras con celularidad tumoral >20%, mientras que la probabilidad de identificar alteraciones moleculares disminuye en muestras con celularidad tumoral de entre el 10-20% (20).

4. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

4.1. Extracción y almacenamiento de DNA y RNA a partir de material parafinado

El tejido parafinado constituye una fuente invaluable de material para la realización de estudios moleculares. Una vez que se han cortado las secciones del bloque de tejido, se retira la parafina que encapsula e infiltra el tejido. Este paso de desparafinización, realizado normalmente con xilol, suele ir seguido de una digestión de proteinasa K, en la que se eliminan las proteínas potencialmente contaminantes, incluida cualquier DNAasa o RNAasa que pueda estar presente. Después de la digestión con proteinasa K, los enlaces cruzados de formaldehído se pueden revertir en un paso de calentamiento, después de lo cual se purifica el DNA/RNA, generalmente con un kit comercial que utiliza una columna de sílice o tecnología de bolas magnéticas ya sea de forma automatizada o manual (21). Se ha demostrado que la desparafinización en portaobjetos es más eficaz que en tubos en términos de rendimiento e integridad del DNA/RNA. Existen alternativas al xileno para la desparafinización de tejido FFPE como el aceite mineral, hexadecano, pentadecano o tetradecano, que pueden dar rendimientos superiores de DNA/RNA. Así mismo, se ha visto que los tiempos de digestión más prolongados mejoran la calidad y cantidad de los ácidos nucleicos extraídos (22). Para la purificación de las moléculas de DNA o RNA se emplean tecnologías de unión por adsorción de sílice o bolas magnéticas. Varios estudios han abordado la importancia de la elección del método de extracción basándose en su impacto en la integridad de los ácidos nucleicos y su rendimiento posterior. Podemos optar por métodos de extracción tanto manuales como automáticos que se ha visto que generan grandes variaciones tanto en la cantidad como en la calidad de los ácidos nucleicos extraídos. Distintos estudios publicados abogan por el uso de tecnologías basadas en el uso de bolas magnéticas. Así mismo, se ha descrito la extracción simultánea del DNA y RNA. En muchos casos, la cantidad de material FFPE disponible es limitada y puede ser difícil obtener ambos tipos de ácidos nucleicos (23). Se ha propuesto que un pretratamiento del DNA extraído con uracilo DNA glicosilasa (UDG) puede minimizar el efecto de los artefactos causados por la desaminación de la citosina. Para su preservación, las muestras de DNA se deben almacenar preferiblemente por debajo de -20°C, mientras que para el RNA se recomiendan temperaturas inferiores a -70°C (2).

4.2. Extracción y almacenamiento de cfDNA y cfRNA

Uno de los principales factores preanalíticos que influyen en los análisis de cfDNA es, sin duda, la elección del método de extracción. Existe una amplia variedad de métodos basados en diferentes principios, como el aislamiento de fase, las columnas de rotación de membranas de silicio y las bolas magnéticas. El mayor desafío es la baja cantidad de cfDNA que circula en la sangre, lo que exige una sensibilidad muy alta (17).

A menudo existe un alto nivel de variabilidad entre estos métodos con respecto a la eficiencia de recuperación, la discriminación por tamaño y la reproducibilidad. Es de destacar que los métodos de extracción basados en la purificación de cfDNA utilizando bolas magnéticas parecen tener una mayor eficiencia para la recuperación de pequeños fragmentos de cfDNA (50-250 pb) en comparación con los basados en la unión de cfDNA a membranas de sílice. La evidencia acumulada muestra que el ctDNA a menudo está enriquecido en fragmentos cortos de cfDNA (<166 pb), mientras que las moléculas de cfDNA de tipo salvaje tienden a ser más grandes. Por tanto, la sensibilidad del ctDNA del análisis mutacional puede mejorarse mediante la selección de un método de extracción de DNA que favorezca un alto rendimiento y esté sesgado hacia el aislamiento de fragmentos de DNA más cortos (es decir, <166 pb). Por el contrario, el análisis cuantitativo de cfDNA en un entorno comparativo (por ejemplo, medir la fluctuación de los niveles de cfDNA a lo largo del tiempo) puede requerir la selección de un método de aislamiento de cfDNA que renuncie a una alta recuperación a favor de una alta reproducibilidad y un sesgo de tamaño mínimo. De manera similar, mientras que los métodos automatizados de extracción de cfDNA generalmente muestran una menor eficiencia de recuperación que los métodos manuales, son ideales para condiciones de alta capacidad cuando una alta recuperación no es esencial (19).

Las condiciones para el almacenamiento a corto y largo plazo del cfDNA extraído influyen en su concentración, tamaño (fragmentación) y pureza. Para fines de cuantificación y análisis de fragmentación, se recomienda el almacenamiento a -20°C durante períodos inferiores a 3 meses, mientras que, para los análisis de mutaciones, los extractos de cfDNA se pueden utilizar hasta 9 meses después del almacenamiento a -20°C u -80°C. En contraste con las muestras de plasma, se ha visto las muestras de cfDNA extraídas permanecían estructuralmente sólidas y que mostraban concentraciones sin cambios después de tres rondas de congelación-descongelación (19).

El RNA es mucho más frágil que el DNA y propenso a la degradación por las RNAasas. Los factores que limitan el uso de cfRNA en un entorno clínico incluyen la degradación de cfRNA y el aumento del RNA derivado de leucocitos que puede dificultar la detección de objetivos expresados en niveles bajos (17).

4.3. Determinación de la calidad y cantidad de los ácidos nucleicos

La cantidad de DNA requerida para NGS depende de la plataforma, el tamaño del panel de genes y el método de enriquecimiento. A diferencia de los ensayos basados en DNA, donde la cantidad del mismo es fundamental para obtener buenos resultados, el éxito de la NGS basada en RNA depende de la calidad del RNA (11).

Para su uso en NGS es necesario llevar a cabo una determinación de la calidad y cantidad de los ácidos nucleicos de partida. Los métodos más comunes para la cuantificación de los mismos son la espectrofotometría, la fluorometría y la qPCR (PCR cuantitativa) (24). La espectrofotometría permite medir de una forma simple y ágil la concentración global de ácidos nucleicos de alta calidad, sin embargo, no puede medir el daño molecular y la fragmentación causados por la fijación, la inclusión y/o el almacenamiento a largo plazo, ni puede anticipar los efectos sobre la PCR. Esta técnica es susceptible a mediciones erróneas por la presencia de contaminantes como disolventes orgánicos usados en los procesos de extracción y tiende a sobreestimar la cantidad de ácidos nucleicos de partida ya que no permite diferenciar entre DNA y RNA o nucleótidos libres, por lo que no se recomienda su uso en la NGS (24,25).

Los métodos fluorométricos de cuantificación de ácidos nucleicos ofrecen alta sensibilidad analítica, alto rendimiento y una mejor tolerancia a los contaminantes. Se basa en el uso de fluoróforos específicos para el DNA de doble cadena y el RNA (24). Sin embargo, este método no es capaz de determinar la calidad del DNA/RNA de partida, impidiendo la realización de ajustes en la cantidad de los ácidos nucleicos de partida para compensar una mala calidad de la muestra (25).

La qPCR se utiliza ampliamente para la expresión génica, determinación de mutaciones y varios análisis de genotipado. El ensayo qPCR TaqMan (*Thermo Fisher Scientific*) es el que se emplea más comúnmente y se basa en el uso de cebadores de PCR no marcados y una sonda marcada con fluorescencia. Otro método frecuentemente utilizado es un ensayo qPCR basado en SYBR-Green. El SYBR-Green también se une preferentemente al DNA de doble cadena (dsDNA) y se ha utilizado ampliamente para varios ensayos de qPCR. A diferencia de los ensayos TaqMan, no se requiere una sonda fluorescente específica, por lo tanto, es un método más barato y proporciona una mayor flexibilidad en el diseño del ensayo (26).

Para la determinación de la calidad y cantidad de los ácidos nucleicos podemos usar la TapeStation o el Bioanalyzer (*Agilent Technologies*). Ambos sistemas nos permiten el cálculo del RIN (número de integridad del RNA) que va desde 1 (degradado) a 10 (intacto). El RNA es más susceptible que el DNA a la degradación, cuando este se degrada la cantidad de RNA ribosómico 18S y 28S disminuye mientras que aumenta la cantidad de fragmentos más pequeños. Para la determinación de la calidad del DNA la TapeStation nos permite el cálculo del DIN (número de integridad del DNA) cuyos valores van del 1 (degradado) al 10 (intacto) (22,27).

Con respecto a la cuantificación del rendimiento de cfDNA/cfRNA, se ha visto que los métodos de cuantificación basados en PCR o en PCR digital (ddPCR) proporcionan una medición más precisa de las moléculas de DNA/RNA amplificables (es decir, intactas), que la cuantificación basada en fluoróforos (28). Si los parámetros de calidad de los ácidos nucleicos indican una degradación importante, la interpretación de los resultados debería hacerse con cautela.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ascierto PA, Bifulco C, Palmieri G, *et al*. Preanalytic Variables and Tissue Stewardship for Reliable Next-Generation Sequencing (NGS) Clinical Analysis. J Mol Diagn. 2019 Sep;21(5):756-767.

2. Kofanova O, Bellora C, Garcia Frasquilho S, *et al*. Standardization of the preanalytical phase of DNA extraction from fixed tissue for next-generation sequencing analyses. N Biotechnol. 2020 Jan 25;54:52-61.

3. Balla A, Hampel KJ, Sharma MK, *et al*. Comprehensive validation of cytology specimens for next-generation sequencing and clinical practice experience. J Mol Diagn. 2018 Nov;20:812-821.

4 Roy-Chowdhuri S, Pisapia P, Salto-Tellez M, *et al*. Invited review-next-generation sequencing: a modern tool in cytopathology. Virchows Arch. 2019 Jul;475(1):3-11.

5. Pisapia P, Pepe F, Iaccarino A, *et al*. Next Generation Sequencing in Cytopathology: Focus on Non-Small Cell Lung Cancer. Front Med (Lausanne). 2021 Feb 11;8:633923.

6. Santos GC, Saieg MA. The Cytology Specimen and Preparations: Advantages and Limitations. En: Roy-Chowdhuri S, Vanderlaan PA, Stewart JM, Santos GC, editores. Molecular Diagnostics in Cytopathology. Springer, 2019. p: 23-38.

7. Gobbini E, Swalduz A, Levra MG, *et al*. Implementing ctDNA Analysis in the Clinic: Challenges and Opportunities in Non-Small Cell Lung Cancer. Cancers (Basel). 2020 Oct 24;12(11):3112.

8. Szilágyi M, Pös O, Márton É, *et al*. Circulating Cell-Free Nucleic Acids: Main Characteristics and Clinical Application. Int J Mol Sci. 2020 Sep 17;21(18):6827.

9. Compton CC, Robb JA, Anderson MW, *et al*. Preanalytics and Precision Pathology: Pathology Practices to Ensure Molecular Integrity of Cancer Patient Biospecimens for Precision Medicine. Arch Pathol Lab Med. 2019 Nov;143(11):1346-1363.

10. Merker JD, Oxnard GR, Compton C, *et al*. Circulating Tumor DNA Analysis in Patients With Cancer: American Society of Clinical Oncology and College of American Pathologists Joint Review. J Clin Oncol. 2018 Jun 1;36(16):1631-1641.

11. Chen H, Luthra R, Goswami RS, *et al*. Analysis of pre-analytic factors affecting the success of clinical next-generation sequencing of solid organ malignancies. Cancers (Basel). 2015 Sep;7(3): 1699-1715.

12. Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. Am J Pathol. 2002 Dec;161(6):1961-1971.

13. Dietel M, Bubendorf L, Dingemans AMC, *et al*. Diagnostic procedures for non-small-cell lung cancer (NSCLC): recommendations of the European Expert Group. Thorax. 2016 Feb;71(2):177-84.

14. Agrawal L, Engel KB, Greytak SR, *et al*. Understanding preanalytical variables and their effects on clinical biomarkers of oncology and immunotherapy. Semin Cancer Biol. 2018 Oct;52(Pt 2):26-38.

15. Arreaza G, Qiu P, Pang L, *et al*. Pre-analytical considerations for successful next- generation sequencing (NGS): challenges and opportunities for formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissue (FFPE) samples. Int J Mol Sci. 2016 Sep;17:1579.

16. De Las Casas LE, Hicks DG. Pathologists at the Leading Edge of Optimizing the Tumor Tissue Journey for Diagnostic Accuracy and Molecular Testing. Am J Clin Pathol. 2021 May 18;155(6):781-792.

17. Salvianti F, Gelmini S, Costanza F, *et al*. The pre-analytical phase of the liquid biopsy. N Biotechnol. 2020 Mar 25;55:19-29.

18. Trigg RM, Martinson LJ, Parpart-Li S, Shaw JA. Factors that influence quality and yield of circulating-free DNA: A systematic review of the methodology literature. Heliyon. 2018 Jul 25;4(7):e00699.

19. Ungerer V, Bronkhorst AJ, Holdenrieder S. Preanalytical variables that affect the outcome of cell-free DNA measurements. Crit Rev Clin Lab Sci. 2020 Nov;57(7):484-507.

20. Lazzari C, Bulotta A, Cangi MG, *et al*. Next Generation Sequencing in Non-Small Cell Lung Cancer: Pitfalls and Opportunities. Diagnostics (Basel) 2020 Dec 15;10(12):1092.

21. McDonough SJ, Bhagwate A, Sun Z, *et al*. Use of FFPE-derived DNA in next generation sequencing: DNA extraction methods. PLoS One. 2019 Apr 11;14(4):e0211400.

22. Frazer Z, Yoo C, Sroya M, *et al*. Effect of Different Proteinase K Digest Protocols and Deparaffinization Methods on Yield and Integrity of DNA Extracted From Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tissue. J Histochem Cytochem. 2020 Mar;68(3):171-184.

23. Kresse SH, Namløs HM, Lorenz S, *et al*. Evaluation of commercial DNA and RNA extraction methods for high-throughput sequencing of FFPE samples. PLoS One. 2018. 13(5):e0197456.

24. Kumar D, Panigrahi MK, Suryavanshi M, *et al*. Quantification of DNA Extracted from Formalin Fixed Paraffin-Embeded Tissue Comparison of Three Techniques: Effect on PCR Efficiency. J Clin Diagn Res. 2016 Sep;10(9):BC01-BC03.

25. Sah S, Chen L, Houghton J, *et al*. Functional DNA quantification guides accurate next-generation sequencing mutation detection in formalin-fixed, paraffin-embedded tumor biopsies. Genome Med. 2013 Aug 30;5(8):77.

26. Dang J, Mendez P, Lee S, *et al*. Development of a robust DNA quality and quantity assessment qPCR assay for targeted next-generation sequencing library preparation. Int J Oncol. 2016 Oct;49(4):1755-65.

27. Esteva-Socias M, Artiga MJ, Bahamonde O, *et al*. In search of an evidence-based strategy for quality assessment of human tissue samples: report of the tissue Biospecimen Research Working Group of the Spanish Biobank Network. J Transl Med. 2019 Nov 12;17(1):370.

28. Tsui DWY, BRNAett E, Scher HI. Toward Standardization of Preanalytical Procedures for Cell-Free DNA Profiling. Clin Chem. 2020 Jan 1;66(1):3-5.

1. PLATAFORMAS

Cuando se habla de secuenciación masiva, es muy importante hacer hincapié en que la tecnología de secuenciación y la plataforma están estrechamente vinculadas y esto a su vez dependerá del diseño o tipo de prueba que se quiera realizar en base a qué tipo de alteración se desee detectar. Debido a esto, existen distintos aspectos que hay que tener en cuenta para elegir la opción tecnológica que más se ajuste a nuestros propósitos y necesidades. Estos aspectos suelen ser (1):

- La longitud media de lectura de las secuencias nucleotídicas de interés que pueden ser largas o cortas.
- El método de secuenciación que incluye: a) la secuenciación de extremo único, en el cual los fragmentos de DNA se secuencian en un solo extremo (*single-end sequencing*); b) la secuenciación de ambos extremos del fragmento con lecturas pareadas (*paired-end sequencing*).
- El método para la preparación y el enriquecimiento de las librerías basados en captura de híbridos (a través de sondas específicas que serán complementarias a las regiones de interés) o mediante amplicones (gracias a una reacción comparable con una PCR múltiple) como se puede observar en la **Figura 1.**
- La tecnología de secuenciación empleada diferenciando principalmente la secuenciación mediante ligación (*Sequencing By Ligation* – SBL) o la secuenciación mediante síntesis (*Sequencing By Synthesis* – SBS).
- La secuenciación mediante síntesis a su vez se puede diferenciar en dos tipos: a) SBS con terminadores fluorescentes reversibles (*Cyclic Reversible Termination* – CRT) utilizada por distintas plataformas como, por ejemplo, los equipos de las empresas Illumina© o Qiagen©; b) SBS mediante la adición de un único nucleótido (*Single-Nucleotide Addition* – SNA) utilizada por algunas plataformas, entre ellas, los equipos de la empresa LifeTechnologies.

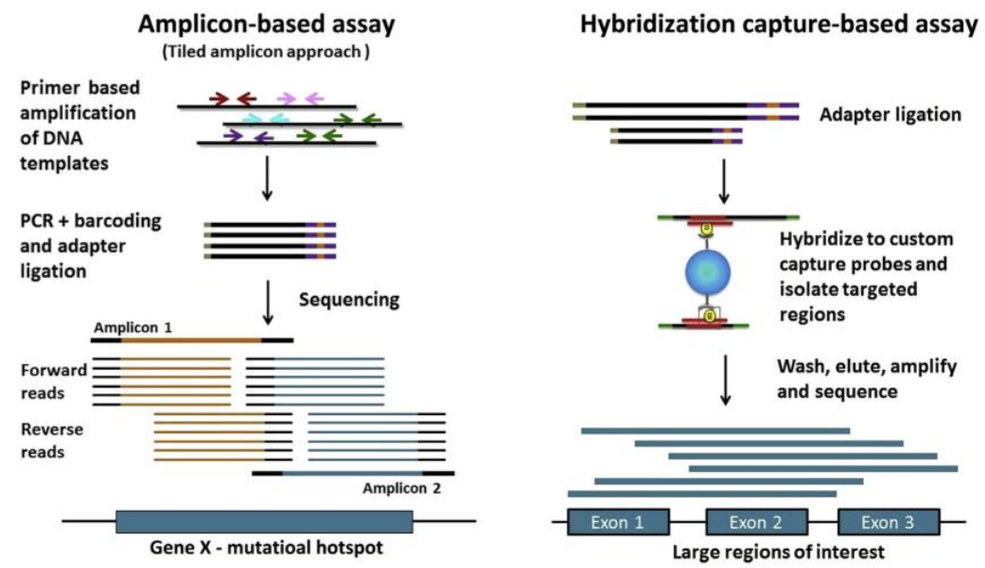


Figura 1. Diferencias entre la preparación basada en captura de híbridos o mediante amplicones adaptado de Jennings LL, *et al*. J Mol Diagn. 2017.(2)

De manera resumida, la SBS-CRT consiste en una amplificación mediante puentes de moléculas DNA de cadena sencilla, desnaturalizadas, que se unen a una superficie sólida (*flow cell*) y que, tras la amplificación, darán lugar a clústeres (2). Las dos hebras se separan mediante un proceso de desnaturalización y puede comenzar un nuevo ciclo de amplificación en puente tal y como se puede observar en la **Figura 2**. Posteriormente, durante cada ciclo de secuenciación se producen tres pasos: incorporación, visualización y escisión donde, a diferencia de los didesoxinucleótidos utilizados en la secuenciación por Sanger (terminadores de cadena), mediante esta tecnología se utilizan terminadores reversibles. Esto permite que la elongación de la cadena se pare temporalmente tras la incorporación de cada nucleótido, pero tras la visualización se reanuda la síntesis (1).

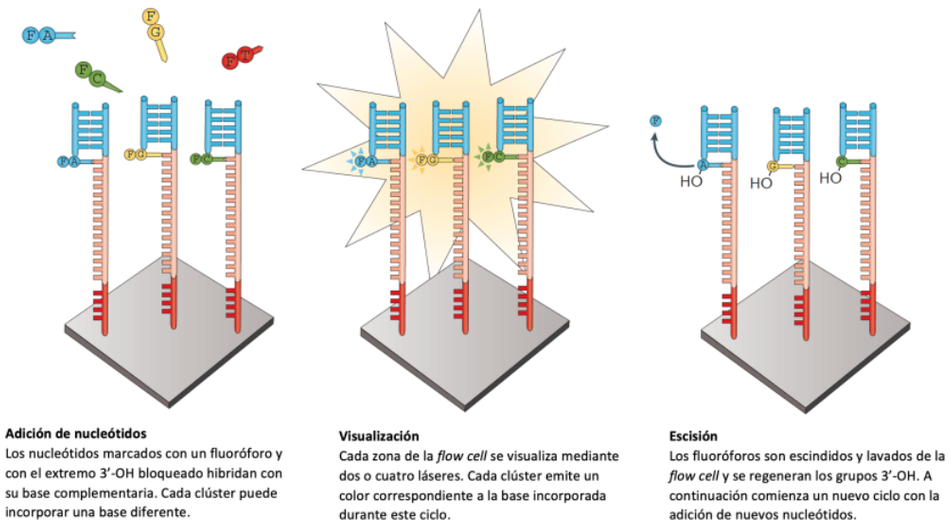


Figura 2. Secuenciación por síntesis con terminadores fluorescentes reversibles (SBS-CRT), adaptado de Goodwin S, *et al*. Nat Rev Genet. 2016.(1)

En la SBS-SNA, la secuenciación de la región de interés se basa en la incorporación y detección de cada dNTP incorporado de manera individual evitando la necesidad de bloquear los dNTP, puesto que al incorporarse de forma individual cada dNTP en la reacción se impide la elongación de la hebra en crecimiento al no estar presentes el resto de dNTP. En el caso por ejemplo del abordaje tecnológico Ion Torrent™, cada vez que se incorpora un nucleótido a la hebra molde, se libera un ion hidrógeno (H^+). A medida que se añaden nucleótidos (liberados de forma secuencial), el pH cambia reflejándose en un pico de voltaje **(Figura 3).** De esta forma, el número de iones liberados es proporcional al número de eventos de incorporación. Cuando se incorporan dos nucleótidos idénticos, se liberan dos iones de hidrógeno y la señal de lectura también es el doble (1).

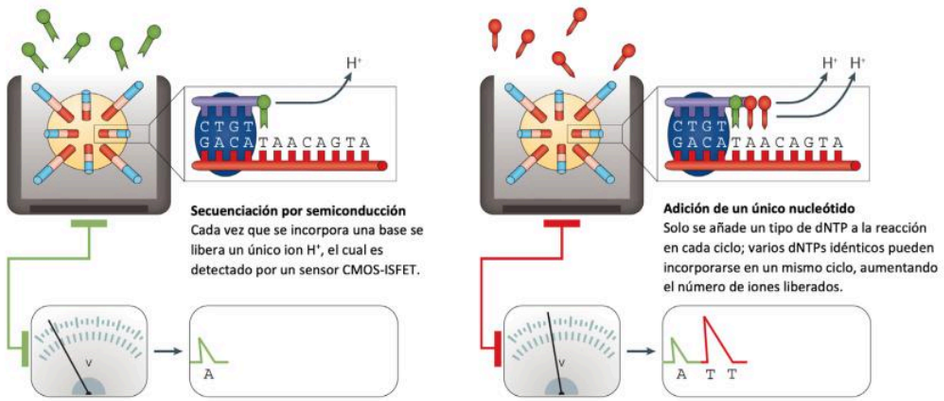


Figura 3. Secuenciación por síntesis mediante la adición de un único nucleótido (SBS-CNA), adaptado de Goodwin S, *et al*. Nat Rev Genet. 2016.(1)

La secuenciación mediante síntesis, bien sea con terminadores fluorescentes reversibles o mediante la adición de un único nucleótido, sobre todo debido a que en la actualidad son las dos metodologías que se han implementado principalmente en los laboratorios clínicos, tiene ventajas e inconvenientes como se puede observar en la **Tabla 3**. Cabe destacar que estudios previos han observado que existe una alta concordancia en la identificación de variantes mediante la tecnología SBS-CRT o SBS-CNA aunque, por un lado, los datos presentes en la literatura indican que para la detección de variantes con una frecuencia alélica comprendida entre el 5-10% habría que establecer una mayor profundidad de cobertura en el caso de la tecnología basada en terminadores fluorescentes reversibles, y por otro lado, en el caso de la tecnología basada en la adición de un único nucleótido si bien es cierto que el uso de amplicones disminuye tanto la cantidad de ácidos nucleicos necesaria para la secuenciación como el tiempo que se tarda en obtener los resultados, el empleo de este abordaje podría llegar a sesgar la información alélica observada. En cuanto a la detección de CNAs, ambos métodos presentan limitaciones, especialmente si la heterogeneidad tumoral es elevada o si existe un bajo porcentaje de células tumorales (2,3).

Tabla 3. Comparativa entre las tecnologías basadas en SBS-CRT y SBS-CNA. (Fuente propia Martín M, Biscuola M).

	TECNOLOGÍA	
VALORACIÓN	SBS-CRT	SBS-SNA
VENTAJAS	• Mayor valor predictivo positivo en la detección de SNVs, indels • Bajo número de falsos positivos • Secuenciación de librerías foramdas a partir de captura de híbridos y ampliaciones • Posibilidad de realizar la secuenciación en un único sentido o en ambos sentidos *(single-end y piared-end sequencing)* • Elevado número de lecturas por carrera (400-800 millones)	• Mayor sensibilidad en la detección de SNVs, indels • Duración corta de la carrera de secuenciación (2-4 horas) • Lectura de fragmentos largos (200-400 pb)
DESVENTAJAS	• Fragmentos de lectura más cortos (75-150 pb) • Duración de la carrera de secuenciación más larga (11-29 horas)	• Mayor número de falsos positivos, especialmente en homopolímeros • Secuenciación de librerías formadas únicamente a partir de ampliaciones • Menor número de lecturas por cada carrera (2-80 millones)

Existen otros aspectos prácticos que hay que considerar antes de implementar la secuenciación masiva que podrían condicionar la elección de la tecnología, de la plataforma o del tipo de estudio que se quiere realizar, así como el precio final por muestra secuenciada (2,4), como son:

1. Región de interés y alteraciones que queremos estudiar: este punto influye directamente sobre el tamaño de nuestro panel y este aspecto influye directamente sobre el número de muestras que podríamos procesar en paralelo
2. Acerca de las alteraciones moleculares en estudio, en el caso de fusiones génicas conocidas y que representan posibles dianas terapéuticas, los datos presentes en la literatura sugieren que sería recomendable realizar el estudio a partir de RNA debido, entre otros aspectos, a una mayor sensibilidad de detección y a una menor complejidad del análisis bioinformático primario y secundario
3. Número y tipo de muestras que queremos procesar o, dicho de otra manera, número de librerías por carrera que se podrán cargar juntas para ser secuenciadas en una misma carrera (*"multiplexing"*)
4. Tiempos de respuesta en función de la utilidad clínica (biomarcadores diagnósticos, pronósticos, predictivos)
5. Estudios de alteraciones somáticas o germinales: este punto condicionará la profundidad de cobertura (el número de veces que un determinado nucleótido tiene que ser leído) que necesitamos para las regiones de interés; en general, para las alteraciones somáticas necesitamos más profundidad comparado con las alteraciones germinales debido a la presencia de subclones en el tumor en estudio
6. Capacidad de secuenciación, entendida como la cantidad de lecturas totales que genera el secuenciador por cada carrera
7. Longitud de los fragmentos que queremos secuenciar y el tipo de lectura que queremos para las regiones de interés en función del tipo de alteraciones y muestras que queremos estudiar

Aunque estos puntos se hayan desglosado de forma resumida y separada, en realidad están todos vinculados y condicionan totalmente la elección del mejor abordaje tecnológico por parte del laboratorio, así como condicionarán la puesta a punto, la validación analítica y clínica de la metodología, de la plataforma y del panel de genes o regiones antes de la implementación en la rutina clínica.

2. PROCESO DE VALIDACIÓN Y/O VERIFICACIÓN DE LA NGS

Como en el caso de otras determinaciones que se realizan en los laboratorios clínicos, para la realización de los estudios mediante secuenciación masiva, existen soluciones comerciales y soluciones personalizadas. La principal ventaja de los paneles comerciales es que no requieren una etapa de diseño previa y ya están optimizados por el propio fabricante, aunque requieren un proceso de verificación y/o validación por parte de cada laboratorio antes de su implementación en la rutina clínica. En cambio, las soluciones personalizadas requieren un trabajo previo de selección de genes y/o regiones y un diseño de los *primers*/sondas correspondientes que suele traducirse en un proceso largo (generalmente de varios meses) de optimización y validación del propio diseño (5). Hoy en día las soluciones comerciales suelen ofrecer muchas opciones y alternativas que se adaptan a las necesidades clínicas y, en general, son los que se utilizan en la gran mayoría de los laboratorios que se dedican a la actividad asistencial. Debido a esto, nos centraremos en los aspectos de verificación y/o validación de estas soluciones comerciales.

2.1. Verificación y/o validación

Los procesos de verificación y/o validación, fundamentales y obligatorios antes la implementación de cualquiera nueva determinación o metodología, suelen ser confundidos y usados en algunas ocasiones como sinónimos; sin embargo, presentan claras diferencias entre si detalladas a continuación:

- La verificación es el procedimiento que comprueba y asegura que las especificaciones técnicas y analíticas predefinidas acerca del desempeño y empleo del kit elegido se cumplan en el entorno (en este caso en el laboratorio) tal y como indicado por el propio fabricante y por lo tanto permite comprobar que el test funciona correctamente. Este proceso aplica a todo los métodos o kits comerciales que posean un marcado IVD/IVDR (2,4,6)
- La validación requiere definir cuáles son las especificaciones técnicas y analíticas acerca del desempeño y empleo de un determinado kit comercial sin marcado IVD/IVDR y generar evidencias que demuestren que las características del test son adecuadas y conformes a lo esperado: la precisión del test, las limitaciones, la sensibilidad, la especificidad y cómo proceder con resultados no esperados o indefinidos, son algunos de los aspectos para los cuales hay que generar evidencias antes de considerar que un test está correctamente validado. Estos criterios dependen del tipo de utilidad y aplicación del test a validar y este aspecto tiene que ser definido antes de empezar la validación (2,4,6)

Tal y como se puede observar en el esquema indicado en la **Figura 4,** existen guías y recomendaciones que siguen, entre otros, los requerimientos para la acreditación de un determinado kit, metodología o técnica según la norma UNE-EN ISO 15189:2013.

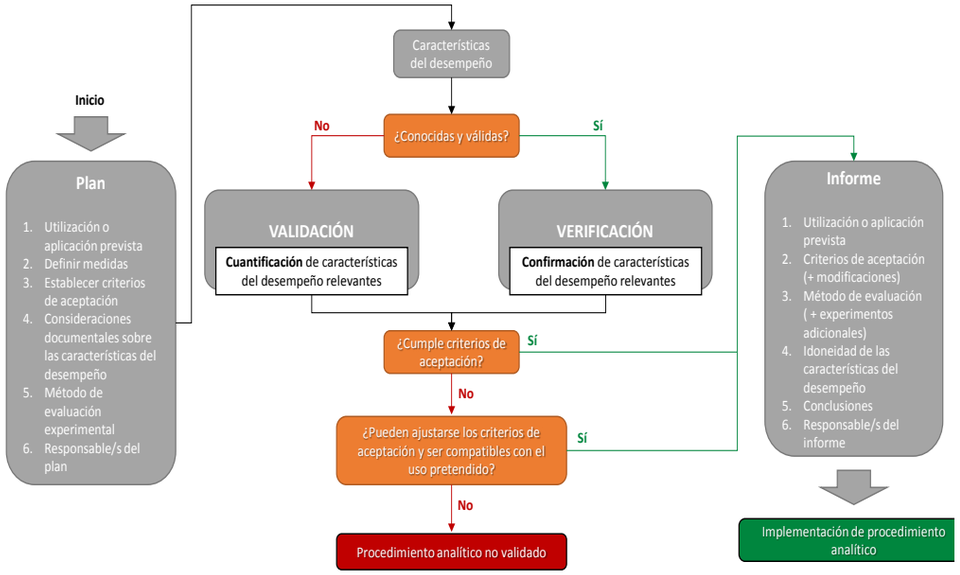


Figura 4. Esquema adaptado por Carmona F y Biscuola M de Roelofsen-de Beer R, *et al*. Clin Chem Lab Me. 2020. (7)

2.2. Validación de la tecnología de secuenciación masiva

Para el desarrollo e implantación clínica de un nuevo test de diagnóstico molecular mediante secuenciación masiva, y debido a que la mayoría de los kits comerciales no poseen un marcado IVD/IVDR para todos los distintos pasos de esta metodología (preparación librerías, secuenciación, bioinformática, interpretación e informes), normalmente antes de implementar estos estudios, el laboratorio se verá obligado a validar la tecnología y la solución comercial elegida. La validación, tal y como indicados en distintos artículos, constará de dos fases: una validación técnica y una validación clínica.

2.3. Validación técnica

El objetivo de esta fase es conocer todos los aspectos metodológicos relacionados con el test, como por ejemplo los distintos pasos del protocolo, cuáles y cómo están cubiertas las regiones en estudio, las limitaciones de la solución elegida, la reproducibilidad y fiabilidad de los resultados, entre otros (2-4,6). Durante esta fase será necesario estimar:

- Número y tipo de muestras
- Tipo de variantes que se quieren estudiar (variantes de nucleótidos simples - SNVs, small indels, large indels, alteraciones en el número de copias - CNAs, variantes de estructura - SVs)
- Sensibilidad
- Especificidad
- Reproducibilidad
- Valores normales de referencia
- Límite de detección
- Sustancias que puedan interferir o artefactuar los resultados
- Resultados inesperados o no valorables
- Validación del análisis bioinformático (definiendo pipelines específicos si necesario)
- Redacción del informe

Hay que tener en cuenta algunas consideraciones adicionales relacionadas con cada uno de estos apartados. El número de muestras es un punto clave que a menudo es difícil definir o estimar y debería a priori tener en cuenta el número de alteraciones, regiones o genes que se quieren analizar y la población en estudio. En el artículo de Jennings LJ, *et al*. (2) se describe la fórmula matemática y los parámetros a considerar. Conocer la tipología de muestras a estudiar también es un factor crucial (sangre, plasma, tejido fresco, congelado, fijado en formol e incluido en parafina) así como si procesaremos muestras de pulmón, mama, cerebro, etc. (2,4). Por último, se seleccionarán muestras que nos permitan testar las alteraciones que queremos validar por lo tanto sería recomendado tener muestras control retrospectivas o muestras comerciales con alteraciones conocidas y bien caracterizadas. Si el test incluye alteraciones en el número de copias (CNAs) es importante incluir tanto muestras procedentes de mujeres como hombres. La generación de las librerías y secuenciación de las mismas se llevará a cabo siguiendo el protocolo del fabricante. Sería recomendable realizar réplicas técnicas (secuenciar dos veces la misma librería en el mismo instrumento; secuenciar dos librerías de la misma muestra hechas por dos operadores diferentes) y biológicas (secuenciar dos librerías hechas a partir del mismo DNA; secuenciar dos librerías de dos extracciones de ADN de la misma muestra) (2-4,6).

El análisis informático es parte integrante para la correcta interpretación de las regiones secuenciadas y por lo tanto tiene también que ser validado de forma exhaustiva. Hay que tener en cuenta que distintos proveedores de soluciones comerciales nos ofrecen software de análisis comerciales específicamente diseñados para los análisis primarios, secundarios y, en algunas ocasiones terciarios, de los datos obtenidos. A pesar de esto, el laboratorio tendrá que familiarizarse y validar los análisis ofrecidos, revisar los resultados mediante visores genómicos, comprobar si todas las alteraciones conocidas y caracterizadas son efectivamente detectadas y reportadas a través de estos softwares. Junto a esto, cada nueva versión de los softwares comerciales tendrá que volver a ser validada analizando muestras previamente estudiadas y comparando los resultados obtenidos.

2.4. Validación clínica

El desempeño analítico de una determinada solución, personalizada o comercial, no necesariamente predice la utilidad del test a nivel clínico. La variabilidad biológica intrínseca de una determinada patología tendrá un impacto altamente elevado sobre la sensibilidad y especificidad clínica del test elegido mediante secuenciación masiva planteando distintos escenarios: a) la misma alteración molecular se podría detectar en más de una patología o neoplasia pero su significado clínico podría variar exactamente por el contexto clínico-patológico (las alteraciones del gen *EGFR* en los carcinomas no microcíticos de pulmón no tienen la misma utilidad clínica que las que se detectan en los gliomas, por ejemplo); b) la necesidad de detectar más de una alteración en el mismo tumor, pero estas alteraciones podrían representar SNVs, CNAs, o SVs; c) determinadas alteraciones consideradas como patogénicas en una neoplasia también podrían ser identificada en una población control (2,6).

En esta fase de validación por lo tanto habría que contestar a algunas de las siguientes preguntas:

- ¿Cuál va a ser la principal utilidad de este panel?
- ¿Necesitamos realizar un estudio de biomarcadores pronósticos, diagnósticos o predictivos?
- ¿Necesitamos un test apto para distintas enfermedades/neoplasias o para alguna en concreto?
- ¿Qué tiempo de respuesta se espera para que los resultados puedan ser útiles?

La secuenciación masiva dirigida o *"targeted"* (en el lenguaje más coloquial entendida como NGS mediante paneles de genes), a través del estudio de regiones *hot-spots* por ejemplo, podría ser suficiente para dar respuestas clínicas para el estudio de los biomarcadores predictivos más comunes y asociados a terapias dirigidas, ofreciendo una elevada especificidad clínica pero una baja sensibilidad clínica si, por ejemplo, lo que estamos buscando es una solución para el estudio de biomarcadores diagnósticos. Una solución que estudie únicamente SNVs también podría ofrecernos una elevada especificidad clínica pero nuevamente una baja sensibilidad clínica debido a la pérdida de información relacionada con otras alteraciones (CNAs y SVs). Teniendo en cuenta todos estos aspectos, será fundamental elegir adecuadamente las patologías y por lo tanto las muestras que serán empleadas para todo el proceso de validación y será importante que los resultados obtenidos sean trasladados adecuadamente a los peticionarios de estos estudios para conocer el correcto enfoque clínico del test implementado (2-4,6).

BIBLIOGRAFÍA

1. Goodwin S, *et al*. Coming of age: ten years of nextgeneration sequencing technologies. Nat Rev Genet. 2016 May 17;17(6):333-51.

2. Jennings LJ, *et al*. Guidelines for Validation of Next-Generation Sequencing Based Oncology Panel - A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists. J Mol Diagn. 2017 May;19(3):341-365.

3. Hung SS, *et al*. Assessment of Capture and Amplicon-Based Approaches for the Development of a Targeted Next-Generation Sequencing Pipeline to Personalize Lymphoma Management. J Mol Diagn. 2018 Mar;20(2):203-214.

4. Deans ZC, *et al*. Integration of next-generation sequencing in clinical diagnostic molecular pathology laboratories for analysis of solid tumours; an expert opinion on behalf of IQN Path ASBL. Virchows Arch. 2017 Jan;470(1):5-20.

5. Cree IA, *et al*. Guidance for laboratories performing molecular pathology for cancer patients. J Clin Pathol. 2014 Nov;67(11):923-31.

6. Kadri S, *et al*. Clinical Validation of a Next-Generation Sequencing Genomic Oncology Panel via Cross-Platform Benchmarking against Established Amplicon Sequencing Assays. J Mol Diagn. 2017 Jan;19(1):43-56.

7. Roelofsen-de Beer R, *et al*. Validation and verification of examination procedures in medical laboratories: opinion of the EFLM Working Group Accreditation and ISO/CEN standards (WG-A/ISO) on dealing with ISO 15189:2012 demands for method verification and validation. Clin Chem Lab Me. 2020 Feb 25;58(3):361-367.

1. ASPECTOS QUE DEBE INCLUIR EL INFORME DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DEL CÁNCER DE PULMÓN NO MICROCÍTICO BASADO EN SECUENCIACIÓN MASIVA

1.1. Introducción

En el contexto asistencial del diagnóstico molecular del cáncer de pulmón no microcítico avanzado, un informe de resultados de secuenciación masiva o *next-generation sequencing* (NGS) es un documento formal específico del laboratorio al oncólogo remitente y/u otros profesionales sanitarios, con respecto a los resultados y la interpretación de los genes estudiados (1). Este informe de resultados requiere una consideración particular dado que el uso apropiado de un perfil molecular respalda la medicina de precisión y ofrece nuevas opciones de tratamiento para los pacientes oncológicos.

El objetivo principal de los informes debe ser proporcionar una respuesta clara y precisa, sin ambigüedad, asegurando siempre una transcripción fidedigna de los resultados y completamente interpretativa a la petición clínica. Sin embargo, la complejidad del diagnóstico molecular mediante secuenciación masiva convierte el proceso de informar en un verdadero reto para los laboratorios de patología molecular. La falta de uniformidad en la estructura de los informes y en la terminología utilizada, así como los diferentes sistemas de gestión de información entre los laboratorios, se definen como las principales limitaciones identificadas en el proceso de estandarización (2).

Existe una necesidad urgente de armonizar la práctica de informar el diagnóstico molecular del CPNM avanzado basado en secuenciación masiva o NGS para mejorar la comunicación entre biólogos, patólogos, oncólogos y resto de clínicos implicados, de modo que todos estén capacitados para utilizar e interpretar adecuadamente las pruebas del diagnóstico molecular, sus resultados y los tratamientos asociados (3,4).

Con el propósito de ayudar a los laboratorios dedicados a tal desempeño y a los diferentes especialistas clínicos implicados en el acceso a la información molecular y la interpretación de los resultados en el diagnóstico molecular del CPNM avanzado, se ha desarrollado el siguiente apartado que recoge los aspectos principales y recomendaciones en la elaboración de un informe de resultados mediante NGS. Debe tenerse en cuenta que la interpretación y el informe de los resultados de NGS no son fundamentalmente diferentes de otros resultados genéticos, y el informe debe coincidir con los estándares de buenas prácticas que ya existen para otras pruebas clínicas (5).

1.2. Estructura y contenido de los informes

1.2.1. Método de presentación de informes. Formato, estilo, medios y lenguaje

Existen numerosas recomendaciones con respecto al estilo y la estructura de los informes clínicos de estudios genéticos (6-9). Seguir un formato recomendado y aceptado por las guías de práctica clínica ayuda a garantizar que los informes estén estructurados de forma eficaz (10). Los laboratorios deben evaluar las necesidades de los usuarios a la hora de determinar el formato, el estilo, los medios de comunicación y el lenguaje de los informes de las pruebas de genética molecular (11).

Se recomienda tener en cuenta la longitud del informe y su estructura de manera que incite a los usuarios a leer el informe completo. Los informes largos no se suelen leer en su totalidad prefiriéndose los informes de una sola página. Sin embargo, en el caso de los informes clínicos generados a partir de estudios de NGS, este propósito resulta difícil de conseguir. Cuando los informes tienen más de una página, desde un punto de vista práctico, se debe resumir la identificación y el diagnóstico del paciente, una breve descripción de la prueba realizada, un resumen de los resultados y los principales hallazgos con su interpretación/conclusión correspondiente, en la primera página (12); adicionalmente, la Norma UNE-EN ISO 15189:2013 (en adelante Norma ISO 15189) establece que cada una de las páginas del informe deba disponer de los identificadores del paciente estudiado, y que las páginas estén numeradas, siguiendo el formato "página X de Y", para que el lector del informe sea conocedor de si falta alguna página (13). Respecto al estilo, también se han descrito algunas recomendaciones, tales como proporcionar **títulos coherentes e informativos**, limitar la información debajo de cada título, proporcionar pistas visuales, utilizar fuentes sencillas y nítidas, entre otras. Asimismo, el lenguaje utilizado, que incluye la terminología y la nomenclatura, debe ser comprensible para los clínicos no expertos en genética y otros usuarios específicos (10).

1.2.2 Contenido de los informes

El informe clínico de resultados debe incluir un conjunto mínimo de datos tal como se detalla en el Real Decreto 1093/2010 de 3 de septiembre, en su anexo V (14) y,

adicionalmente, debe recoger las recomendaciones o buenas prácticas establecidas por la comunidad científica. Tradicionalmente, las recomendaciones sobre el contenido de los informes clínicos de pruebas genéticas han sido informadas por organismos como *The National Committee for Clinical and Laboratory Standards* (también conocido como *Clinical and Laboratory Standards Institute* o CLSI) (6), *The National Pathology Accreditation Advisory Council* (15), *The National Association of Testing Authorities* (16), *The European Molecular Genetics Quality Network* (17), Swiss Society of Medical Genetics (18), *Organization for economic co-operation and development* (5), *American College of Medical Genetics* (7) y *The College of American Pathologists* (9,19). Las pautas que se presentan en este apartado incorporan las recomendaciones de estas organizaciones, y son consistentes con los requisitos de la Norma ISO 1518 (12).

En general, los informes deben incluir información relativa a la muestra, paciente, prueba realizada y resultados obtenidos, clínico solicitante y laboratorio responsable del estudio, tal como se detalla en la **Tabla 4**. Además, el laboratorio debe facilitar un asesoramiento clínico en la interpretación de los resultados, incluyendo la inclusión de comentarios interpretativos (12).

Se recomienda incluir cada uno de los "*aspectos del informe*", campos o indicaciones que se detallan a continuación para elaborar el informe de una prueba genética específica.

Algunos de los aspectos considerados en el informe de laboratorio son de tipo administrativo:

- **Nombre y dirección del laboratorio responsable del estudio**. El informe debe proporcionar información sobre el laboratorio, o la unidad dentro del laboratorio/servicio/departamento, que proporciona los resultados de la prueba de NGS; así como los detalles de contacto del responsable del estudio. Puede tratarse de un laboratorio hospitalario, de un laboratorio de referencia o bien de un laboratorio privado. En cualquiera de los casos, se reconoce que aun cuando las muestras puedan enviarse a otro laboratorio para su análisis, el laboratorio remitente sigue siendo responsable de proporcionar el resultado de la prueba. En estos casos, se desaconseja transcribir resultados genéticos complejos (14) debiéndose proporcionar una copia del informe original del laboratorio de referencia al médico solicitante.

- **Nombre o número de identificación del paciente y de la muestra**. Son necesarios para poder identificar correctamente y de manera unívoca al paciente, garantizando así que los resultados que se indican en el informe corresponden exactamente a la persona a quien se le obtuvo la muestra que se deriva para el estudio. Los identificadores de pacientes deben incluirse en cada una de las páginas del informe. El número de identificación de la muestra debe ser único para cada muestra que entra en el laboratorio (muestra primaria) y para cada colección que se obtiene a partir de la anterior (muestra secundaria). En el caso de la muestra primaria su identificación lo proporciona el registro realizado por el servicio de anatomía patológica. Por su parte, el **número de identificación del laboratorio** o NLB es el número asignado a la muestra secundaria cuando se obtiene en el laboratorio.

- **Fechas de solicitud del análisis y de validación/impresión del informe**. En el informe debe indicarse la fecha en la que el clínico peticionario ha realizado la solicitud y la fecha en la que se ha realizado la validación y/o la impresión del informe. El **tiempo de respuesta (*turnaround time*, TAT)** del diagnóstico molecular para los pacientes con enfermedad avanzado se ha vuelto cada vez más importante como consecuencia de que la terapia debe administrarse como primeras líneas de tratamiento. Entre las recomendaciones realizadas por el consenso de expertos CAP/IASLC/AMP (20,21) se referencia la rapidez con la que los resultados de las pruebas moleculares deben estar disponibles, estableciéndose un TAT máximo de 10 días hábiles desde la recepción de la muestra en el laboratorio de análisis. En general, los equipos multidisciplinares de CPNM, en función de su situación, deben definir un TAT para los resultados de los biomarcadores, comenzando desde cuando se emite un diagnóstico hasta que el oncólogo recibe el informe (22). Se ha definido que TAT global no debe exceder los 21 días naturales. El TAT pre-laboratorio, desde la solicitud de la prueba hasta la recepción de la muestra por parte del laboratorio que realiza el estudio, no debe exceder los 3 días hábiles; el TAT intra-laboratorio, desde la recepción de la muestra hasta la generación del informe, no debe exceder los 10 días hábiles, tal como se ha comentado; y el TAT post-laboratorio, desde la notificación de los resultados hasta la recepción del informe por parte del oncólogo, debe ser inferior a 24 horas.

- **Nombre, dirección y contacto del médico solicitante**. Permite que el laboratorio envíe el resultado directamente a quien solicitó el estudio molecular. Para garantizar que los resultados se interpreten correctamente, se debe considerar la posibilidad de que el laboratorio pueda comentar con el médico solicitante cualquier dato referente al análisis.

- **Título del informe o nombre de la prueba.** Debe haber un título o alguna otra indicación en el comienzo del informe (por ejemplo, "*Informe de*

resultados del diagnóstico molecular del CPNM mediante NGS"). Este título debe ir acompañado de una breve descripción que refleje el propósito de la prueba. Los informes de las pruebas genéticas deben reafirmar explícitamente la cuestión clínica que se plantea y, por ello, es importante definir el alcance o indicación de la prueba. Adicionalmente, se debe indicar su recomendación según guías clínicas (si procede).

- **Firma.** El informe debe estar firmado (electrónica o manualmente) por el laboratorio especialista autorizado que validó el análisis e interpretó el resultado. En el caso de estudios moleculares complejos (como la secuenciación masiva), se recomienda la co-validación y la co-firma por una segunda persona competente (siendo obligatorio en algunos países). Siempre se debe indicar el nombre y la función de los firmantes.

Otros elementos que aparecen en el informe de laboratorio pueden estar relacionados con el tipo de muestra obtenida (referido a los ácidos nucleicos DNA y/o RNA) y con el propio análisis realizado (referido a la secuenciación masiva):

- **Procedencia de la muestra secundaria**. Algunas pruebas pueden realizarse en distintos tipos de muestra. Por ejemplo, los estudios de NGS pueden realizarse sobre DNA y/o RNA obtenido a partir de diferentes muestras primarias (bloques FFPE, citologías, biopsias líquidas, entre otras); de tal manera, que los resultados deben hacer referencia exclusivamente al tipo de muestra secundaria utilizada para el estudio (por ejemplo, gDNA o DNA libre circulante, etc.)

- **Momento de obtención de la muestra**. El resultado de los estudios de NGS puede verse afectado por la antigüedad (año) de la muestra primaria. Asimismo, en el caso de las biopsias líquidas en importante anotar el momento (hora) de obtención de la muestra para controlar la fase preanalítica.

- **Condiciones referentes a la muestra**. En los informes de NGS, comentarios sobre la adecuación de la muestra y la calidad de la misma resultan relevantes porque puedan afectar a los resultados de los análisis. El laboratorio debe definir, documentar y difundir los criterios de aceptación o rechazo de las muestras y revisarlos ante cambios en el procedimiento. Así, por ejemplo, el porcentaje de células neoplásicas en la muestra proporcionada para el diagnóstico molecular resulta importante. Lo deseable es que el informe contenga información sobre los requisitos de celularidad y proporción tumoral para el control de calidad, aunque esta información también puede conservarse en los registros del departamento/servicio en lugar de notificarse. Cuando la muestra se ha procesado en otro laboratorio debiera indicarse con precisión el procedimiento y el responsable (por ejemplo, muestra de gDNA procedente de biopsia FFPE extraído por el Biobanco).

- **Metodología y ensayo empleado.** El informe debe incluir suficiente información técnica sobre el **método** que se ha utilizado para identificar las variantes. Los detalles metodológicos suelen presentarse en la parte inferior del informe. Se debe incluir una descripción del método e indicar el panel de genes utilizado en el ensayo enumerando los nombres de los genes estudiados. Se deben indicar los tipos de variantes que puede detectar el ensayo (por ejemplo, SNV, indels, CNA), así como el tamaño máximo de las variantes de inserción y deleción detectables. Además, deben detallarse las características de rendimiento del ensayo (como la cobertura media del panel y, especialmente, el límite de detección) y las métricas de calidad (como la uniformidad, porcentaje de lecturas promedio en las secuencias de interés, entre otras). Las características técnicas del ensayo pueden ser especialmente relevantes para la interpretación de estudios negativos y, para auditorías y revisiones posteriores por parte del laboratorio. A medida que los paneles de genes se hacen más grandes, incluir toda esta información en un informe puede resultar desproporcionado. Por ello, los laboratorios pueden referenciar el ensayo utilizado una cita bibliográfica o publicar información adicional en un sitio web que esté disponible para todos los peticionarios. *Human Genome Variation Society* (HGVS) recomienda que la secuencia genómica o genética (cDNA), en lugar de la secuencia proteica, sea la que se utilice como base para informar las pruebas genéticas (23); y si están disponibles, se recomiendan las secuencias de referencia NCBI (24). *Human Genome Organisation Gene Nomenclature Committee* designa una secuencia de referencia NCBI recomendada para cada gen o locus. Es fundamental que se especifique la secuencia de referencia utilizada por el laboratorio para el alineamiento en la búsqueda de variantes (por ejemplo, *Human Genome Built 19*) y el algoritmo y programa informático utilizados para el filtrado de dichas variantes.

  Asimismo, el informe siempre debe indicar las limitaciones técnicas del ensayo de NGS (por ejemplo, la dificultad para secuenciar regiones homopoliméricas).

- **Resultados de la prueba.** Las guías de HGVS (25) y *American College of Medical Genetics and Genomics* (26) recomiendan utilizar el término "*variante*" para describir cualquier alteración genética o genómica identificada. La guía del *American College of Medical Genetics and Genomics* (27), que ha sido avalada por *Canadian College of Medical Geneticists,* recomienda utilizar

el término "*patogénica*" para definir las variantes posiblemente causantes de enfermedades y subdividir la designación "*variante*" en cinco categorías de evidencia ("patógenica", "probablemente patogénica", "variante de significado incierto", "probablemente benigna" y "benigna" (26). Asimismo, una guía emitida conjuntamente por la *Association for Molecular Pathology the American, American Society of Clinical Oncology,* y *College of American Pathologists* recomienda clasificar las variantes somáticas según su efecto, en relación con la accionabilidad terapéutica, pronóstica, diagnóstica y preventiva (adaptada de Li MM, *et al*. 2017) (28). La guía propone 4 niveles de efecto clínico, y el nivel más alto lo asigna a aquellas variantes que predicen la respuesta o resistencia a las terapias aprobadas o que se han incluido en las guías clínicas como biomarcador diagnóstico, pronóstico o terapéutico de tumores específicos. De forma similar ESMO propone una clasificación de variantes basada en la evidencia clínica que respalda su valor como dianas terapéuticas; es la denominada clasificación ESCAT (*Clinical Actionability for Mole Targets*) que define seis niveles de evidencia clínica (29). La categorización por nivel de accionabilidad es valiosa para proporcionar un enfoque uniforme que determine el efecto clínico de las variantes somáticas (30).

El laboratorio responsable del informe debe establecer y documentar un procedimiento, en consonancia con las recomendaciones nacionales e internacionales, para la notificación de las variantes antes de proporcionar este tipo de análisis.

Algunas recomendaciones establecidas para reportar variantes (28) en un informe de resultados de NGS son las siguientes:

- Todas las variantes detectadas deben ser revisadas cuidadosamente por profesionales debidamente formados y competentes en el diagnóstico molecular.
- Todas las variantes patogénicas (clase 5) y probablemente patogénicas (clase 4) deben ser notificadas. La notificación de las variantes de significado incierto (clase 3) dependerá de la práctica establecida, siendo una información que debe quedar clara para todos los clínicos (12).
- No se recomienda incluir en el informe alteraciones benignas ni probablemente benignas.
- Se debe incluir en el informe datos de secuenciación masiva asociados a las variantes reportadas, tal como su frecuencia alélica (VAF) y cobertura.
- Para informar de las alteraciones, la acreditación de los laboratorios exige que se siga una nomenclatura estándar, descrita y mantenida por el HGVS (23). La nomenclatura es actualizada continuamente por el HGVS a medida que avanza el conocimiento del genoma humano. No obstante, la nomenclatura coloquial debe incluirse además de la nomenclatura estándar, según sea necesario, para transmitir el significado con claridad a clínicos no expertos.
- Las variantes deben clasificarse por niveles según su relevancia clínica. Los niveles deben notificarse en orden descendente de importancia clínica.
- Los informes no deben limitarse a los resultados positivos. Los resultados negativos relevantes para la enfermedad deben ser reportados. Los negativos pertinentes deben incluirse para las combinaciones de fármacos y cáncer del nivel I (por ejemplo, la ausencia de una mutación *EGFR* en un paciente con cáncer de pulmón).

- **Hallazgos incidentales y secundarios.** Un hallazgo incidental, en la práctica médica, es una anormalidad de algún tipo hallada de forma fortuita durante un procedimiento que no se encuentra relacionado con el objetivo del estudio asociado al diagnóstico presuntivo del paciente. El CCMG proporciona pautas claras con respecto a los hallazgos incidentales en el contexto de los trastornos genéticos (31). En los tumores somáticos, la prueba de NGS a partir del tejido tumoral, en busca de variantes somáticas importantes para identificar dianas terapéuticas, puede detectar variantes de predisposición al cáncer de línea germinal relevantes para el paciente (32). No se puede obtener información definitiva sobre una posible variante de línea germinal a partir de solo el análisis del tumor. Los laboratorios deben de indicar en el informe la sospecha de una variante de origen germinal y establecer un procedimiento para el seguimiento de estos casos (33). El seguimiento puede incluir ponerse en contacto con el médico remitente para sugerir una derivación a genética clínica o una declaración en el informe de que se recomienda asesoramiento genético específico para el paciente. En general, el laboratorio debe definir y difundir normas con respecto a la identificación y notificación de hallazgos incidentales o secundarios.
- **Interpretación de los resultados.** Se debe ofrecer una interpretación cuando ésta implique o guíe una decisión en el manejo clínico del paciente. Debe ser una interpretación precisa y actualizada, indicando referencias de la literatura. Adicionalmente, se puede recomendar una consulta de asesoramiento

genético (si procede). Todo ello requiere de un personal cualificado, ya que la información o comentarios erróneos podrían comprometer las conclusiones del receptor del informe y dar lugar a errores en la actividad asistencial (34, 35). En general, los comentarios interpretativos deben estar documentados, además de estar consensuados y estandarizados por el personal facultativo del laboratorio autorizado para la revisión de los resultados.

El informe del laboratorio de patología molecular debería recoger, adicionalmente, otros aspectos que pueden resultar relevantes:

- **Garantía de calidad del laboratorio.** El sistema de garantía de calidad del laboratorio o su acreditación es otro de los aspectos que debe contemplar un informe de resultados. Es importante tener en cuenta si un ensayo ha sido certificado o validado con fines de diagnóstico. La mayoría de los kits y reactivos comerciales que se utilizan en las pruebas genéticas no están certificados para uso diagnóstico. Los laboratorios deben validar el ensayo (36) o declarar en el informe que dicha validación no se ha realizado para que los resultados sean interpretados en consecuencia. Para garantizar la calidad en la notificación de las variantes identificadas, los laboratorios que comunican o informan este tipo de resultados con fines asistenciales deberían estar acreditados o contar con un reconocimiento equivalente. En España, se recomienda que el laboratorio cuente con una certificación ISO 9001, y que las diferentes pruebas de los laboratorios de patología molecular estén acreditadas por la norma ISO15189 y, por tanto, evaluadas por la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC) (37). Asimismo, los laboratorios que realicen estas pruebas moleculares y que no estén acreditados ni tengan un reconocimiento equivalente, deberían verificar y comunicar sus resultados a través de otro laboratorio que contara con dicha acreditación o reconocimiento (6).

- **Informes integrados.** Existe la necesidad de informar de forma integrada los resultados del informe de patología molecular. Sin embargo, cuando esto no es posible consecuencia de que los resultados proceden de diversas especialidades, puede utilizarse un sistema combinado de informes, o un registro electrónico de pacientes, que permita al clínico o al equipo multidisciplinar determinar si tienen toda la información disponible para establecer conclusiones razonadas. Los resultados del informe de NGS debe integrarse con el resto de la información en la historia clínica del paciente

- **Actualización de los informes.** Los informes deben ser estáticos, y la fecha de emisión debe presentarse claramente; no es necesario reeditarlos automáticamente cuando los conocimientos cambian. No obstante, si en un momento determinado se decide, por la comunidad científica de expertos, cambiar la significación clínica de una variante, el laboratorio debe considerar la posibilidad de desarrollar un proceso de actualizaci**ón de los informes cuando se le** pida específicamente (11).

- **Consentimiento informado del paciente** es otro de los aspectos que debe de contemplar el informe de resultados. Como se ha detallado anteriormente no se considera una responsabilidad del laboratorio de patología molecular obtener el consentimiento informado antes de realizar una prueba de NGS a un paciente con CPNM avanzado. En general, definido el alcance o propósito del estudio molecular de NGS no debiera requerirse tal documento. Sin embargo, con los paneles de NGS existe un riesgo de hallazgo incidental al identificar variantes de probable origen germinal. En este sentido, el riesgo debe comunicarse a los pacientes antes de que se soliciten las pruebas y debe firmarse el consentimiento informado por las cuestiones éticas que conlleva (11). Cuando se informan hallazgos incidentales de variantes de probable línea germinal, los laboratorios deben recomendar al clínico solicitante del estudio una interconsulta con los genetistas y/o unidades de asesoramiento genético para permitir la derivación del estudio.

Tabla 4. Ejemplo de contenido del informe de resultados

Parámetro	Recomendación
Laboratorio	Identificación del laboratorio que emite el informe (nombre, dirección, teléfono de contacto y correo electrónico) Identificación de las pruebas realizados por laboratorios subcontratados.
Solicitante	Identificación del clínico solicitante e información de contacto
Paciente	Nombre(s) y apellido(s) Fecha de nacimiento inequívoca Género Identificador del paciente (NHC, nº tarjeta sanitaria...). Los identificadores de pacientes deben incluirse en cada página del informe. Diagnóstico de la enfermedad (Adenocarcinoma de pulmón estadio IV) Momento de la enfermedad: diagnóstico, seguimiento, progresión
Fechas	Fecha de solicitud del estudio Fecha de emisión del informe
Título del Informe	Nombre de la prueba Descripción Alcance o indicación Recomendación de la prueba según guías clínicas (si procede).

Parámetro	Recomendación
Muestra	Número de identificación de muestra único para cada muestra recibida (primaria) y analizada (secundaria). Momento (año) de obtención de la muestra (si procede). Momento (hora) de llegada de la muestra al laboratorio (si procede, por ejemplo en muestras de biopsias líquidas). Información sobre el tipo de muestra [Citología o sección de material tumoral FFPE (pieza quirúrgica, biopsia, punción, líquido), biopsia líquida...]. Comentarios sobre la adecuación de la muestra y la calidad de la misma. Requisitos de Celularidad (> 300) y proporción tumoral (>20%). Material obtenido y utilizado en el análisis (gDNA, mRNA, cfDNA, cftotalNA).
Metodología	Descripción del método y el ensayo utilizado Especificaciones y limitaciones del rendimiento de la prueba
Resultados	Clasificación de las variantes por niveles según su patogenicidad. Cobertura y frcuencia aléliaca (VAF) de las variantes identificadas. Nomenclatura recomendada por la HGVS Categorización de las variantes según su relevancia clínica o accionabilidad Hallazgos indicentales. Comentarios interpretativos de los resultados.
Calidad	Marca y/o frase de que la prueba se encuentra o no al amparo de la acreditación
Consentimiento informado	Frase que indica que el paciente ha sido informado y ha dado su consentimiento para el estudio genético.
Revisor (Firma)	Identificación de la persona que revisa, valida el informe y autoriza su emisión.

BIBLIOGRAFÍA

1. Claustres M, *et al*. Recommendations for reporting results of diagnostic genetic testing (biochemical, cytogenetic and molecular genetic). Eur J Hum Genet. 2014 Feb;22(2):160-70.

2. Yip S, *et al*. A Canadian guideline on the use of next-generation sequencing in oncology. Curr Oncol. 2019 Apr;26(2):e241-e254.

3. Cox SL, *et al*. Patterns of cancer genetic testing: a randomized survey of Oregon clinicians. J Cancer Epidemiol 2012;2012:294730.

4. Tembuyser L, *et al*. Higher quality of molecular testing, an unfulfilled priority: results from external quality assessment for KRAS mutation testing in colorectal cancer. J Mol Diagn 2014;16:371–7.

5. Cree IA, *et al*. Guidance for laboratories performing molecular pathology for cancer patients. J Clin Pathol. 2014 Nov;67(11):923-31.

6. Organization for Economic Co-operation and Development. OECD guidelines for quality assurance in molecular genetic testing. Paris, France: Organization for Economic Co-operation and Development; 2007. Disponible en: http://www.oecd.org/dataoecd/43/6/38839788.pdf.

7. Wayne PA, *et al*. Clinical and Laboratory Standards Institute. Molecular diagnostic methods for genetic diseases; approved guideline, 2nd ed. Clinical and Laboratory Standards Institute; Publication no. MM01-A2; 2006.

8. American College of Medical Genetics. ACMG standards and guidelines for clinical genetic laboratories. Bethesda, MD: American College of Medical Genetics; 2008. Diponible en: http://www.acmg.net/am/template.cfm?section=laboratory_standards_and_guidelines&template=/cm/htmldisplay.cfm&contentid=2511.

9. College of American Pathologists Commission on Laboratory Accreditation. Molecular pathology checklist; 2007. Disponible en:
http://www.cap.org/apps/docs/laboratory_accreditation/checklists/molecular_pathology_sep07.pdf.

10. RCPA (2009). Guidelines for reporting molecular genetic tests to medical practitioners. Guideline 1/2009 of the Royal College of Pathologists of Australasia, Surry Hills NSW. Disponible en:
http://www.rcpa.edu.au/static/File/Assetlibrary/publicdocuments/PolicyManual/Guidelines/Guidelinesforreportingmoleculargenetictestdtomedicalpractitioners.pdf.

11. Chen B, *et al*. Good Laboratory Practices for Molecular Genetic Testing for Heritable Diseases and Conditions. MMWR Recomm Rep. 2009 Jun 12;58(RR-6):1-37; quiz CE-1-4.

12. Matthijs G, *et al*. Guidelines for diagnostic next-generation sequencing. European Journal of Human Genetics. Eur J Hum Genet. 2016 Oct;24(10):1515.

13. UNE-EN ISO 15189:2013. Medical laboratories - Requirements for quality and competence (ISO 15189:2012, Corrected version 2014-08-15). Disponible en: Http://Www.ISO.Org/ISO/Catalogue_Detail?Csnumber=56115.

14. Real Decreto 1093/2010. De 3 de septiembre, por el que se aprueba el conjunto mínimo de datos de los informes clínicos en el Sistema Nacional de Salud. Boletín Oficial del Estado 2010 p. Anexo V. Disponible en: https://www.boe.es/eli/es/rd/2010/09/03/1093/dof/spa/pdf.

15. The National Pathology Accreditation Advisory Council (NPAAC 2006). Laboratory Accreditation Standards and Guidelines for Nucleic Acid Detection and Analysis. Commonwealth of Australia. Publications record 3861. Disponible en: http://www.health.gov.au/internet/main/publishing.nsf/Content/health-npaac-docs-nad.htm

16. The National Association of Testing Authorities (NATA 2005). ISO 15189 Application Document. Supplementary Requirements For Accreditation in the Field of Medical Testing. Version 1. Disponible en: http://www.qcnet.com/Portals/40/PDFs/NATA_Supplemental%20Requirements%2015189.pdf.

17. The European Molecular Genetics Quality Network (EMQN 2014). Disponible en: https://www.emqn.org/best-practice/#.

18. Swiss Society of Medical Genetics (SSMG 2003). Best practice guidelines on reporting in molecular genetic diagnostic laboratories in Switzerland, Version 1. Disponible en: http://www.sgmg.ch/view_page_professional.php?view=page&page_id=19.

19. Gulley ML, *et al*. Clinical laboratory reports in molecular pathology. Arch Pathol Lab Med 2007 Jun;131:852–63.

20. Lindeman NI, *et al*. Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. J Thorac Oncol. 2013 Jul;8(7):823-59.

21. DiStasio M, *et al*. Molecular testing turnaround time for non-small cell lung cancer in routine clinical practice confirms feasibility of cap/iaslc/amp guideline recommendations: a single-center analysis. Clin Lung Cancer. 2017 Sep;18(5):e349-e356.

22. Cheema PK, *et al*. Consensus recommendations for optimizing biomarker testing to identify and treat advanced EGFR-mutated non-small-cell lung cancer. Curr Oncol. 2020 Dec;27(6):321-329.

23. www.hgvs.org

24. www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq.

25. Human Genome Variation Society (hgvs). Recommendations for the Description of Sequence Variants. Melbourne, Australia: hgvs; 2016. Disponible en: https://www.hgvs.org/mutnomen/recs.html.

26. Richards S, *et al*, on behalf of the American College of Medical Genetics and Genomics Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. Genet Med. 2015 May;17(5):405-24.

27. Canadian College of Medical Geneticists (CCMG), Ad Hoc Working Group on Next Generation Sequencing. CCMG Practice Guideline: Laboratory Guidelines for Massively Parallel Sequencing. Kingston, ON: ccmg; 2018. Disponible en: https://www.ccmg-ccgm.org/documents/1-CCMG-Guidelines-for-MPS_FINAL-June-11-2018.pdf.

28. Li MM, *et al*. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. J Mol Diagn. 2017 Jan;19(1):4-23.

29. Mateo J, *et al*. A framework to rank genomic alterations as targets for cancer precision medicine: the ESMO Scale for Clinical Actionability of molecular Targets (ESCAT). Ann Oncol. 2018 Sep 1;29(9):1895-1902.

30. Mosele F, *et al*. Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with metastatic cancers: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. Ann Oncol. 2020 Nov;31(11):1491-1505.

31. Boycott K, *et al*, Canadian College of Medical Geneticists. The clinical application of genome-wide sequencing for monogenic diseases in Canada: position statement of the Canadian College of Medical Geneticists. J Med Genet 2015 Jul;52(7):431–7.

32. Robson ME, *et al*. American Society of Clinical Oncology policy statement update: genetic and genomic testing for cancer susceptibility. J Clin Oncol 2015 Nov 1;33(31):3660–7.

33. Hume S, *et al*. CCMG practice guideline: laboratory guidelines for next-generation sequencing. J Med Genet. 2019 Dec;56(12):792-800.

34. Lim EM, *et al*. Quality assessment of interpretative commenting in clinical chemistry. Clin Chem. 2004 Mar;50(3):632-7.

35. Laposata M. Patient-specific narrative interpretations of complex clinical laboratory evaluations: who is competent to provide them? Clin Chem. 2004 Mar;50(3):471-2.

36. NPAAC (2007a). Requirements for the development and use of in-house in vitro diagnostic devices (IVDS). Disponible en: http://www.health.gov.au/internet/main/publishing.nsf/Content/2F6F21AA2914FA77CA256F1800469BCD/$File/validivd.pdf.

37. Garrido P, *et al*. Updated guidelines for predictive biomarker testing in advanced non-small-cell lung cancer: a National Consensus of the Spanish Society of Pathology and the Spanish Society of Medical Oncology. Clin Transl Oncol. 2020 Jul;22(7):989-1003.

Como se ha comentado en este documento, la introducción de la NGS en la práctica clínica abre nuevas oportunidades en la oncología de precisión, permitiendo a los pacientes oncológicos sometidos a un análisis molecular de alto rendimiento la identificación de potenciales dianas para terapias basadas en alteraciones genómicas. La interpretación sistemática de grandes cantidades de datos generados a partir de la NGS, con el objetivo de traducir las alteraciones moleculares identificadas en indicaciones clínicas accionables, sigue siendo un enorme desafío en el uso clínico de la NGS. Con el fin de impulsar la aplicabilidad clínica de los hallazgos moleculares, se ha creado la figura de los Comités Moleculares (*Molecular Tumor Board*, MTB), una iniciativa que se gestó en 2011 en la Universidad de Michigan. (1)

El objetivo del MTB es identificar y discutir todas las potenciales opciones terapéuticas en un paciente, basadas en los hallazgos moleculares. Las recomendaciones del MTB deben derivarse de una discusión multidisciplinar, que incluya no solo las alteraciones moleculares sino todas las características que conciernen al paciente, como el estado funcional, comorbilidades u otras. Las recomendaciones del MTB deben estar indicadas claramente en informes diseñados ad hoc, que documenten parámetros tales como la presencia de: 1) mutaciones activadoras, cambio en el número de copias o variaciones estructurales, incluidos los genes de fusión; 2) alteraciones moleculares reconocidas como dianas terapéuticas; 3) inestabilidad de microsatélites; 4) carga mutacional; 5) alteraciones que indiquen farmacorresistencia; 6) recomendaciones del MTB; y 7) ensayos clínicos potencialmente disponibles (2). Además, siguiendo las recomendaciones de buenas prácticas, debe constar la identificación del paciente y de las características de la muestra utilizada en la NGS, con una presentación clara de los resultados y su interpretación. Puede considerarse al MTB como una potente herramienta formativa de profesionales en los hospitales universitarios o académicos, donde la presentación de casos complejos o paradigmáticos impulsaría la discusión científica.

Un aspecto clave es la nomenclatura empleada en los hallazgos moleculares. El uso de escalas de clasificación de las alteraciones basadas en la potencial utilidad clínica permite catalogar las recomendaciones en niveles de accionabilidad clínica y facilitaría una eventual convergencia hacia estándares comunes para anotar las decisiones de tratamiento (3). Entre ellas, se emplean i) la recomendación de consenso conjunto (JCR) de la Asociación de Patología Molecular (AMP), el Colegio Americano de Genética Médica y Genómica (ACMG), Sociedad Estadounidense de Oncología Clínica (ASCO) y el Colegio de Patólogos Estadounidenses (CAP) por informar variantes genéticas en el cáncer; (ii) la escala de la Sociedad Europea de Oncología Médica (ESMO) para la accionabilidad clínica de dianas moleculares (ESCAT); (iii) OncoKB (base de conocimientos de oncología de precisión) que distingue cuatro niveles de accionabilidad y tres niveles de resistencia: ayudarían al esfuerzo de MTB para integrar la importancia funcional y la capacidad de acción clínica y para ofrecer recomendaciones terapéuticas equilibradas con un impacto inmediato potencial, con una cita explícita de las escalas de referencia utilizadas.

La literatura científica referente a los MTB indica que los pacientes discutidos en el marco de estos comités son frecuentemente aquellos para los que la terapia estándar ha sido ineficaz. Por tipo tumoral, se ha descrito que un 21,4% fueron sarcomas, un 20% tumores de mama, 15,5% tumores de sistema nervioso, 14,1% tumores ginecológicos, 7,3% de pulmón y 6,4% colorrectales (4). Todos los tipos de tumores son candidatos a una revisión por un MTB tras una NGS, pero se ha demostrado una mayor aplicabilidad o beneficio en las neoplasias malignas raras.

Los MTB fomentan el debate, las discusiones y la comunicación general entre los diferentes profesionales, impulsando el desarrollo de la oncología de precisión. Las figuras clave sobre las que pivota el comité son el oncólogo clínico y el patólogo. Otras figuras de creciente importancia en el MTB son los genetistas, especialmente para discutir cuestiones e implicaciones relacionadas con las mutaciones en línea germinal, los bioinformáticos y los biólogos. Perfiles de interés y que crecientemente se están incorporando a los MTB son los farmacéuticos oncológicos y los expertos en bioética, que deberían incluirse, al menos cuando se emplean fármacos experimentales. En aquellos centros con importante desarrollo clínico en fármacos en investigación, un coordinador de investigación o de ensayos clínicos puede completar la composición del MTB (4).

El tiempo de respuesta de las recomendaciones del MTB debería garantizar el inicio potencial de la terapia dirigida en un período de tiempo beneficioso para el paciente. Las distintas experiencias publicadas sugieren que este tiempo no debería exceder los 28 días (unas 4 semanas), incluido el proceso de secuenciación del tumor, análisis molecular y la discusión del MTB (interpretación, discusión, decisión), lo que puede representar un buen compromiso entre la urgencia de tratar y el tiempo necesario para las técnicas. En todo caso, se deben realizar todos los esfuerzos para acortar el plazo de secuenciación y el tiempo de respuesta de los MTB, así como monitorizar de forma constante el tiempo en cada proceso, incluidas las fases preanalíticas, para mantener los estándares requeridos en la medicina de precisión. Una estrategia diagnóstica refleja, en la que el propio patólogo inicie las pruebas moleculares basándose en la identificación de un patrón histológico

concreto, antes de cerrar incluso el informe de patología, mejora el tiempo de respuesta (5).

Finalmente, y en línea con los comentarios del capítulo anterior, es importante también analizar en profundidad los costes asociados a la terapia guiada por alteraciones moleculares. Un estudio reciente demostró que el diagnóstico molecular representa sólo el 6% del gasto hospitalario en un paciente oncológico, mientras que los medicamentos (56,5%) y la hospitalización (32%) son las partidas de gasto fundamentales (6). Dentro del diagnóstico molecular, las actividades del MTB representan solo el 5% del coste del proceso diagnóstico, lo que supone el 0,3% del gasto total del paciente. Dado que el consumo de farmacia representa el mayor gasto, las vías de prescripción y acceso a los medicamentos siguen siendo cruciales para garantizar la sostenibilidad, asequibilidad y la rentabilidad de la oncología de precisión. A este respecto, el reclutamiento del paciente en ensayos clínicos debería representar la ruta terapéutica de elección por diversas razones: la evidencia que respalda las recomendaciones de uso de un fármaco fuera de indicación suele ser débil, el uso no autorizado de un tratamiento no contribuye al aprendizaje del sistema de atención de la salud, y en los sistemas de salud públicos, la participación en ensayos clínicos patrocinados por la industria introduce un efecto de palanca que genera un círculo virtuoso' en el que los costos y riesgos son compartidos por las partes interesadas públicas y privadas (7). En esta estrategia, el papel de los MTB es crucial.

BIBLIOGRAFÍA

1. Roychowdhury S, *et al*. Personalized oncology through integrative high-throughput sequencing: a pilot study. Sci Transl Med. 2011 Nov 30;3(111):111ra121.

2. Li MM, *et al*. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. J Mol Diagn. 2017 Jan;19(1):4-23.

3. Li X, Warner JL. A Review of Precision Oncology Knowledgebases for Determining the Clinical Actionability of Genetic Variants. Front Cell Dev Biol. 2020 Feb 11;8:48.

4. Luchini C, *et al*. Molecular Tumor Boards in Clinical Practice. Trends Cancer. 2020 Sep;6(9):738-744.

5. Cree IA, *et al*. Guidance for laboratories performing molecular pathology for cancer patients. J Clin Pathol. 2014 Nov;67(11):923-31.

6. Pagès A, *et al*. The cost of molecular-guided therapy in oncology: a prospective cost study alongside the MOSCATO trial. Genet Med. 2017 Jun;19(6):683-690.

7. de Vries EGE, *et al*. When is off-label off-road? Ann Oncol. 2019 Oct; 30(10): 1536–1538.

1. CONTROLES DE CALIDAD

Los controles de calidad en la aplicación de la técnica de NGS en la práctica clínica, como ocurre con otras tecnologías utilizadas con este mismo fin, son necesarios para asegurar que se emitan resultados adecuados. Estos controles deben aplicarse en las diferentes etapas del proceso:

1. La fase pre-analítica – en este punto es necesario controlar el adecuado manejo y procesamiento de la muestra obtenida, de manera que los ácidos nucleicos que se puedan obtener tengan una calidad óptima (que haya las mínimas alteraciones químicas, evitar la degradación de los mismos) ya que esto condicionarían la viabilidad de la técnica a realizar posteriormente.

2. La fase analítica: en este punto se debe controlar el desarrollo adecuado de la preparación de la muestra, la preparación de las librerías, la evaluación de la calidad del proceso y de la secuenciación.

3. Análisis de los datos generados: en este punto debemos controlar que el análisis bioinformático sea adecuado. Se deben identificar correctamente las variantes a partir de las secuencias generadas, así como la interpretación de las mismas, especialmente en el caso de variantes no frecuentes o indeterminadas.

4. Elaboración del informe: es necesario controlar que los datos incluidos sean correctos, que la información y las recomendaciones sean adecuadas y que el informe refleje el resultado con claridad de manera que la interpretación del mismo por el receptor final no presente ambigüedad y no sea susceptible de interpretación inadecuada.

La parte pre-analítica y analítica pueden controlares con procedimientos normalizados de trabajo (PNTs) bien definidos, registros de los procedimientos y controles de calidad de las muestras. Estos controles en la fase preanalítica incluirían la evaluación de la amplificación de los ácidos nucleicos y el análisis de la fragmentación mediante electroforesis en sistemas como Bioanalyzer© o Tapestation© de Agilent. En la fase analítica se deben incluir, si es posible, controles para mantener la trazabilidad de la muestra y del proceso, así como la identificación de contaminación en las etapas del del flujo de trabajo de secuenciación. En función del protocolo de preparación de librerías se pueden realizar controles de calidad mediante electroforesis, fluorometría y/o PCR en tiempo real al final de la preparación para verificar que existe suficiente cantidad de librería para ser analizada, y para equilibrar adecuadamente las muestras en el momento de introducirlas en el secuenciador.

Tanto en la parte preanalítica como en la analítica es altamente recomendable la introducción de documentación de calidad que incluya, entre otros, los dispositivos usados, los números de lote de reactivos, su caducidad y cualquier desviación de los procedimientos estándar si los hubiera (1,2).

La calidad de la carrera de secuenciación es otro de los puntos críticos del proceso a considerar. Si la calidad de la carrera no es adecuada, no debería continuarse el proceso de análisis.

La calidad se reflejará, por una parte, en el número de lecturas obtenidas. Este valor será indicativo de si había suficiente cantidad de librerías cuando se cargaron las muestras en el secuenciador (número de clústers adecuado en el sistema Illumina©; intensidad de carga en el chip en los sistemas Ion Torrent™). Además, se deberá verificar la calidad de las secuencias obtenidas, que reportará el instrumento en el análisis primario de los datos brutos. Los datos brutos se almacenan en archivos FastQ, que contienen la secuencia de lectura y la puntuación de calidad (Q) correspondiente, codificada en caracteres ASCII. La puntuación Q nos indica la probabilidad de que una base asignada a esa posición sea incorrecta. (2-4)

Tabla 5. Parámetros de calidad a considerar.

	Illumina©	Ion Torrent™
Rendimiento	Rendimiento (Yield) – número de bases secuenciadas	Bases totales
Calidad de las lecturas	Tasa de error – porcentaje de secuencias con calidad Q30	Lecturas totales y lecturas utilizables
Carga de flowcell/chip	Densidad de clusters	Carga de ISPs (%)
Calidad de la carga	Clusters que pasan filtro (PF)	ISP clonales (%)
Intensidad de señal basal		Señal clave (Key signal)

1.1. Illumina©

1.1.1. Yield

El rendimiento (*yield* u *output*), es el número de bases generadas en la ejecución de secuenciación y se representa como pares de bases Giga (Gb), o mil millones de pares de bases. El rendimiento es importante ya que determina cuántas muestras puede multiplexar en una sola ejecución, así como la profundidad de su secuenciación.

Los kits de secuenciación de Illumina© generalmente tienen una salida definida basada en el número de lecturas generadas y la longitud de lectura. Por ejemplo, un kit MiSeq v2 con 2x lecturas de 150 pb (300 pb) generará aproximadamente 15 millones de lecturas y, por lo tanto, ~4,5 Gb de datos de secuenciación sin procesar (300 pb x 15 millones = 4,5 Gb).

1.1.2. % Q30

El Q-score es un indicador de calidad de llamadas de bases individuales y mide la probabilidad de que una base se llame incorrectamente. Una puntuación Q de 30 significa que 1 de cada 1000 llamadas base puede ser incorrecta. El parámetro "porcentaje Q30" representa el porcentaje de bases con un puntaje de calidad Phred (puntaje Q) de 30 o más.

La mayoría de las carreras de Illumina© generan alrededor del 70-80% de los datos con Q30 o más, lo que es indicativo de una ejecución de secuenciación exitosa. Estos valores Q30 se enumeran para cada kit de secuenciación y son las especificaciones del fabricante. En carreras de baja calidad, el% Q30 se verá afectado y los datos de baja calidad se filtrarán. El Q-score disminuye ligeramente a medida que avanza una secuencia de secuenciación debido al gasto de reactivo y a los errores de la polimerasa, por lo que es normal ver valores de Q30 más bajos en la lectura 2 en comparación con la lectura 1.

1.1.3. Densidad de clúster (K/mm^2)

La densidad de clusters es la densidad de los clusters de secuenciación en la *flow-cell* (en miles por mm^2) después de la amplificación clonal. Este valor está directamente relacionado con la concentración final de la librería cargada en la *flow-cell* de Illumina©. La densidad del clúster es una métrica de importancia crítica que influye en la calidad de la carrera, las lecturas que pasan el filtro, las puntuaciones (scores) Q30 y el rendimiento total de datos. La carga de una *flow-cell* con una concentración de librería demasiado alta provocará un clustering excesivo, lo que dificulta que la cámara se enfoque en clústers individuales y puede hacer que algunos clusters fallen en el control de calidad. Niveles elevados de clusters conducen a un rendimiento de la carrera deficiente, scores Q30 más bajos y un rendimiento de datos total más bajo porque se filtran los clústeres de mala calidad. Si la concentración de la biblioteca es demasiado baja, el número de clusters será bajo y dará como resultado un menor rendimiento de la carrera; sin embargo, mantiene una alta calidad de los datos ya que la cámara puede enfocar cada cluster. El clustering óptimo se logra siguiendo las recomendaciones de carga de los fabricantes y realizando el control de calidad de la librería requerido, esto asegura que los clusters estén espaciadas a distancias óptimas para lograr el mejor rendimiento de la carrera en cuanto a cantidad de datos generados, pero sin interferir con el enfoque de la cámara.

1.1.4. Clústeres que pasan el filtro (% PF)

En los clusters de Illumina©, una sola molécula debería generar un único clusters con una señal clara en la base que se está secuenciando. El % PF es el número de clusters que pasaron el "*chastity filter*" integrado del instrumento Illumina©. Los clusters que no pasan este filtro se eliminan del análisis posterior y se descartan de los datos finales. El% PF es una indicación de la pureza de la señal de cada grupo y se ve afectado negativamente por librerías de mala calidad o clustering excesivo. Las *flow-cells* con clustering excesivo tienen un mayor número de clusters superpuestos, lo que conduce a una generación deficiente de clusters evaluables y una disminución posterior en el % PF.

1.2. Ion Torrent™

Las métricas de calidad de secuenciación para una ejecución de Ion Torrent™ NGS se pueden ver en tiempo real en el servidor de Torrent Suite donde se creó el plan de carrera.

1.2.1. Carga de ISP (%)

El porcentaje de pocillos de chips que contienen una partícula de esfera de iones (ISP). La imagen de densidad del ISP es una representación visual de la distribución de carga del pozo en la superficie física del chip. Los chips con alta carga aparecen de color rojo, mientras que si aparece en azul indica áreas de carga baja, generalmente una carga de ≥80% se considera óptima. La densidad de carga del ISP puede verse afectada por la preparación de la emulsión de la Liberia, pero también por la presencia de burbujas en los chips.

1.2.2. Bases totales (Gb)

Esta métrica describe el rendimiento de la ejecución de secuenciación e informa el número total de pares de bases filtrados y recortados en el archivo BAM de salida, representados como pares de bases Giga. Esta es la misma que la métrica de rendimiento de Illumina© y se correlaciona con el tamaño del chip de iones utilizado para la ejecución de secuenciación. Los chips más grandes, como el Ion 550, tienen más pocillos y, por lo tanto, permiten la entrada de más ISP, lo que produce un mayor rendimiento de datos.

1.2.3. Señal clave (*Key signal*)

La señal clave es la señal promedio para todos los ISP de biblioteca que contienen la clave de librería (TCAG) que se agrega a la biblioteca durante la creación de la emulsión. Se incorporan los cuatro nucleótidos y se determina la señal clave de la librería durante los primeros ocho flujos de nucleótidos del ciclo de secuenciación. Mide la eficiencia de la reacción de amplificación clonal en la emulsión. Durante una carrera de secuenciación, la señal de voltaje que se genera cae debido a las condiciones de reacción a medida que la ejecución se longitud a su finalización y finalmente se vuelve indistinguible del ruido de fondo. A medida que la señal se acerca al ruido de fondo, la calidad de la lectura disminuye y se produce un mayor recorte de calidad 3 '. Por lo tanto, cuanto mayor sea la señal de tecla de inicio, menor será el impacto de la caída de la señal y se espera que ocurra menos recorte de calidad 3 '.

1.2.4. ISP clonales (%)

Los ISP clonales (%) es el porcentaje de ISP clonales en un chip. Un ISP es clonal si todos sus fragmentos de DNA se clonan a partir de una única plantilla de la librería original. Todos los fragmentos de dicho ISP son idénticos y producen exactamente la misma señal a medida que cada nucleótido fluye a su vez a través del chip, amplificando así el voltaje. Si un ISP contiene fragmentos de más de una plantilla, se dice que es policlonal y se filtrará de los datos finales, ya que los nucleótidos pueden diferir a lo largo de la secuenciación y dar lugar a datos de mala calidad.

1.2.5. Lecturas totales y lecturas utilizables

El valor total de lecturas es el número total de lecturas que se escriben en archivos BAM de salida de muestra o no coincidentes. Esto también se define como el número total de lecturas que componen la librería final. Se puede considerar que estas lecturas pasan los filtros de calidad, ya que las lecturas filtradas no se incluyen en este recuento.

Las lecturas utilizables se calculan como el porcentaje de ISP de la librería que pasan los filtros policlonales, los filtros de baja calidad y de dímero de cebadores. Este porcentaje se calcula dividiendo las lecturas de la librería que pasan el filtro (lecturas totales) por el número de ISP de la biblioteca identificados antes del filtrado

Otros parámetros que definen la calidad en ambos sistemas serían los siguientes:

La identificación de variantes con fiabilidad dependerá, además, de la profundidad de la lectura y del número de lecturas que hayan identificado una variante. Actualmente no hay consenso sobre la cobertura mínima requerida en el entorno clínico al realizar secuenciación dirigida mediante NGS, por lo que cada laboratorio tiene que establecer sus propios parámetros para cumplir con la calidad suficiente (5). Los criterios mínimos de cobertura para NGS en oncología clínica oscila entre una profundidad de cobertura de 500 lecturas en cada posición concreta para alcanzar un límite de detección (*limit of detection*: LOD) del 5% que debería incrementarse a 1000 X en los casos de variantes heterogéneas en muestras de celularidad tumoral baja (6,7).

Por último, la elaboración del informe también debe cumplir con unos mínimos criterios de calidad, tal y como se ha detallado en el apartado correspondiente. Por un lado, la inclusión correcta de los datos mínimos que aseguren la seguridad del paciente. Por otro lado, es importante reflejar correctamente el resultado del estudio mutacional de acuerdo con la nomenclatura estandarizada, y realizar la interpretación clínica adecuada de los resultados obtenidos.

2. CERTIFICACIÓN Y ACREDITACIÓN DE LOS LABORATORIOS

Los laboratorios deben proporcionar evidencia de la calidad del trabajo realizado. Este objetivo puede lograrse mediante la participación en programas externos de calidad (muy recomendable para asegurar la calidad de los resultados en la práctica clínica), y mediante la obtención de la certificación y acreditación para la realización de estudios de genética molecular.

ISO define la certificación como el "Procedimiento mediante el cual un tercero da garantía por escrito de que un producto, proceso o servicio se ajusta a requisitos específicos". La certificación se realiza normalmente de acuerdo con la norma ISO9001-2015. Esta norma, aunque proporciona una medida de calidad, no garantiza que el laboratorio haya demostrado competencia técnica para producir datos y resultados válidos. Los requisitos de certificación abordan el sistema de gestión de la calidad (SGC) e incluyen los procedimientos normalizados de trabajo, la elaboración de un manual de calidad, el control de la documentación, la definición de no conformidades, acciones correctivas y preventivas, la realización de auditorías internas y la mejora de la satisfacción del cliente. Sin embargo, no incluye necesariamente requisitos de competencia técnica o analítica.

ISO define la acreditación como el "Procedimiento mediante el cual un organismo autorizado reconoce formalmente que un organismo o persona es competente para llevar a cabo tareas específicas". La norma desarrollada por ISO más utilizada en los laboratorios médicos es la ISO15189 y garantiza la competencia técnica de un laboratorio para realizar tipos específicos de pruebas cumpliendo con requisitos técnicos y de gestión específicos. La norma ISO15189 contiene los requisitos que tienen que cumplir los laboratorios clínicos si desean demostrar que poseen un sistema de gestión, que son técnicamente competentes y que son capaces de generar resultados técnicamente válidos.

El proceso de acreditación también considera al SGC como en la certificación, pero tiene requisitos formales adicionales de competencia técnica, que incluyen la formación inicial y continua del personal, la validación de métodos e instrumentos, así como el control de calidad interno y externo (8).

Además, hay una diferencia en el organismo que realiza la evaluación y entrega el certificado de certificación o acreditación. Los laboratorios que soliciten la certificación ISO 9001 serán auditados por un organismo de certificación, un tercero acreditado por un organismo de acreditación. Cada país tiene varios organismos de certificación, pero solo hay un organismo de acreditación nacional reconocido en cada país que evalúa a los laboratorios según las normas acordadas internacionalmente. En España este organismo es la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC).

La acreditación implica, por una parte, disponer de controles de calidad internos (*internal quality controls*; IQC), y además participar en controles calidad externos (EQA). Los IQC comprendería todas las verificaciones internas de que la prueba arroja resultados consistentes día tras día y se define como el conjunto de procedimientos llevados a cabo por el personal de un laboratorio para evaluar continuamente el trabajo de laboratorio y los resultados obtenidos, con el fin de valorar si son confiables para poder ser informados. Los EQA implica analizar las mismas muestras por diferentes laboratorios. Esta evaluación puede realizarse mediante validación cruzada de muestras entre laboratorios o puede ser organizada por agencias externas. Existen varios programas de calidad que actualmente cubren las pruebas diagnósticas utilizadas en oncología como EMQN, GENQA, ESP u otras.

Estos programas de calidad externos evalúan no sólo el desempeño técnico de producir resultados analíticos a partir de muestras compartidas con todos los laboratorios participantes, sino también la precisión del informe producido (datos incluidos de los pacientes, información sobre las pruebas, precisión de las bases de datos empleadas) así como la interpretación de los resultados genéticos. En el caso del perfil genómico mediante enfoques NGS, esto es de suma importancia ya que la evaluación mutacional puede incluir la detección de variantes patogénicas, pero también VUS o variantes benignas, que deben identificarse correctamente. Por esta razón, en los últimos años algunas evaluaciones de control de calidad se han basado únicamente en la interpretación de variantes (como por ejemplo el control de calidad de interpretación de variantes en los genes *BRCA 1/2*) sin realizar la parte analítica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rehm HL, *et al*. ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. Genet Med. 2013 Sep;15(9):733-47.

2. Gargis AS, *et al*. Assuring the quality of next-generation sequencing in clinical laboratory practice. Nat Biotechnol. 2012 Nov;30(11):1033-6.

3. Cock PJA, *et al*. The Sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa/Illumina FASTQ variants. Nucleic Acids Res. 2010 Apr;38(6): 1767–1771.

4. Endrullat C, *et al*. Standardization and quality management in next-generation sequencing. Appl Transl Genom. 2016 Jul 1;10:2-9.

5. Petrackova A, *et al*. Standardization of Sequencing Coverage Depth in NGS: Recommendation for Detection of Clonal and Subclonal Mutations in Cancer Diagnostics.Front Oncol. 2019 Sep 4;9:851.

6. Jennings LJ, *et al*. Guidelines for Validation of Next-Generation Sequencing Based Oncology Panel - A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists. J Mol Diagn. 2017 May;19(3):341-365.

7. D'Haene N, *et al*. Clinical validation of targeted next generation sequencing for Colon and Lung cancers. PLoS One. 2015;10(9): e0138245.

8. Berwouts S, *et al*. Approaches to quality management and accreditation in a genetic testing laboratory European journal of human genetics. Eur J Hum Genet. 2010 Sep;18 Suppl 1(Suppl 1):S1-19.

Desde un punto de vista clínico, la identificación de las alteraciones genómicas presentes en células tumorales en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico es clave para iniciar el tratamiento más apropiado para cada caso, sobre una base de uso de terapias dirigidas, si es posible, o de terapias no dirigidas en el caso de ausencia de alteraciones moleculares accionables. En la práctica clínica existen diversas estrategias para establecer el diagnóstico de alteraciones genómicas en pacientes con CPNM metastásico. Este diagnóstico puede aproximarse a partir de ensayos que estudian regiones de interés o alteraciones concretas en un gen único, o utilizando técnicas multiplexadas que permiten determinar alteraciones en un panel de genes mediante tecnología de alto rendimiento, que genéricamente conocemos como NGS. Además, en la primera aproximación puede plantearse estudiar de forma secuencial cada uno de los genes relevantes en CPNM, o abordarlos en paralelo, con el fin de reducir los tiempos de respuesta para la decisión terapéutica.

Existe una escasa evidencia disponible sobre las implicaciones económicas comparativas del uso de las diferentes estrategias diagnósticas en CPNM. Existe consenso en que la caracterización molecular en CPNM metastásico, estudiando, al menos, las alteraciones de *ALK*, de *EGFR*, de *KRAS* y PD-L1, es coste-efectiva en esta enfermedad. (1) Un estudio reciente francés comparó la supervivencia en una cohorte observacional de 843 pacientes sin tratamiento previo a partir de dos estrategias: al menos un estado de biomarcadores conocido frente a ninguna prueba de biomarcadores, como referencia, incluyendo los costes directos incurridos por los hospitales respecto al tratamiento, la atención hospitalaria y las pruebas de biomarcadores. La estrategia de conocer al menos un biomarcador demostró una relación costo-efectividad decremental de 13.230 EUR por año de vida, frente a no conocer los biomarcadores. Además, el estudio de biomarcadores fue más efectivo en el 41% de las decisiones de tratamiento que se tomaron. Estos datos, que refuerzan la importancia del diagnóstico molecular en CPNM, han sido confirmados por un estudio en España en el que hemos analizado el coste-efectividad de la caracterización de las alteraciones de ALK en tumores no escamosos o en pacientes no fumadores (2). Incluir *ALK* en el diagnóstico del CPNM proporciona 5.060 años de vida y 3.906 años de vida de calidad ajustados (*quality-adjusted life-years*, QALY) adicionales, frente a no realizar el estudio de *ALK*.

Sin embargo, la disponibilidad de estudios que analicen el impacto del uso de NGS en la medicina de precisión en cáncer es pequeña. En una revisión reciente de estudios de coste-efectividad sobre la NGS en la atención del cáncer sobre 2.037 artículos publicados, encontró que solo 6 trabajos describían resultados de coste-efectividad de la aplicación de NGS con un panel de genes dirigidos en cáncer (3). Tres de ellos evaluaron la rentabilidad de la recomendación de una terapia dirigida para los pacientes según la mutación genética identificada mediante NGS (4,5), mientras que los 3 artículos restantes evaluaron la rentabilidad del uso de NGS como parte del programa de detección para dirigir a los pacientes o familiares de alto riesgo a un tratamiento profiláctico o una vigilancia más estrecha (6,7).

Centrándonos en CPNM, se han comunicado recientemente los resultados de un modelo económico que analiza los tiempos de respuesta, la proporción de pacientes identificados como portadores de alteraciones con o sin terapias aprobadas por autoridades sanitarias, y el coste de las distintas técnicas en pacientes con CPNM en cuatro escenarios (8): 1) diagnóstico en todos los pacientes mediante un panel de NGS que incluyó las dianas fundamentales en este tipo tumoral (*EGFR, ALK, ROS1, BRAF, MET, HER2, RET y NTRK*), 2) diagnóstico gen a gen secuencial para *EGFR, ALK, ROS1 y BRAF,* seguido de una segunda ronda del estudio de alteraciones sin terapias aprobadas (*MET, HER2, RET y NTRK*), en el que se asumía que los ensayos se ordenaban en secuencia, uno a la vez, después de recibir los resultados negativos de la prueba anterior; 3) diagnóstico de exclusión, ordenado por prevalencia de las alteraciones en NSCLC, comenzando, por tanto, por *KRAS*, y en el que una prueba positiva evitaría la necesidad de pruebas adicionales; y 4) un diagnóstico con técnicas convencionales planificado en pruebas simultáneas para detectar alteraciones con terapias aprobadas (*EGFR, ALK, ROS1* y *BRAF*), seguido en los casos negativos por una secuencia de pruebas para detectar alteraciones sin terapias aprobadas (*MET, HER2, RET* y *NTRK*). Las cuatro estrategias incluyeron PD-L1 y otras técnicas de inmunohistoquímica. Los resultados demostraron que la NGS y el diagnóstico con técnicas convencionales planificado en pruebas simultáneas se asociaron a un tiempo de respuesta de, aproximadamente, dos semanas, igual o inferior a las técnicas convencionales siguiendo las otras estrategias. Aunque el coste unitario de la NGS fue más alto que el de las pruebas individuales de un solo gen, el consumo general, que incluyó el coste del ensayo y de aquellas re-biopsias necesarias en los pacientes con CPNM para la tipificación molecular en los que se agotó el material, fue más bajo para NGS.

Un segundo estudio confirma, con un impacto más moderado, la utilidad del uso de la NGS frente a la caracterización molecular gen a gen en CPNM en estadio IIIB y metastásico (9). En una serie retrospectiva de registro de 5.688 pacientes, se confirmó cuando se realizaba NGS frente a aquellos pacientes diagnosticados gen a gen, un incremento de detección de alteraciones de *EGFR* en un 3% y de *BRAF,*

RET, ROS1, HER2 o *MET* en un 8% de los casos. Estos incrementos se tradujeron en un 2% de aumento de uso de terapias dirigidas contra alteraciones moleculares en CPNM, que tuvo como consecuencia una ganancia de 0,2 años de vida.

Las conclusiones de estos estudios apoyan que aumentar el número de pacientes con CPNM metastásico que son evaluados usando NGS resulta en ahorros sustanciales, tanto en tiempo de respuesta como en gastos sanitarios, incluyendo tanto los consumibles como las acciones de intervención sobre los pacientes. Además, el uso de NGS incrementa la identificación en casi un 40% de alteraciones moleculares, para las que, aunque actualmente no se dispone de terapias aprobadas, pueden ser de interés en estudios clínicos y de potencial aplicabilidad en los centros académicos con programas de investigación robustos.

Por lo tanto, en base a los datos disponibles en el análisis de eficiencia y coste-beneficio, la NGS como técnica diagnóstica inicial en CPNM metastásico parece ser la estrategia más económica para el estudio de las alteraciones genómicas en esta enfermedad, tanto en términos de tiempo de respuesta como de costes directos e indirectos. Además, a diferencia de otras estrategias diagnósticas, la NGS permite la detección simultánea, en un solo ensayo, de las alteraciones más frecuentes y de las menos comunes en CPNM. Este hecho es fundamental para la detección de las mutaciones de baja prevalencia, ya que en una estrategia basada en ensayos únicos diagnósticos secuenciales, estas alteraciones son más frecuentemente no estudiadas por diversas razones, entre ellas la priorización del uso de la muestra para las alteraciones de mayor frecuencia o por limitaciones de recursos en el laboratorio.

Esta conclusión es apoyada por un reciente estudio de revisión retrospectiva, que analizó la amplitud del estudio molecular en pacientes con CPNM metastásico no escamoso, en el que se identificó que solo en el 7,7% de los casos se habían analizado las siete alteraciones recomendadas por la *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN): *EGFR, ALK, ROS1, BRAF, MET, RET* y *HER2* (10). En este sentido, el uso de la NGS puede aumentar el número de pacientes evaluados para detectar alteraciones frecuentes y poco frecuentes, proporcionando así una mayor información a los profesionales y a los pacientes para tomar la mejor decisión en cada caso. Como consecuencia, el uso de un análisis molecular exhaustivo puede contribuir a la mejora de los resultados en salud y aumentar la supervivencia de la enfermedad. Sin embargo, no se dispone hasta la fecha de ningún estudio dirigido a comprender mejor el impacto del uso de la NGS frente a otras estrategias sobre los resultados clínicos y la supervivencia. Es, por tanto, un reto que debería ser planteado en ensayos prospectivos futuros, evaluando las implicaciones clínicas de un tiempo de respuesta más reducido o en la detección de mayor número de dianas en el uso de la NGS frente al uso de ensayos gen a gen secuenciales o de exclusión para el inicio de la terapia dirigida.

Estos datos han permitido incluir en diversas guías clínicas o documentos de consenso la recomendación de abordar el diagnóstico de las alteraciones moleculares en CPNM mediante NGS. Las recientes recomendaciones del Grupo de Trabajo en Medicina de Precisión de la Sociedad Europea de Oncología Médica (*ESMO Precision Medicine Working Group*) para el uso de la NGS en pacientes con cáncer metastásico han analizado la utilidad clínica de esta aproximación en la caracterización molecular en diversos tumores en base al número de alteraciones accionables, entre ellos el CPNM (11). Este documento recomienda en CPNM avanzado no escamoso el uso de NGS en muestras de tumor o de plasma con el fin de detectar alteraciones accionables de acuerdo con sistemas de clasificación válidos, como ESCAT u OncoKB. Teniendo en cuenta la alta frecuencia de fusiones génicas en estos tumores, se define que la NGS basada en RNA o la NGS basada en DNA diseñada para capturar tales fusiones son las opciones preferidas. No se recomienda ampliar el estudio a otras alteraciones con un nivel de evidencia más bajo en su aportación de valor adicional desde una perspectiva de salud pública. Deben tenerse en cuenta la aprobación y financiación de la prescripción de los fármacos dirigidos contra diana en cada situación para analizar la rentabilidad en el uso de la NGS. Sin embargo, se recomienda que aquellos hospitales con programas potentes de desarrollo de fármacos y ensayos clínicos realicen NGS en el contexto de programas de cribado molecular.

En la misma línea, otros documentos de consenso apoyan el uso de la NGS. Reciente, un panel de expertos en CPNM de las sociedades oncológicas de China (CSCO), Japón (JSMO), Corea (KSMO), Malasia (MOS), Singapur (SSO) y Taiwan (TOS), ha adaptado las guías de manejo de los pacientes con esta enfermedad al ámbito asiático (12). Sobre la base de la mayor frecuencia de alteraciones genómicas en CPNM en este ámbito geográfico, parece existir una clara recomendación y rentabilidad en el uso de la NGS.

Finalmente, aunque estos estudios sugieren que el diagnóstico molecular en pacientes con CPNM metastásico mediante la NGS es una estrategia más eficiente que los ensayos gen a gen, existen importantes barreras que dificultan adoptar de forma amplia en la práctica clínica el uso de esta tecnología, entre las que destacan la propia organización del sistema sanitario, la ausencia de una política nacional en medicina de precisión que garantice la equidad en el acceso, y la falta de financiación

suficiente en el diagnóstico de las alteraciones somáticas en cáncer. Sin embargo, los avances en la tecnología, el abaratamiento de los costes de la NGS, el impacto en la experiencia del paciente y la economía de los procesos asistenciales, así como la experiencia en países de nuestro entorno y de algunos territorios en España, pueden impulsar el uso clínico de la NGS en los hospitales, reduciendo los costes médicos de forma sustancial y, potencialmente, mejorando los resultados en salud.

BIBLIOGRAFÍA

1. Loubière S, *et al*. Cost-effectiveness of KRAS, EGFR and ALK testing for decision making in advanced nonsmall cell lung carcinoma: the French IFCT-PREDICT.amm study. Eur Respir J. 2018 Mar 15;51(3):1701467.

2. Nadal E, *et al*. Clinical and economic impact of current ALK rearrangement testing in Spain compared with a hypothetical no-testing scenario. BMC Cancer. 2021 Jun 10;21(1):689.

3. Tan O, *et al*. Application of next-generation sequencing to improve cancer management: A review of the clinical effectiveness and cost-effectiveness. Clin Genet. 2018 Mar;93(3):533-544.

4. Doble B, *et al*. Cost-effectiveness of precision medicine in the fourth-line treatment of metastatic lung adenocarcinoma: An early decision analytic model of multiplex targeted sequencing. Lung Cancer. 2017 May;107:22-35.

5. Wallbillich JJ, *et al*. A personalized paradigm in the treatment of platinum-resistant ovarian cancer - A cost utility analysis of genomic-based versus cytotoxic therapy. Gynecol Oncol. 2016 Jul;142(1):144-149.

6. Pennell NA, *et al*. Economic Impact of Next-Generation Sequencing Versus Single-Gene Testing to Detect Genomic Alterations in Metastatic Non–Small-Cell Lung Cancer Using a Decision Analytic Model. JCO Precision Oncology 2019;3:1-9.

7. Gallelo CJ, *et al*. Next-Generation Sequencing Panels for the Diagnosis of Colorectal Cancer and Polyposis Syndromes: A Cost-Effectiveness Analysis. J Clin Oncol. 2015 Jun 20;33(18):2084-91.

8. Bennette CS, *et al*. The cost-effectiveness of returning incidental findings from next-generation genomic sequencing. Genet Med. 2015 Jul;17(7):587-95.

9. Steuten L, *et al*. Cost Effectiveness of Multigene Panel Sequencing for Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. JCO Clin Cancer Inform. 2019 Jun;3:1-10.

10. Gutierrez ME, *et al*. Genomic Profiling of Advanced Non-Small Cell Lung Cancer in Community Settings: Gaps and Opportunities. Clin Lung Cancer. 2017 Nov;18(6):651-659.

11. Mosele F, *et al*. Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with metastatic cancers: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. Ann Oncol. 2020 Nov;31(11):1491-1505.

12. Wu YL, *et al*. Pan-Asian adapted Clinical Practice Guidelines for the management of patients with metastatic non-small-cell lung cancer: a CSCO-ESMO initiative endorsed by JSMO, KSMO, MOS, SSO and TOS. Ann Oncol. 2019 Feb 1;30(2):171-210.

ACRÓNIMOS

ACMG: *American College of Medical Genetics*
ALK: *Anaplasic Lymphoma Kinase*
AMP: *Association for Molecular Pathology*
ASCO: *American Society of Clinical Oncology*
BAG: biopsias con aguja gruesa
BAM: versión binaria comprimida de un *Sequence Alignment/Map*
BRAF: gen humano que codifica la proteína B-Raf
BRCA: *breast cancer*
CAP: *College of American Pathologists*
CBL: citología exfoliativa o citología en base líquida
cDNA: ácido desoxirribonucléico circulante
cfDNA: ácido desoxirribonucléico libre circulante
cfNA: ácidos nucleicos libres circulantes
CNAs: alteraciones en el número de copias
CPNM: cáncer de pulmón no microcítico
CRT: *Cyclic Reversible Termination*
CSCO: Sociedad Oncológica de China
ctRNA: ácido ribonucléico tumoral circulante
DNA: ácido desoxirribonucléico
dNTP: deoxinucleósido trifosfato
EBUS: biopsias guiadas por ultrasonido endobronquial
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico
EMQN: *European Molecular Genetics Quality Network*
ENAC: Entidad Nacional de Acreditación
EQA: controles calidad externos
ESCAT: *ESMO Scale for Clinical Actionability for Mole Targets*
ESMO: *European Society for Medical Oncology*
ESP: *Exome Sequencing Project*
FFPE: tejido fijado con formalina e incrustado en parafina
gDNA: ácido desoxirribonucléico genómico
GENQA: *Genomic Quality Assessment*
HGVS: *Human Genome Variation Society*
HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
IASLC: *The International Association for the Study of Lung Cancer*
IQC: controles calidad internos
ISP: *Ion Sphere Particles*
IVDI: *Vitro Diagnostic Medical Devices*
IVDR: *In Vitro Diagnostic Medical Devices RegulaISPOtion*
JCR: recomendación de consenso conjunto
JSMO: Sociedad Oncológica de Japón
KRAS: *Kirsten rat sarcoma viral oncogene*
KSMO: Sociedad Oncológica de Corea
LOD: *limit of detection*
MET: metionina
MOS: Sociedad Oncológica de Malasia
mRNA: ácido ribonucléico mensajero
MTB: *Molecular Tumor Board*
NCBI: *National Center for Biotechnology Information*
NCCN: *National Comprehensive Cancer Network*
NGS: *next generation sequencing*
NTRK: receptor de la tirosina quinasa neurotrópico
PAAF: punción-aspiración con aguja fina
PBS: solución salina tamponada con fosfato (PBS)
PCR: reacción en cadena de la polimerasa PD-L1: ligando 1 de muerte programada
PF: *passing filter*
PNTs: procedimientos normalizados de trabajo
QALY: *quality-adjusted life-years*
qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RET: gen humano que codifica el protooncogen tirosina-proteína quinasa Ret,
RNA: ácido ribonucléico
ROS1: gen humano que codifica el protooncogen tirosina-proteína quinasa ROS
RPMI: medio del *Roswell Park Memorial Institute*
SBL: *Sequencing By Ligation*
SBS: *Sequencing By Synthesis*
SGC: sistema de gestión de la calidad
SNA: *Single-Nucleotide Addition*
SNVs: *small indels, large indels*
SSO: Sociedad Oncológica de Singapur
SVs: variantes de estructura
TAT: *turnaround time*
TCAG: clave de librería
UDG: uracilo DNA glicosilasa
VAF: frecuencia alélica
VUS: variante de significado incierto

El extraordinario cambio de la medicina de precisión personalizada en el CPNM, gracias al conocimiento de la biología molecular de esta enfermedad y a la identificación de numerosas alteraciones oncogénicas y desarrollo de nuevos medicamentos dirigidos, exige un diagnóstico molecular integral en estos pacientes con el fin de ofrecer el mejor tratamiento. El uso de la secuenciación masiva o next-generation sequencing (NGS) se posiciona como la herramienta fundamental para el estudio de todas las alteraciones genéticas relevantes en el CPNM, con la mayor fiabilidad, menor consumo de recursos y optimización de uso de la muestra. Sin embargo, emergen importantes retos en la implementación de esta NGS en los circuitos asistenciales de nuestros hospitales.

En este documento hemos definido una serie de recomendaciones, en base a nuestra experiencia y de otros expertos en el campo, sobre la indicación del uso de NGS en CPNM, el circuito de pacientes y el proceso de consentimiento informado, recomendaciones sobre la selección y preparación de las diferentes muestras para su estudio por NGS, sobre la selección, validación y verificación de las técnicas empleadas, y sobre la interpretación de los resultados y la transmisión de la información al Comité Multidisciplinar. Finalmente, en este documento también hemos recogido unas reflexiones sobre la importancia de la instauración de Comités Moleculares en los hospitales, con fin de garantizar la mejor interpretación de los hallazgos en la NGS, el cumplimiento de políticas de calidad en este innovador campo, y la evidencia disponible en coste-eficiencia del uso de NGS frente a otras aproximaciones diagnósticas, que creemos pueden ayudar a defender ante los distintos decisores la importancia de esta herramienta y su clara utilidad clínica.

Avalado por:

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

SEOM
Sociedad Española de Oncología Médica
SEOM® es una marca registrada. El aval de SEOM no implica la organización ni financiación del evento

Documento educacional

PEFC 10-31-1247

ES-17017 (Enero 2021)

AZINGenius

AstraZeneca