



Fundación JL Castaño  
**SEQC**

**SEQC<sup>ML</sup>**  
Sociedad Española de Medicina de Laboratorio

2017-2018

## APLICACIONES CLÍNICAS DE LAS TÉCNICAS ACTUALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Ed. Cont. Lab. Clin 37: 69 - 75

---

### **CONTROL DE CALIDAD EN ESTUDIOS GENÉTICOS DE ENFERMEDADES HEREDITARIAS. EMQN.**

**Josep Oriola Ambròs.**

*Servei de Bioquímica i Genètica Molecular. CDB. Hospital Clínic. Barcelona.*

*Departament de Biomedicina. Facultat de Medicina. Universitat de Barcelona.*

#### **INTRODUCCIÓN**

Durante los años 90 se fueron descubriendo muchos de los genes implicados en el desarrollo de enfermedades hereditarias (1). Los laboratorios que ya disponían de la infraestructura necesaria para la realización de dichos estudios, ya estuviesen localizados en Universidades o en Hospitales, empezaron a poner a punto técnicas de genética molecular para poder ofrecer un diagnóstico genético de dichas enfermedades.

Con el paso del tiempo, la mejora metodológica facilitó que el número de laboratorios que realizaban estos análisis fuese aumentando. A finales de los 90 ya se constató la necesidad de uniformar la nomenclatura de los cambios genéticos y de estandarizar la forma de redactar los informes. Fue así como surgió en 1998 la *European Molecular Genetics Quality Network* (EMQN) (2). Entre 1999 y 2002, esta entidad se financió gracias a una beca de la Comisión Europea. A partir de entonces se financia a través de los laboratorios que participan en los controles de calidad. Inicialmente la EMQN empezó con una prueba piloto para el diagnóstico genético de la enfermedad de Huntington y en años posteriores se fueron añadiendo otras pruebas, y actualmente ya se ofrece la participación en más de 30 pruebas hereditarias, entre ellas, el cáncer de mama y el cáncer de colon. También se han incluido controles de calidad para el análisis de mutaciones somáticas, estudio del ADN circulante y controles metodológicos como la secuenciación. La EMQN tiene la acreditación ISO 17043.

El procedimiento para participar anualmente en los controles de calidad de la EMQN es el siguiente: un laboratorio (representado por una persona física) se inscribe para participar en un test (ej: cáncer de mama hereditario). Este laboratorio recibirá tres muestras diferentes de DNA, con sus tres respectivas solicitudes en las cuales se explica el motivo por el que se solicita cada uno de los análisis. Estos casos ficticios pueden ser: un caso índice, un

---

caso familiar asintomático, un caso familiar sintomático o una muestra de vellosidad de corion, entre otros supuestos. A partir de esta información, el laboratorio debe procesar estas muestras igual que lo haría si fuesen solicitudes reales. Una vez procesadas las muestras (secuenciación por Sanger, secuenciación masiva, MLPA, TP-PCR, etc., según lo que corresponda) y una vez encontradas o no mutaciones, deben realizarse los tres informes (ver más adelante redacción del informe). Habitualmente, el tiempo desde que se reciben las muestras hasta que se deben enviar los informes vía web, es algo más de dos meses.

En la EMQN, hay un grupo de asesores que son especialistas para cada una de las pruebas genéticas. Una vez realizados los informes, estos se envían a través de la web y son evaluados por los asesores que valoran online los casos analizados por todos los laboratorios que han participado en esta prueba (ver más adelante criterios de evaluación).

Posteriormente, todos los asesores de las diferentes pruebas se reúnen físicamente en una determinada ciudad y es allí donde los asesores de cada grupo de trabajo revisan, caso por caso, las evaluaciones realizadas online, con el fin de detectar posibles errores o discrepancias entre sus evaluaciones. Al final se aplica una sola nota para cada caso estudiado. Al cabo de unos días, se puede descargar de la web la valoración que se ha obtenido (con contraseña), así como el motivo de las penalizaciones, si las hay. Se envía también a todos los participantes un resumen global del procedimiento que se ha seguido para la evaluación de los informes, que incluye las observaciones más importantes, los errores más comunes, así como indicaciones o consejos para la mejora de las metodologías utilizadas y de los informes. El laboratorio evaluado, si no está de acuerdo con la puntuación, puede apelar y al cabo de unos días recibe la respuesta por parte del comité evaluador acerca de si su apelación ha sido aceptada o no.

En total, para cada informe se evalúan tres aspectos independientes con sus respectivas puntuaciones, una para cada uno de los siguientes apartados: 1) metodología y resultado, 2) interpretación y 3) errores de escritura en el informe.

## **REDACCIÓN DEL INFORME**

En el informe deben constar: el número de laboratorio de referencia (este número lo asigna la EMQN), el nombre y apellido del paciente, la fecha de nacimiento, el sexo, la fecha de recepción de la muestra, el tipo de muestra (DNA liofilizado, DNA procedente de línea celular linfoblastoide, etc), el lote (por cuestiones de cantidad, se utilizan diferentes DNAs de diferentes pacientes, aunque todos con la misma alteración genética), el profesional que solicita el análisis y la fecha en la que se ha redactado el informe. A continuación, debe explicarse la razón por la que se solicita el estudio genético. Al final del informe debe constar la firma del Facultativo responsable y debe especificarse el Centro donde se ha realizado el estudio. En el caso de los controles externos del EMQN, la firma debe ser ininteligible y tampoco debe describirse el Centro, ya que los informes deben ser evaluados anónimamente.

## Metodología:

En este apartado debemos describir que hemos estudiado un determinado gen y cómo lo hemos estudiado. Debemos especificar el transcrito utilizado como por ejemplo el NM con su versión última (el NM significa *Natural mRNA* y es un número de identificación de la secuencia de referencia del GeneBank), o el LRG si lo tiene (del inglés, *Locus Reference Genomics*). Esta especificación es relevante pues el mismo cambio genético podría ser descrito diferente según el transcrito utilizado y esto podría dar lugar a errores en la localización del cambio genético por parte de otros laboratorios que estudiaran a familiares. Como ejemplo de la trascendencia de ello comentamos el caso del gen *BRCA1* cuya descripción de los cambios genéticos, durante mucho tiempo se utilizó la referencia U14680 que presenta 119pb extras en la región 5'. Este hecho puede incluso conducir a errores de asociación entre el cambio genético y el exón. Es común que en informes antiguos de estudios genéticos de *BRCA1* y *2* no conste la referencia utilizada, por lo que ante el estudio de un caso familiar debemos pensar en la posibilidad de que el cambio esté descrito según la referencia U14680 o la referencia NM\_007294 (recomendada por la EMQN). Si esto no se tuviera en cuenta, podríamos analizar una región que no es la que incluye la mutación y la informaríamos como no portadora al no detectarla, con las consiguientes consecuencias.

En el informe debe detallarse el procedimiento mediante el cual se ha realizado el estudio genético. Habitualmente se realiza amplificación por PCR y secuenciación Sanger. Deben especificarse las regiones estudiadas de cada gen (ej: región promotora y exones del 1 al 10), mencionando que también se han estudiado las regiones que flanquean a los exones estudiados. No es necesario detallar los *primers* utilizados. Actualmente ya son frecuentes los análisis que se realizan mediante secuenciación masiva y en tal caso debe especificarse el kit utilizado y las coberturas mínimas. También, si corresponde, debe describirse si se ha realizado el estudio de deleciones/duplicaciones mediante el MLPA y el kit utilizado. Si no se ha realizado, y éste fuera necesario para la caracterización del gen analizado debe especificarse en el informe en las limitaciones del estudio, así como cualquier otra carencia (ej: región promotora no estudiada, etc.). En los análisis de expansiones (ej: X frágil) debe también especificarse la metodología utilizada (ej: TP-PCR, Southern, etc.).

## Resultado (genotipo):

Debemos remarcar que, en este apartado se debe especificar lo observado en el estudio genético, ya sean cambios puntuales, pequeñas deleciones, inserciones, inserciones/deleciones (indels), grandes deleciones, etc. Aunque se trate de una enfermedad con herencia dominante no debe darse por supuesto que el cambio se ha encontrado en heterocigosis. Debe especificarse si se encuentra en homocigosis o heterocigosis para todos los cambios detectados que se recogen en el informe.

Debemos pensar que lo que detectamos no es el cambio de aminoácido sino el cambio de nucleótido, por lo que no podemos escribir, por ejemplo: se detecta el cambio de una Va-

lina por una Leucina en el codón 315, sino que debemos escribir el cambio de nucleótido, que es lo que realmente detectamos. A continuación, podemos describir que este cambio de nucleótido predice un cambio de aminoácido, un codón de parada, un cambio en el marco de lectura, una alteración del splicing, etc. Los cambios en un intrón (ej: c.410+1G>T) deben describirse como un cambio localizado en el intrón y no localizado en el exón. Este error se suele cometer cuando los cambios están muy cercanos a un exón.

La nomenclatura a utilizar debe ser la de la *Human Genome Variation Society* (HGVS) (3). Es importante, revisar de vez en cuando dicha web pues se va actualizando a menudo. El programa MUTALYZER (4) nos puede ayudar a predecir el efecto del cambio genético a nivel proteico si éste está en la zona codificante. Si detectamos grandes deleciones/duplicaciones puede utilizarse la nomenclatura de la HGVS, pero dado que resulta bastante engorrosa, la EMQN acepta también la descripción de la alteración de una forma descriptiva, por ejemplo: se observa una deleción en heterocigosis, que afecta a los exones del 3 al 5.

### **Interpretación:**

En la interpretación de los resultados debe especificarse en primer lugar si el sujeto estudiado presenta o no, un cambio genético. Si presenta un cambio genético (que ya se habrá descrito en el apartado anterior), debe describirse la predicción de este cambio, es decir, el impacto en la función de la proteína (da lugar a cambio de aminoácido, a un codón de parada, etc.). Si el cambio está descrito en la literatura debe especificarse que se confirma la sospecha clínica y que és el causante de la enfermedad, añadiendo las referencias bibliográficas. Si hay estudios funcionales, estos deben ser referenciados. Si el cambio no está descrito, se deben detallar los argumentos por los que pensamos que es compatible con la enfermedad (ej: otros cambios descritos en el mismo codón, cambio en el marco de lectura, programas *in silico*, ExAC, ClinVar, etc.).

Al realizar la interpretación debemos tener en cuenta si se trata de un caso índice (diagnóstico), de un familiar afectado (diagnóstico), de un familiar no afectado por la enfermedad (predictivo), de un familiar de un caso afectado de una enfermedad recesiva (portador) o de un prenatal (vellosidad de corion o líquido amniótico). En el caso predictivo no podemos decir que el estudio genético "confirma" el diagnóstico, pues se trata de una persona asintomática. Debemos decir que esta persona tiene alto riesgo (depende de la penetrancia de cada enfermedad) de desarrollar las manifestaciones del síndrome.

También debemos tener en cuenta que las enfermedades hereditarias presentan generalmente pleiotropía y en el caso de estudiar un caso índice o un caso familiar afectado del que nos informan que manifiesta solamente una característica clínica, en el informe debemos explicitar que la persona estudiada también presenta riesgo de desarrollar otras manifestaciones del síndrome. En este apartado debe mencionarse el tipo de profesional al que debe acudir la persona estudiada, por ejemplo, en el caso de cáncer de colon el consultante estudiado debe ser referido al servicio de oncología para un seguimiento y asesoramiento genético de su enfermedad.

También debe recomendarse estudio genético en cascada de la familia, estén afectados o no. En el primer caso para confirmar o no la enfermedad (debemos pensar que puede haber fenocopias). Debe especificarse el riesgo de ser portadores del cambio genético, por ejemplo, en enfermedades dominantes es del 50 % y de que sean portadores de ambas mutaciones en enfermedades recesivas es del 25 % en el caso de que ambos padres sean portadores heterocigotos. También en enfermedades recesivas debe tenerse en cuenta que si uno de los padres está afectado (dos mutaciones) y su cónyuge es portador, el riesgo de que tengan un hijo con ambas mutaciones es del 50 %. Si se dan probabilidades erróneas o se confunde el patrón hereditario de la enfermedad, la penalización es la máxima. En enfermedades recesivas debe valorarse la posibilidad de que, si se detectan dos mutaciones, estas puedan encontrarse en cis y no en trans.

- Es habitual que al estudiar un gen encontremos diferentes polimorfismos más o menos frecuentes en la población general. Sólo se debe informar del cambio genético responsable de la enfermedad. Los polimorfismos no deben ser informados.

## LIMITACIONES

En el informe deben especificarse las limitaciones del análisis realizado si las hay. Por ejemplo, que no hayamos estudiado una determinada parte de un gen (ej: una región promotora) o si no hemos realizado el MLPA. En el caso de no haber detectado ningún cambio genético debemos evaluar si se deberían estudiar otros genes que también pueden ser responsables de la patología estudiada. En tal caso, debemos explicitarlo.

## ERRORES DE ESCRITURA EN EL INFORME

Es habitual que, al realizar informes, tengamos ya unas plantillas hechas para facilitar su realización. Esto, sin embargo, puede dar lugar a errores en el copiar-pegar. Los informes siempre deben hacerse sin prisas y repasando detenidamente lo que se ha escrito. Algunos de los errores más comunes están en la escritura de los nombres (ej: Jorge vs Jogre) y apellidos (Giménez vs Jiménez), en la fecha de nacimiento (1978 vs 1987) o las inconsistencias entre diferentes partes del informe (ej: al inicio se describe el paciente como Maria y posteriormente como Susana) porque hemos utilizado un informe anterior.

## CRITERIOS DE EVALUACIÓN

En cada informe, cada uno de los apartados (metodología y resultado, interpretación, errores de escritura) se puntúa sobre 2,0. Las penalizaciones, dependen del error cometido. El error mínimo descuenta -0,25 y el máximo -2,0. Hay unos criterios de evaluación que son los mismos en todas las pruebas, como por ejemplo el hecho de no mencionar las limitaciones del test realizado o los errores tipográficos. El resto de criterios son mayoritariamente específicos de cada prueba. Los informes, por ejemplo, para cáncer de colon y

cáncer de mama tendrán unos criterios parecidos (enfermedades dominantes), y también para hiperplasia adrenal congénita y fibrosis quística (enfermedades recesivas). Estos serán bastante diferentes de los criterios para la enfermedad de Huntington o el Síndrome del X frágil (enfermedades debidas a expansiones). En el informe final que se envía cada año a todos los participantes de una determinada prueba, están especificados todos los criterios aplicados. Estos criterios pueden variar un poco anualmente, en función de los escenarios en los que se plantean las tres muestras.

## CONSEJOS

Es importante empezar enseguida los análisis. Cuando se reciben las muestras uno piensa que tiene mucho tiempo por delante, y al final es muy posible que se acabe corriendo y como consecuencia, haciéndolo mal.

Si a los pocos días de empezar el análisis se observa que, por diferentes razones, no se tiene suficiente muestra, puede pedirse nueva muestra. Si han pasado bastantes días es muy posible que la EMQN ya no tenga muestra sobrante para reenviar.

Poner mucho cuidado con la permuta de muestras. De los tres casos que se envían, puede que dos correspondan a hermanos. El resultado por ejemplo es que uno es portador de la mutación y el otro no. Obviamente, debe tenerse especial cuidado en la identificación de las muestras. Este error se observa en pocos casos, pero no debería ocurrir nunca ya que las consecuencias son dobles: además del error en la muestra inicial se estudiarán las personas que no deben ser estudiadas y no se analizarán las que sí deben ser estudiadas.

El informe debe ser de una sola página. Son frecuentes los informes con dos o más hojas en los que parte de su contenido es un copiar-pegar de información no relevante. Además, si se pierde una hoja, el informe queda incompleto. Toda la información necesaria para la redacción de un buen informe cabe perfectamente en una sola página y en casos excepcionales, si se necesita más espacio, puede imprimirse por ambas caras y así se mantiene todo en una sola hoja. Todo lo explicado aquí está básicamente en relación con la participación en la EMQN pero la intención principal es que se haga lo mismo con los estudios e informes que realizamos en nuestra práctica diaria.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1.- <http://www.omim.org/statistics/entry>
- 2.- <https://www.emqn.org/emqn/Home>
- 3.- <http://varnomen.hgvs.org/>
- 4.- <https://mutalyzer.nl/>

---

## COMISIÓN DE GENÉTICA

**Presidenta:** Pilar Carrasco Salas.

**Miembros:** Concepción Alonso Cerezo, Ana Cuesta Peredo, Orland Diez Gibert, Begoña Ezquieta Zubicaray, Hada Macher Manzano, Jesús Molano Mateos, Josep Oriola Ambròs, Raquel Rodríguez López, Atocha Romero Alfonso, Ana M<sup>a</sup> Sánchez de Abajo, María Santamaría González (*coordinadora*), Cristina Torreira Banzas.

## ACTIVIDADES FORMATIVAS DEL COMITÉ DE EDUCACIÓN

D. Balsells, B. Battikhi , R. Deulofeu, M. Gassó, N. Giménez, A. Merino, A. Moreno, A. Peña, N. Rico, M. Rodríguez (*Presidente*), MC. Villà.

ISBN 978-84-697-4013-2 – Junio 2018 (recibido para publicación Junio 2017).