

LA CALIDAD Y LA ACREDITACIÓN EN EL LABORATORIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA

GRANADA

Del 1 de diciembre de 2011
al 15 de marzo de 2012

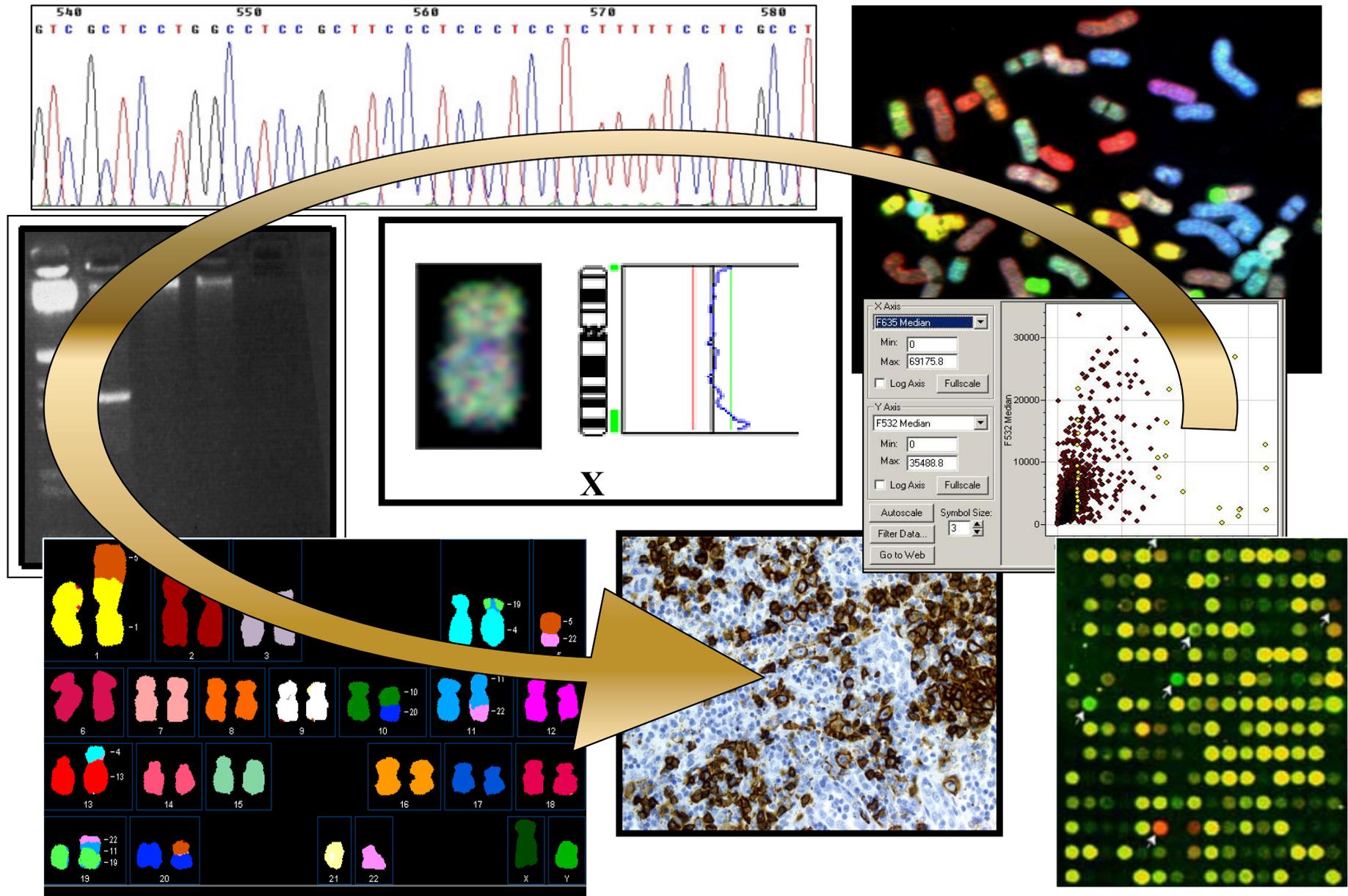


UNIDAD DIDÁCTICA 7: LOS PROCESOS EN ANATOMÍA PATOLÓGICA

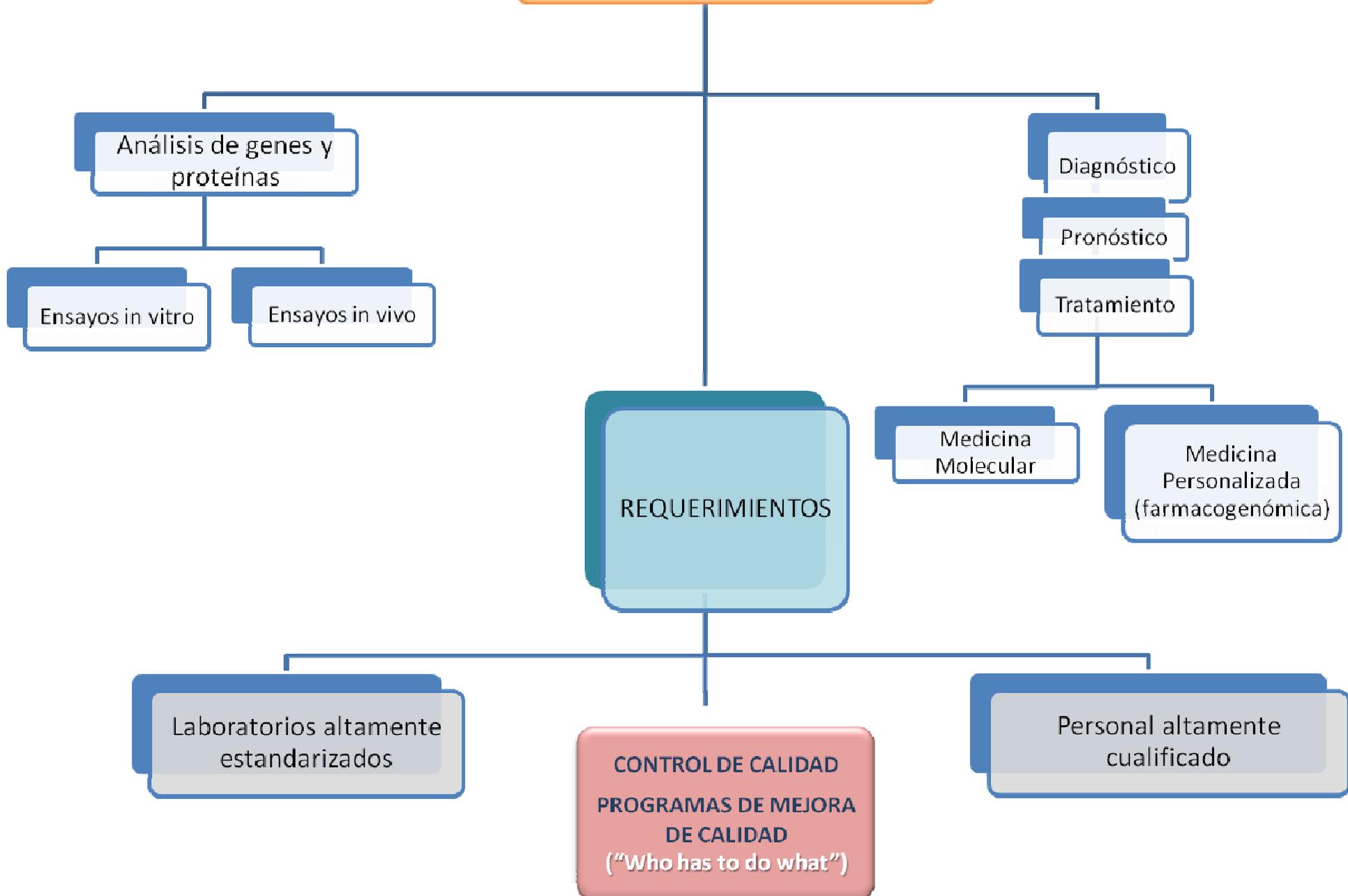
La Patología Molecular y el Control de Calidad

*Asunción Olmo Sevilla
Master Diagnóstica S. L.*

Patología Molecular: Patología del futuro



PATOLOGÍA MOLECULAR



Integración

- Experiencia médica, científica y técnica

Recursos

- Instalaciones, equipamiento y personal

Tecnologías

- Ajustadas a las necesidades

Criterios de calidad

- Programas de Mejora y Control de Calidad

Personal:

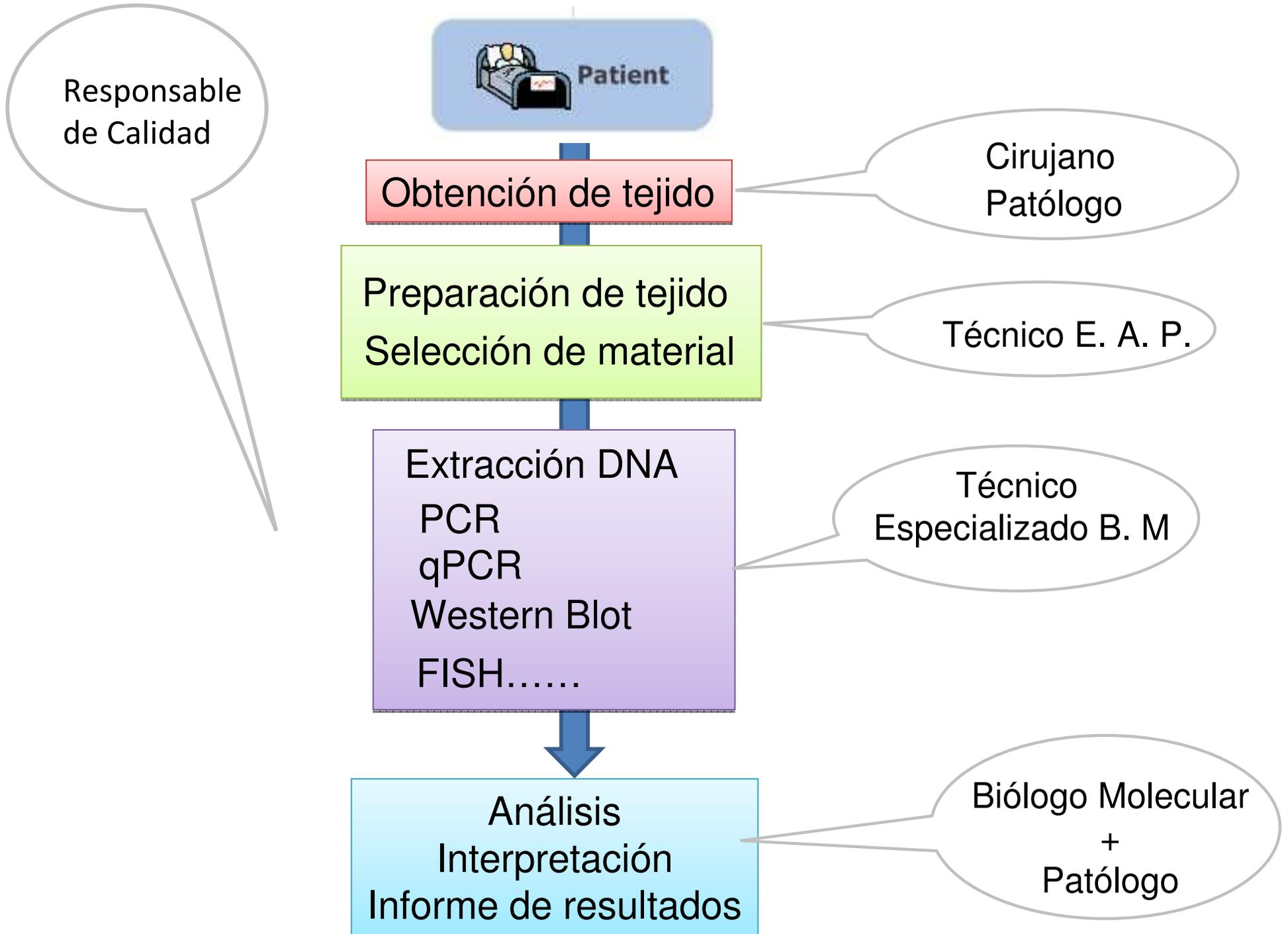
Director Facultativo: Patólogo con amplia formación en Patología Molecular

Responsable Técnico: Licenciado/Doctor/Tecnólogo especializado en Biología Molecular.

Técnicos de laboratorio: Capacitados para técnicas moleculares

Responsable de Calidad: Conocimientos y capacidad de gestión

PROCESOS Y PERSONAL EN PATOLOGÍA MOLECULAR



ORGANIZACIÓN DE LAS ÁREAS DE TRABAJO

Pre-PCR: zona limpia o área de preamplificación

- Recepción y procesamiento de muestras
- Extracción de ácidos nucleicos
- Preparación de reacciones de PCR (cabina con UV)

Post-PCR: zona sucia o área post- amplificación

- Amplificación por PCR
- Análisis de productos (electroforesis, hibridación, secuenciación...)

Área neutra:

- Preparación de reactivos (o prepararlos en cada zona)
- Procesamiento de datos (también en área post-PCR)

OBJETIVOS:

- Minimizar la contaminación de reactivos y muestras clínicas
- Bioseguridad
- Separación de espacios físicos
- Diferentes presiones (positiva en pre- y negativa en post-)

Flujo de trabajo y material unidireccional





GENÉRICO
ESPECÍFICO



MANTENIMIENTO
PREVENTIVO/CORRECTIVO

- Instrucciones recomendadas por fabricante
- Planning con protocolos bien documentados
- Reparación por Servicio Técnico



VERIFICACIONES PERIÓDICAS

- Frecuencia marcada por fabricante
- Periódicas/Sospecha de mal funcionamiento
- Calibraciones regulares



Pre-PCR

- Campana para PCR
- Microcentrífuga
- Baño termostatzado o bloque térmico
- Sistema de extracción automática de ADN
- Micropitetas automáticas: p2, p20, p200, p1000
- Agitador vortex
- Cámaras frigoríficas 4-8 °C y congelador -20°C

Post-PCR

- Equipamiento general:
 - Termociclador
 - Equipo de electroforesis y documentación
 - Equipo de hibridación reversa
 - Baño termostatzado
 - Juego de micropipetas automáticas: p20, p200, p1000
 - Cámaras frigoríficas
- Equipamiento específico:
 - Secuenciadores automáticos
 - Equipos de hibridación de arrays
 - Sistemas de Análisis de Imagen
 - Automatización de procesos

MATERIAL FUNGIBLE:

- Microtubos eppendorfs, Tubos de centrífuga, Pipetas, Puntas de micropipeta, frascos....
 - Siempre **desechables**, de un solo uso.
 - Estériles (**grado “biología molecular”**)
 - Autoclavados ó
 - Con certificado de proveedor de estar **libres de DNAsas y RNAsas**
 - **Puntas de micropipeta con filtro** (evitan contaminaciones por aerosoles de DNA)

REACTIVOS:

- Agua **desionizada ultrapura** y estéril (**grado “biología molecular”**)
- Tampones y soluciones de trabajo: agua ultrapura y estériles
- Kits y reactivos comerciales: no intercambiar componentes/no mezclar lotes
- Trabajar con **alícuotas** :
 - Evita degradación por congelaciones/descongelaciones repetidas (mixs de PCR, polimerasas, dNTPs, primers,...)
 - Evita desechar grandes cantidades ante una contaminación

1. Uso obligatorio de **guantes desechables** en todas las etapas del proceso:

- Bioseguridad para el usuario.
- Impedir que las DNAsas/RNAsas/proteasas de la piel degraden el DNA/RNA o inhiban las técnicas moleculares.
- Evitar contaminaciones con el DNA genómico del usuario.
- Recambio frecuente evita la mayor parte de las contaminaciones.

2. **Precisión** en el pipeteo:

- Manejo de volúmenes muy pequeños: < 1ml (escala de microlitros)
- Errores en volúmenes mínimos (p. ej. 0,5 µl de DNA polimerasa), pueden invalidar un test.

3. **Rigurosidad** en la manipulación de las muestras clínicas:

- Mínimas cantidades de una muestra que pasen a otra pueden contaminar y dar lugar a resultados erróneos (falsos positivos)



➤ Fuentes de contaminación:

- DNA procedente de muestras clínicas
- DNA del usuario (si no trabaja con guantes)
- DNA de productos de amplificación!!!!**

➤ Qué hay que descontaminar:

- Superficies
- Material
- Equipos

➤ Cuándo:

- Diariamente o después de cada uso,
- Cuando se detecte una contaminación en las pruebas diagnósticas

➤ Cómo se elimina el DNA contaminante:

- Lejía diluida (1% en agua) durante 10 min
- Etanol 70% para eliminar los restos de lejía

EL ETANOL NO DESTRUYE EL DNA!!!

LA ESTERILIZACIÓN EN AUTOCLAVE NO DESTRUYE EL DNA!!!

CRITERIOS DE SELECCIÓN

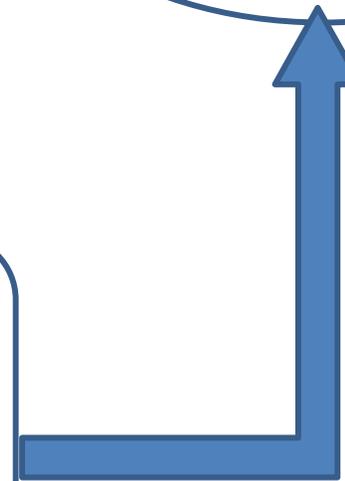
- **Costo/beneficio**
- Selección de la técnica más adecuada:
 - **Información** que aporta
 - **Complejidad**
 - Rapidez
 - **Requerimientos:**
 - Espacios, equipos, material, personal
 - Desarrollo propio/Kits comerciales
 - Manual/**Automatización**

PUESTA EN MARCHA

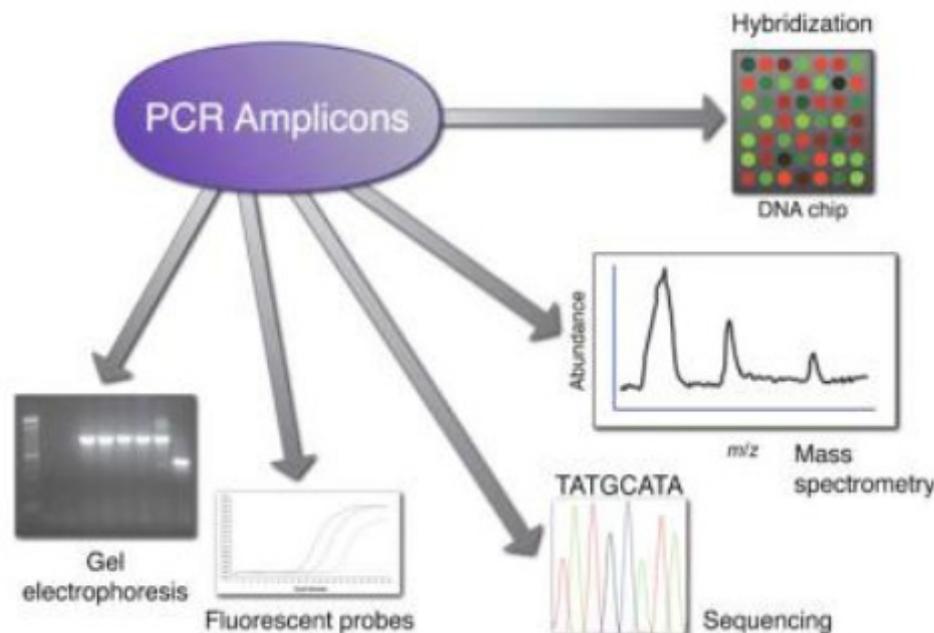
- Protocolo de trabajo
- Formulario de solicitud
- Informe de resultados
- Comunicación a los clínicos
- Controles de calidad

VALIDACIÓN DEL TEST

- **Controles y calibraciones**
 - Reproducibilidad
 - Sensibilidad y especificidad
 - Correlación con datos clínico
- Análisis **comparativo** con otros métodos **gold-estándard**



- La **carga de trabajo** y **conocimientos** que requiere la puesta a punto, validación y control de calidad de métodos caseros (llega a superar los costes de los kits comerciales)
- **Reproducibilidad** y verificación de lotes
- Las **normativas legales** requieren que los diagnósticos sean realizados con métodos aprobados por las Autoridades Sanitarias (Marcado CE IVD)



Programas de Control de Calidad

- **Interno:**
 - Control de sensibilidad y especificidad, validación de resultados, etc.
 - Monitorización de todas las etapas del análisis a través de controles apropiados
- **Externo:**
 - Evaluación de resultados mediante comparaciones periódicas interlaboratorios.

Controles: muestras de **positividad/concentración /calidad** reconocidas que se procesan en paralelo a las muestras de pacientes.

Qué controles?

Cuándo se usan?

Qué aportan?

Qué hacer cuando fallan?

TECNICAS BASADAS EN PCR:

Blanco

- Vial sin DNA (agua/PBS)
- Se procesa en paralelo
- Resultado esperado: **NEGATIVO (AUSENCIA DE SEÑAL)**
- Garantiza :
 - **Correcta manipulación** de reactivos en todas de las etapas del proceso.
 - **Ausencia de contaminación** en reactivos/equipos/superficies

Control negativo

- Muestra de DNA de resultado conocido **negativo** para el test (DNA genómico humano normal)
- Se procesa en paralelo
- Resultado esperado: **NEGATIVO** para el test
- Garantiza :
 - **Correcta manipulación de las muestras**
 - **Especificidad** del test

MEDIDAS ANTE FALLO EN LOS CONTROLES

TECNICAS BASADAS EN PCR:

Blanco

- Resultado esperado: **NEGATIVO**
- Resultado obtenido: **POSITIVO**, causas:
 - **Contaminación** en reactivos/equipos/superficies
- Acciones: **PROTOCOLO DOCUMENTADO**
 - No informar los resultados
 - Desechar todos los reactivos usados
 - Descontaminar superficies/equipos
 - Repetir el control antes de continuar con nuevas muestras

Control negativo

- Resultado esperado: **NEGATIVO**
- Resultado obtenido: **POSITIVO**, causas:
 - **Contaminación** en reactivos/equipos/superficies
 - Falta de especificidad de la técnica
- Acciones: **PROTOCOLO DOCUMENTADO**
 - No informar los resultados
 - Desechar reactivos
 - Descontaminar superficies/equipos
 - Verificar la especificidad del test

CONTROLES PARA ASEGURAR FIABILIDAD DE RESULTADOS

TECNICAS BASADAS EN PCR:

Control positivo

- Muestra de DNA de resultado conocido **positivo** para el test
 - (Muestra real ó DNA sintético/plasmídico)
- Resultado esperado: **POSITIVO**
- Garantiza:
 - **Procedimiento técnico** correcto
 - **Calidad de los reactivos** empleados en la técnica
 - **Fiabilidad** de los resultados de las muestras problema

Control interno de amplificación

- Gen humano constitutivo: beta-globina, GAPDH....
- Se amplifica para cada muestra, en la misma mix
- Resultado esperado: **POSITIVO**, independiente del resultado del test
- Garantiza :
 - **Calidad y cantidad** del material de partida (**tejidos parafinados!!!**)
 - Ausencia de **inhibidores** de la reacción de PCR

MEDIDAS ANTE FALLO EN LOS CONTROLES

TECNICAS BASADAS EN PCR:

Control positivo

- Resultado **esperado**: POSITIVO
- Resultado **obtenido**: **NEGATIVO**, causas:
 - **Reactivos defectuosos**
 - **Errores técnicos**
- **Acciones**: **PROTOCOLO DOCUMENTADO**
 - No informar los resultados
 - Verificar caducidades/lotes usados en el test
 - Revisar protocolo

Control interno de amplificación

- Resultado **esperado**: POSITIVO
- Resultado **obtenido**: **NEGATIVO**, causas:
 - Ausencia de DNA en la muestra (problemas extracción de DNA/material insuficiente)
 - **Mala calidad del DNA (muestras parafinadas)**
 - Presencia de inhibidores (muestras hemáticas)
- **Acciones**: **PROTOCOLO DOCUMENTADO**
 - No informar los resultados
 - Repetir el test

- Revisiones externas periódicas y documentadas de la metodología y resultados
- Evaluar por un centro de referencia externo:
la calidad pre-analítica, analítica y post-analítica (**sensibilidad y especificidad**)
- Comparativa interlaboratorios : fiabilidad, reproducibilidad y mejora calidad de diagnóstico



GARANTIA DE CALIDAD

SEAP Sociedad Española de Anatomía Patológica

Garantía de Calidad en Patología de la SEAP (GCP):

Módulo de Patología Molecular 2011:

Mutaciones KRAS/BRAF

Mutaciones EGFR

Detección del virus HPV

Amplificación Her2-neu

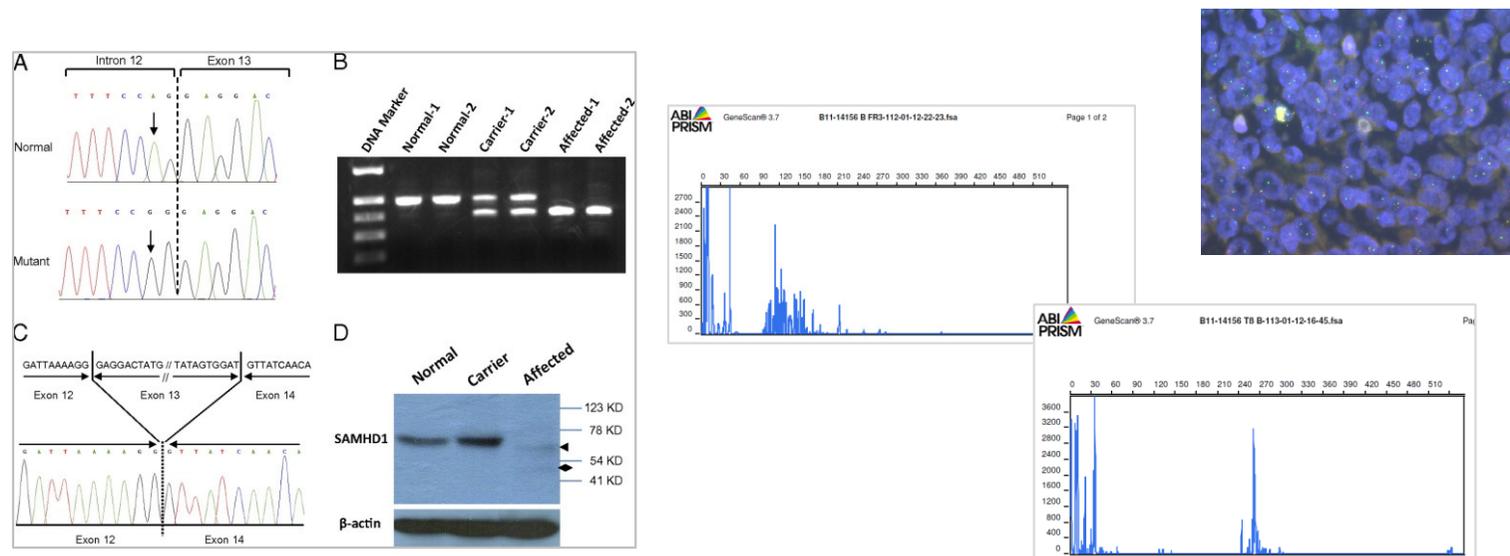


ESP European QA Program

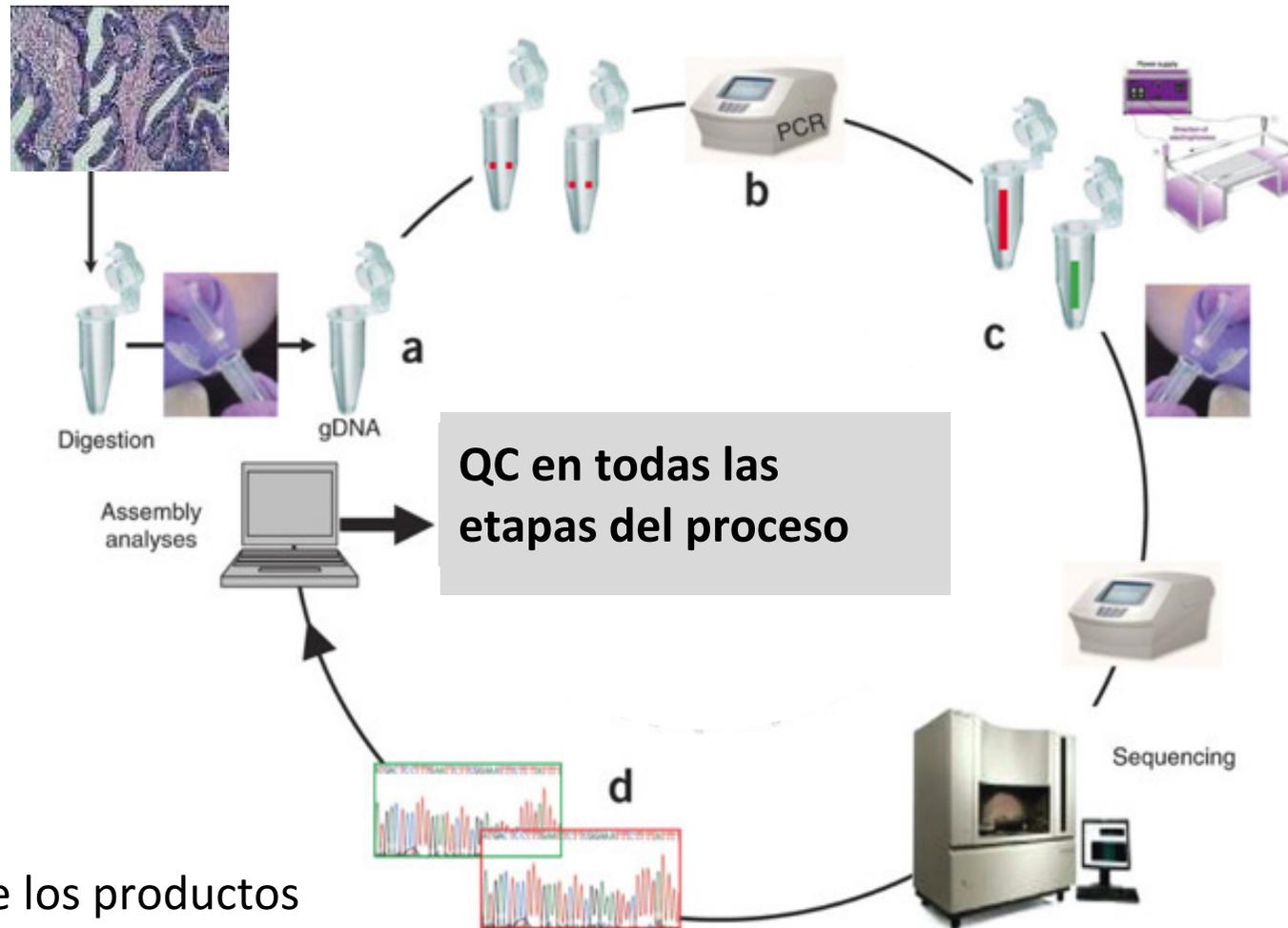
KRAS European Quality Assurance Program

DOCUMENTACIÓN DE LOS RESULTADOS:

- Los **resultados brutos** del test: electroferogramas, imágenes de geles, secuencias, autorradiogramas,.. deben ser de **suficiente claridad y calidad** para que su interpretación sea unívoca.
- Se requiere la **documentación de las condiciones del ensayo**, lote de reactivos y cantidad y calidad del DNA empleado.
- Para los ensayos in situ (**FISH**), los resultados deben mostrar una clara correlación con los **hallazgos histopatológicos** del tejido (H&E)
- Todos los resultados brutos se deben **adjuntar con el informe final** y con la **interpretación clínica** de los resultados.
- Sólo deben informarse los resultados con resultados adecuados de controles+/-



ANÁLISIS MUTACIONAL DE KRAS POR SECUENCIACION



Cualquiera de los productos intermedios que resulten del proceso de trabajo se deben controlar

—
QC de reactivos en todas las etapas

ANÁLISIS MUTACIONAL DE KRAS

Material de partida

Extracción de DNA

Amplificación por PCR

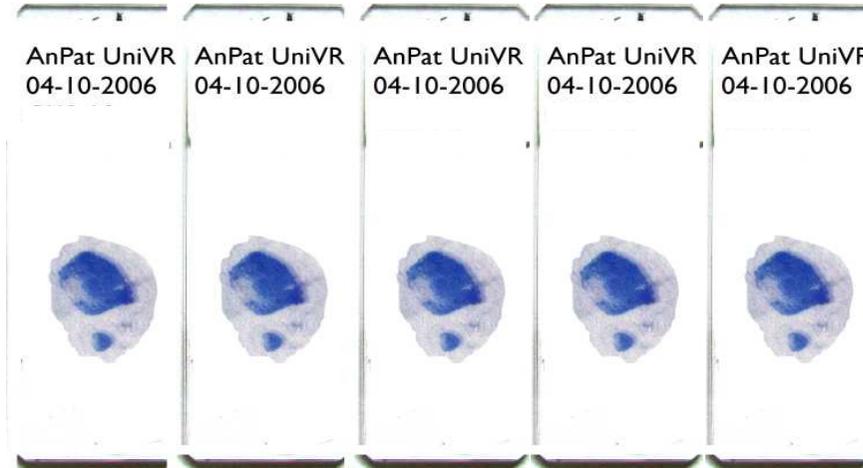
Análisis de mutaciones

Secciones de tejido

1 H.E.

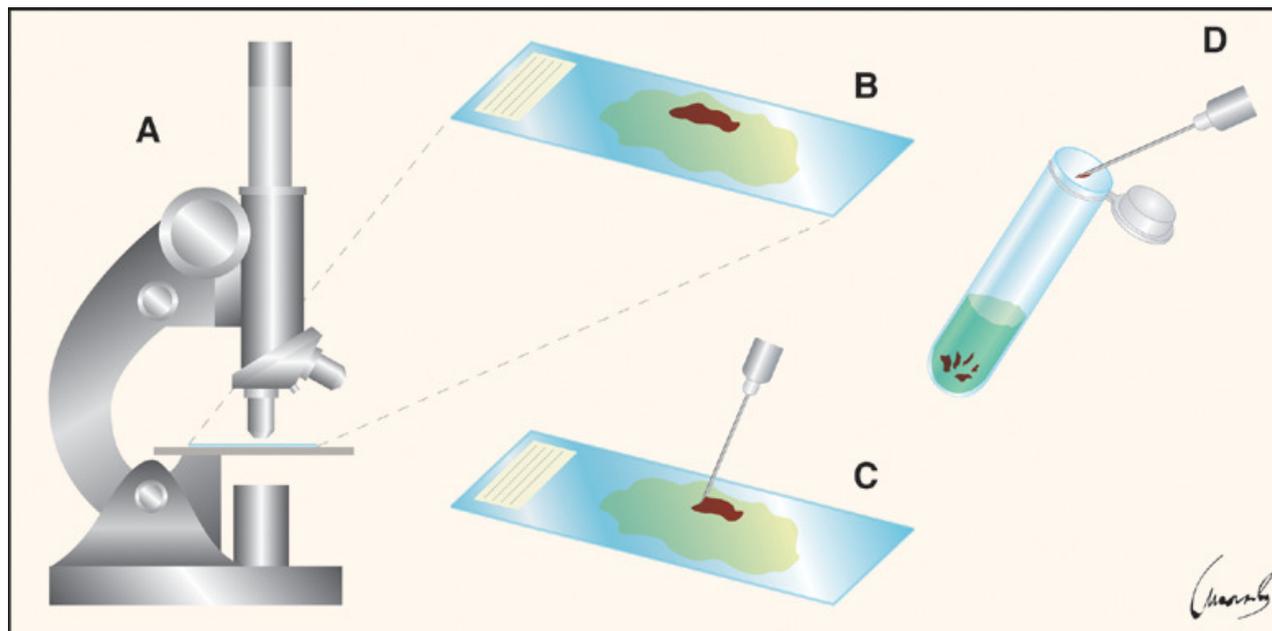


5 sections 20 μ m-thick

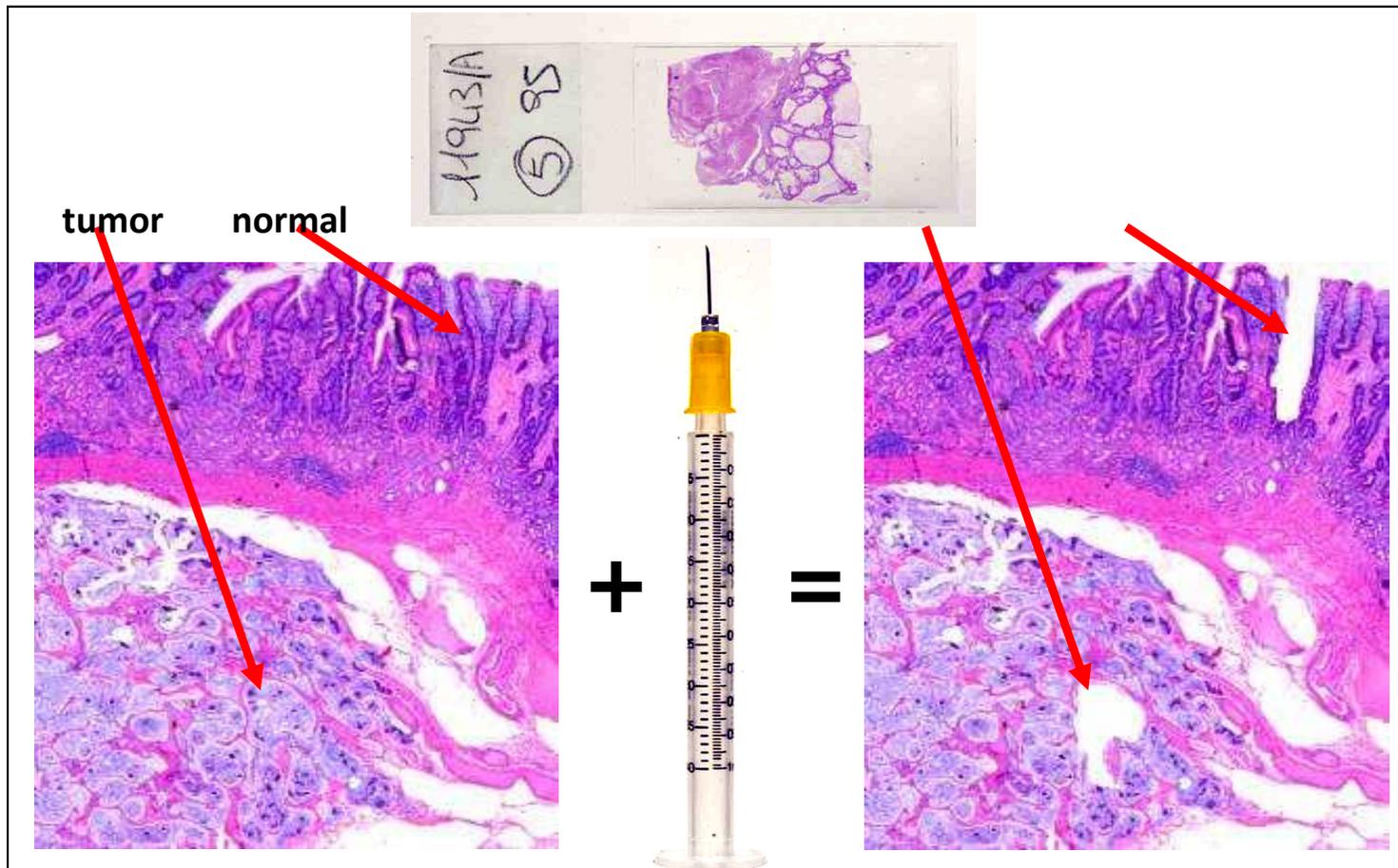


QC Tejido

Examen microscópico por el patólogo



Microdissección (concentrar el tumor)



ANÁLISIS MUTACIONAL DE KRAS

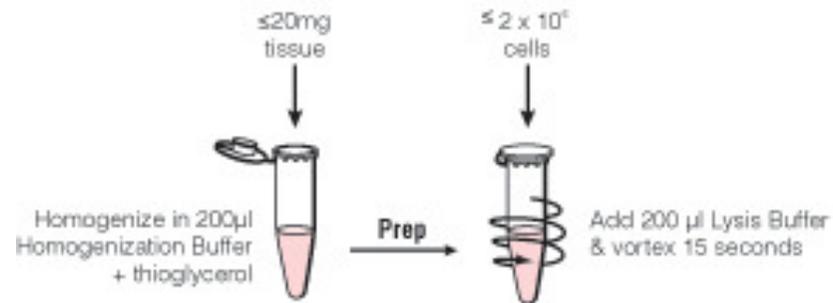
Material de partida

Extracción de DNA

Amplificación por PCR

Análisis de mutaciones

Extracción automática de DNA de Tejidos parafinados



Purify

QC: Blanco sin DNA



Control de calidad DNA
(concentración y pureza)

ANÁLISIS MUTACIONAL DE KRAS

Material de partida

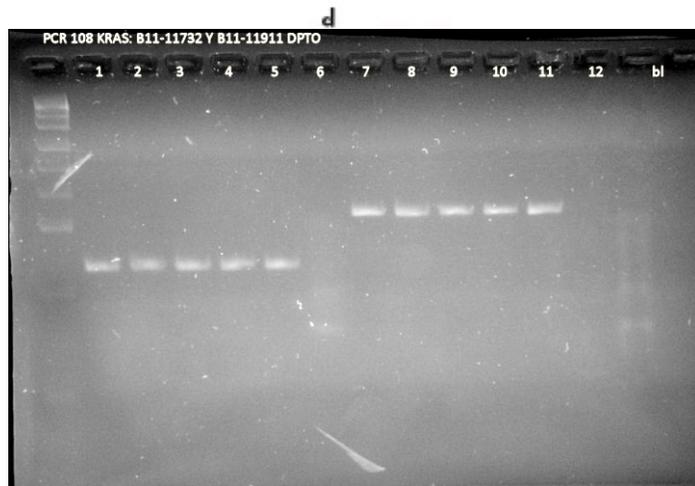
Extracción de DNA

Amplificación por PCR

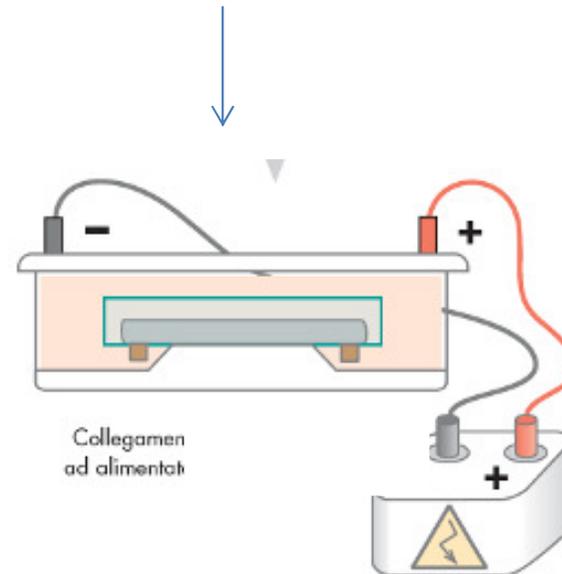
Análisis de mutaciones

Amplificación del DNA por PCR

QC1: Blanco sin DNA
QC2: Blanco de PCR
QC3: Control Negativo



Agarose Gel



ANÁLISIS MUTACIONAL DE KRAS

Material de partida

Extracción de DNA

Amplificación por PCR

Análisis de mutaciones



LABORATORIO (Local - 211)

Avda. de la Constitución 20.

18012 Granada

CÓDIGO: [REDACTED]



REF. MD: M11-03743

(Página 1/1)

Entregar a: [REDACTED]

Informe Laboratorio Anatomía Patológica

DATOS DEL PACIENTE: [REDACTED]

EDAD: 39

TIPO DE MUESTRA: SECCIONES DE TEJIDO PARAFINADO SOBRE P.

Sexo: Masculino

CENTRO REMITENTE: [REDACTED]

MÉDICO REMITENTE: [REDACTED]

Recibido: 03/11/2011

DATOS CLÍNICOS:

Sin datos

Muestra: A MUTACIONES KRAS RECTO (NEOM)

Se reciben 4 cristales y hematoxilina con nº de identificación: B11-11732

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

La pirosecuenciación de los codones 12, 13 y 61 se llevó a cabo por triplicado (Pyromark Q24, Qiagen). Los resultados se analizaron automáticamente con el software Pyromark Q24 2.0.6.

Nota: En el test se incluyen todas las mutaciones del gen KRAS descritas hasta el momento en cáncer colorectal. El método de secuenciación utilizado ha sido validado con ensayos teóricos y casos clínicos. Un resultado negativo del test no excluye la presencia de una mutación.

INFORME:

MICROSCOPIA: El análisis microscópico de la muestra ha mostrado un 10 % de células tumorales. La muestra es adecuada para análisis mutacional de KRAS

ANÁLISIS MUTACIONAL DE KRAS: La muestra analizada según protocolo adjunto es **POSITIVA** para la mutación c.38G>A: p.Gly13Asp (p.G13D) del codón 13 del gen KRAS

PROTOCOLO:

EXTRACCIÓN DE DNA: Maxwell® 16 FFPE Tissue LEV DNA Purified Kit (PROMEGA).

PCR: Cebadores específicos para amplificar el exón1 (contiene los codones 12 y 13) y el exón 2 (contiene el codón 61).

PIROSECUENCIACIÓN: optimizada para detectar e identificar las siguientes mutaciones puntuales:

Codon 12:

c.34G>A: p.Gly12Ser (p.G12S); c.34G>T: p.Gly12Cys (p.G12C); c.34G>C: p.Gly12Arg (p.G12R);

c.35G>A: p.Gly12Asp (p.G12D); c.35G>T: p.Gly12Val (p.G12V);, c.35G>C: p.Gly12Ala (p.G12A)

Codon 13:

c.37G>A: p.Gly13Ser (p.G13S); c.37G>C: p.Gly13Arg (p.G13R);

c.38G>A: p.Gly13Asp (p.G13D); c.38G>C: p.Gly13Ala (p.G13A);

Codon 61:

c.181C>G: p.Gln61Glu (p.Q61E); c.182A>T: p.Gln61Leu (p.Q61L); c.182A>G: p.Gln61Arg (p.Q61R);

c.183A>T: p.Gln61His (p.Q61H); c.183A>C: p.Gln61His (p.Q61H)

Técnicas aplicadas:

ANÁLISIS MUTACIONAL DEL GEN K-RAS

Facultativo: Asunción Olmo Sevilla

Informado: 17/11/2011

Fecha de Salida: 17/11/2011