

Eficacia de la secuenciación masiva para el diagnóstico y seguimiento de enfermedades oncohematológicas

Efficacy of the next generation
sequencing in the diagnosis and
follow up oncohematologic
diseases

INFORMES, ESTUDIOS E INVESTIGACIÓN

INFORMES DE EVALUACIÓN DE TECNOLOGÍAS SANITARIAS



MINISTERIO
DE SANIDAD, SERVICIOS SOCIALES
E IGUALDAD



RED ESPAÑOLA DE AGENCIAS DE EVALUACIÓN
de Tecnologías y Prácticas de Salud



Comunidad
de Madrid

Dirección General de Planificación,
Investigación y Formación
CONSEJERÍA DE SANIDAD

Eficacia de la secuenciación masiva para el diagnóstico y seguimiento de enfermedades oncohematológicas

Efficacy of the next generation
sequencing in the diagnosis
and follow up oncohematologic
diseases

INFORMES, ESTUDIOS E INVESTIGACIÓN

INFORMES DE EVALUACIÓN DE TECNOLOGÍAS SANITARIAS

Eficacia de la secuenciación masiva para el diagnóstico y seguimiento de enfermedades oncohematológicas.
Efficacy of the next generation sequencing in the diagnosis and follow up oncohematologic diseases. Ana Clara Zoni Matta, Joaquín Martínez López. Madrid. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Unidad de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de la Comunidad de Madrid. 2015

1 Archivo PDF - (Informes, Estudios e Investigación).

NIPO: 680-17-030-8

Enfermedades oncohematológicas
Secuenciación de segunda generación
Secuenciación masiva paralela IPO



Dirección: Paloma Arriola Bolado

Autores: Ana Clara Zoni Matta, Joaquín Martínez López

Coordinación y gestión del proyecto: Unidad de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de la Comunidad de Madrid. (Brezmes A, López M, Mendieta JM)

Apoyo y gestión documental: Álvarez N, Redondo JC

Este documento se ha realizado al amparo del convenio de colaboración suscrito por el Instituto de Salud Carlos III, organismo autónomo del Ministerio de Economía y Competitividad, y por la Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid, en el marco del desarrollo de actividades de la Red Española de Agencias de Evaluación de Tecnologías Sanitarias y Prestaciones del SNS, financiadas por el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad.

Edita: Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad
Unidad de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de la Comunidad de Madrid. D. G. de Planificación, Investigación y Formación
Maquetación: Boletín Oficial de la Comunidad de Madrid

NIPO: 680-17-030-8

Este documento puede ser reproducido en todo o en parte, por cualquier medio, siempre que se cite explícitamente su procedencia.

Para citar este informe: Zoni Matta A.C., Martínez López, J. Eficacia de la secuenciación masiva para el diagnóstico y seguimiento de enfermedades oncohematológicas. Madrid. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Unidad de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de la Comunidad de Madrid. 2015. Informes de Evaluación de Tecnologías Sanitarias

Eficacia de la secuenciación masiva para el diagnóstico y seguimiento de enfermedades oncohematológicas

Efficacy of the next generation
sequencing in the diagnosis
and follow up oncohematologic
diseases

Declaración de intereses

Los autores declaran que no tienen intereses que puedan competir con el interés primario y los objetivos de este informe e influir en su juicio profesional al respecto

Acrónimos y abreviaturas

- ADN: ácido desoxirribonucleico
ARMS-PCR: Amplification Refractory Mutation System Polymerase Chain Reaction
ARN: ácido ribonucleico
ASO-PCR: Allele-Specific Oligonucleotide Polymerase Chain Reaction
AUnETS: Agencias y Unidades de Evaluación de Tecnologías Sanitarias españolas
CGH: hibridación genómica comparada (Comparative Genomic Hybridization)
CIE-O-3: Clasificación Internacional de Enfermedades para Oncología, tercera revisión
CFM: citometría de flujo multiparamétrica
CNV: variantes en el número de copias (Copy Number Variations)
ERM: enfermedad residual mínima (MRD, Minimal Residual Disease)
EOH: enfermedades oncohematológicas
EOH-L: enfermedades oncohematológicas linfoides
EOH-M: enfermedades oncohematológicas mieloides
FISH: hibridación in situ fluorescente (Fluorescence in Situ Hybridization)
Ic: incidencia cruda
LLA: leucemia linfoblástica aguda
LLC: leucemia linfática crónica
LMA: leucemia mieloide aguda
CFM: citometría de flujo multiparamétrica (MFC, multiparametric flow cytometry)
MM: mieloma múltiple
NGS: secuenciación de segunda o nueva generación (Next Generation Sequencing)
PCR: reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
PRISMA: Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses
SG: supervivencia global (OS, Overall Survival)
SHM: hipermutación somática
SMD: síndrome mielodisplásico
SMP: secuenciación masiva paralela

SNV: variantes de nucleótido único (single nucleotide variants)

SUV: variantes de la normalidad de significado desconocido

TP: tiempo de progresión (TTP, Time To Progression)

WES: secuenciación del exoma completo (Whole-Exome Sequencing)

WGS: secuenciación del genoma completo (Whole-Genome Sequencing)

Índice

Resumen	9
Abstract	13
Introducción	17
Características detalladas de la NGS	19
Objetivos	23
Objetivo general	23
Objetivos específicos	23
Métodos	25
Tipo de estudio	25
Estrategia de búsqueda	25
Selección de los estudios	25
Criterios de inclusión	25
Criterios de exclusión	27
Análisis de la evidencia	27
Extracción de datos	27
Resultados	29
Resultados de la búsqueda	29
Diseño y características de los estudios incluidos	29
Resultados sobre efectividad	32
Discusión	35
Conclusiones	37
Anexos	39
Anexo 1. Estrategia de búsquedas	39
Anexo 2. Nivel de calidad de la evidencia científica	40

Anexo 3. Herramienta Quadas (Quality Assessment Diagnostic Accuracy Studies)	41
Anexo 4. Diagrama de flujo PRISMA 2009.....	42
Anexo 5. Motivo de exclusión de los estudios excluidos	43
Anexo 6. Tablas de evidencia científica: características de los estudios incluidos	44
Bibliografía.....	57

Resumen

Título: Eficacia de la secuenciación masiva para el diagnóstico y seguimiento de enfermedades oncohematológicas.

Autor/es: Ana Clara Zoni Matta, Joaquín Martínez López

Agencia: Unidad de evaluación de tecnologías sanitarias de la Comunidad de Madrid

Persona de contacto: Paloma Arriola Bolado

Fecha: Octubre 2015

Idioma: Español

Tipo de publicación: Informe de evaluación de tecnologías sanitarias. Revisión sistemática

Páginas: 64

Nº Referencias: 38

Tipo de tecnología: Diagnóstica

Palabras clave: Revisión sistemática, enfermedades oncohematológicas, Secuenciación de segunda generación, secuenciación masiva paralela.

Antecedentes: La Secuenciación de segunda o nueva generación (NGS) parece ser de gran relevancia para fines diagnósticos y pronóstico de enfermedades oncohematológicas (EOH), como alternativa a las técnicas de secuenciación de primera generación, las técnicas citogenéticas moleculares y de hibridación genómica comparada (CGH) arrays.

En general, tanto el diagnóstico, como el pronóstico y el tratamiento de elección para los pacientes con EOH se basan en la presencia o ausencia de alteraciones genéticas específicas. La NGS está proporcionando nuevos aspectos y perspectivas en estas áreas. Dentro de las ventajas de la utilización de estas técnicas en las EOH, se destaca su alta sensibilidad y la aceleración de descubrimientos biológicos y biomédicos, permitiendo comprender mejor la patogénesis, precisar el diagnóstico y realizarlo más rápidamente, identificar nuevas mutaciones somáticas submicroscópicas con significado pronóstico, clasificar la agresividad y el tratamiento efectivo desde el diagnóstico y experimentar con tratamientos personalizados. Sin embargo, tiene como dificultad la interpretación de la detección de variantes de la normalidad con significado desconocido (SUV) y el análisis computacional de los datos obtenidos con sentido clínico, sumado a los altos costes de instrumentación inicial y costes globales.

Objetivo: Evaluar la eficacia de la secuenciación masiva (NGS), en comparación con una prueba de referencia o secuenciación convencional y citogenética, para el diagnóstico y seguimiento de enfermedades oncohematológicas.

Metodología: Se realizó una revisión sistemática de la literatura científica de acuerdo con los criterios de elaboración de revisiones sistemáticas de la declaración PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses). La búsqueda bibliográfica se hizo en diferentes bases de datos electrónicas MEDLINE (PubMed), Embase y la base de datos de revisiones sistemáticas de Cochrane. También se realizó una búsqueda manual de la bibliografía de los estudios finalmente incluidos. La última fecha de búsqueda fue el 8 de junio de 2015.

Resultados: La búsqueda identificó un total de 649 citas. Tras aplicar los criterios de inclusión y exclusión se incluyeron cinco artículos. Todos los estudios se publicaron después del año 2013.

En cuanto al diseño, un estudio fue cohortes retrospectivo y cuatro fueron series de casos prospectivos. En cuatro estudios se realizaron las pruebas en personas con leucemia linfocítica crónica (LLC) y en uno en personas con mieloma múltiple (MM). La suma total de pacientes en todos los artículos fue de 945, 812 pacientes con LLC y 133 con MM. En ninguno de los artículos se consideró a la muestra representativa. Respecto al riesgo de incurrir en sesgos, tres estudios no realizaron o no informaron de la utilización de las pruebas en paralelo y ninguno de los estudios reportó interpretar los resultados de forma enmascarada. Un estudio podría estar incurriendo en sesgo de verificación parcial y ninguno de los estudios ha incurrido en sesgo de verificación diferencial.

En relación a los resultados, ningún estudio tuvo como objetivo comparar la efectividad de la técnica NGS con su prueba de referencia. La mayoría de los estudios tuvieron como objetivo identificar una determinada mutación y/o analizar el estado mutacional y su correspondencia con la clínica. Un estudio analizó el seguimiento y el valor pronóstico de la enfermedad residual mínima (ERM) utilizando distintas pruebas. Por lo tanto, los resultados se obtuvieron a partir de comparaciones indirectas.

Los resultados comparados fueron los siguientes: (1) número de pacientes con la mutación NOTCH1 c.7541_7542delCT en pacientes con LLC, encontrándose mayor número cuando se realizó la NGS (145 vs 49 con ARMS-PCR y 25 con SANGER); (2) número de mutaciones TP53 y número de pacientes con dicha mutación en pacientes con LLC. La NGS confirmó los resultados de las mutaciones identificadas por las pruebas de referencia (FASAY, DHPLC y AmpliChip) e identificó 24 pacientes con mutaciones adicionales de bajo nivel (<10% de ADN) y 8 pacientes con mutaciones de muy bajo nivel no detectadas por las otras pruebas; (3) número de mutaciones TP53 detectadas y número de pacientes con dicha mutación en pacientes con LLC. La NGS detectó 85 vs 35 (SANGER) mutaciones y a 46 pacientes con mutaciones en comparación con los 28 con SANGER. Por otra parte, la NGS detectó 50 mutaciones subclonales de TP53 que fueron

validadas mediante AS-PCR; (4) estado de hipermutación somática (SHM) y el reporte del gen dominante IGHV en pacientes con LLC, con resultados idénticos obtenidos en ambas pruebas (NGS y SANGER). Se observaron discordancias pequeñas en cuanto al porcentaje de mutaciones, pero sin afectar al resultado clínico final. La máxima diferencia de mutación identificada fue de 2,2%; (5) valoración del seguimiento y evaluación del valor pronóstico de la ERM en pacientes con MM. La concordancia entre la NGS y la citometría de flujo multiparamétrica (CFM) fue del 83% con un r^2 de 0,58. Cinco pacientes dieron positivos con CFM y negativos con NGS, de los cuales sólo uno había progresado en el momento de la publicación. Doce pacientes que fueron negativos con CFM y positivos con NGS tuvieron un TP intermedio (mediana de 50 meses, $P= 5,05$) en comparación con los casos con ERM con NGS negativa. La concordancia entre NGS con ASO-PCR fue del 85% con un r^2 de 0,54. El grado de concordancia según el coeficiente de correlación entre NGS y las dos pruebas diagnósticas fue moderado.

Conclusiones: La evidencia disponible sobre la eficacia de la secuenciación masiva (NGS) para el diagnóstico y seguimiento de EOH, en comparación con una prueba de referencia de secuenciación convencional y citogenética no es concluyente, es escasa y de calidad baja/moderada. Se necesitan estudios de mayor calidad, cuyo objetivo sea comparar la efectividad entre pruebas y que sean diseñados para ese fin, con un número más elevado de participantes. También se necesitan estudios de evaluaciones económicas que valoren la eficiencia en comparación con las demás técnicas de secuenciación.

Por lo tanto, los autores consideran que se necesitan más publicaciones y con diseños de mayor calidad, para definir si la NGS es una prueba menor, igual o más efectiva, para el diagnóstico y seguimiento de EOH comparando con las técnicas actuales.

Abstract

Title: Efficacy of the next generation sequencing in the diagnosis and follow up oncohematologic diseases

Authors: Ana Clara Zoni, Joaquín Martínez

Agency: Unidad de evaluación de tecnologías sanitarias de la Comunidad de Madrid

Contact: Paloma Arriola Bolado

Date: October 2015

Language: Spanish

Publication type: Health Technology Assessment. Systematic review

Pages: 64

N° References: 38

Technology: Diagnostic

Key words: Systematic Review, hematologic malignancy, next generation sequencing, high throughput sequencing

Background: Next generation sequencing (NGS) seems to be an important technique for diagnostic purposes and prognosis of oncohematologic diseases (OHD), as an alternative to first-generation sequencing, molecular cytogenetic techniques and CGH arrays.

In general, both the diagnosis and prognosis and the treatment of choice for patients with OHD are based on the presence or absence of specific genetic alterations. The NGS is providing new aspects and perspectives in these areas. Among the advantages of using these techniques for OHD it can be noted the high sensitivity and the acceleration of biological and biomedical discoveries, allowing a better understanding of the pathogenesis, to identify new somatic submicroscopic mutations with prognostic significance, to classify the aggressiveness and to make effective treatment from the diagnosis and experiment with personalized treatments.

However, it is difficult to interpret the detection of unknown variants (SUV) and the computational analysis of data obtained with clinical sense, coupled with the high cost of initial implementation and overall costs.

Objective: The objective of the study was to evaluate the efficacy of the Next Generation Sequencing (NGS) comparing with the gold standard test for diagnosis and monitoring oncohematologic diseases.

Methodology: A systematic review of the literature according to the criteria of developing systematic reviews of the PRISMA statement (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) was performed. The literature search was done in different electronic databases: MEDLINE (PubMed), Embase and the database of systematic reviews of Cochrane.

Bibliographies hand searching of the studies included were also finally realized. The last search date was June 8, 2015.

Results: The search identified a total of 649 abstract. After applying the inclusion and exclusion criteria 5 full article were included. All studies were published after 2013.

In terms of design, one study was a retrospective cohort and 4 were prospective case series. Most of tests (four studies) were conducted on people with chronic lymphocytic leukemia (CLL) and 1 was in people with Multiple Myeloma (MM). The sum of patients of all articles was 945: 812 CLL and MM 133. None of the articles had a representative sample. Regarding the risk of incurring bias, 3 studies made or did not report the use of parallel testing and none of the studies included reported to interpret in a masked way the results. One study could be incurring on partial verification bias and none of the studies has incurred on differential verification bias.

Regarding to the results, any study aimed to compare the effectiveness of the NGS with the gold standard test. Most studies aimed to identify a particular mutation and/or to analyze the mutational status and their correspondence with the clinic. One study analyzed the minimal residual disease (MRD) as monitoring and prognostic value, and compared the results obtained through different test. Therefore, the results were obtained from indirect comparisons.

The comparative results between tests were the following: (1) number of patients with the NOTCH1 c.7541_7542delCT mutation in patients with CLL, being much more when NGS was performed (145 vs 49 ARMS-PCR and 25 SANGER); (2) number of TP53 mutations and the number of patients with this mutation in CLL patients. The NGS confirmed the results of the mutations identified by the gold standard tests (FASAY, DHPLC and AmpliChip) and detected 24 patients with additional low-level TP53 mutations occurring below 10 % of DNA and 8 patients with very low level TP53 mutations occurring under the detection limit of all tested methods; (3) number of TP53 mutations identified and number of patients with this mutation in CLL patients. The NGS detected 85 vs 35 (SANGER) mutations and 46 patients with mutations compared to 28 with SANGER. Moreover, the NGS detected 50 subclonal TP53 mutations that were validated by AS-PCR; (4) the State of Somatic Hypermutation (SHM) and the report of the IGHV dominant gene in patients with CLL, had identical results with both tests (NGS and SANGER). In many cases, small discordances in the percentage of mutation reported were observed between the two methods, but in no case did the discordance affect the final clinical result. The maximum difference in percentage mutation identified in this study was 2.2% and in no case did the difference alter the final result with respect to SHM

status; (5) the monitoring and evaluation of the prognostic value of MRD in patients with MM. The concordance between the NGS and multiparametric flow cytometry (MFC) was 83% with an r^2 of 0.58. Five patients were positive with MFC and negative with NGS, of which only one had progressed at the time of publication. Twelve 12 patients were negative by MFC but still remained positive by sequencing, and they had an intermediate TTP (median 50 months, $P=0.05$, for the comparison with sequencing negative cases). The concordance between NGS with ASO-PCR was 85% with an r^2 of 0.54. These results reflect a moderate degree of concordance.

Conclusions: The available evidence on the efficacy of the next generation sequencing in the diagnosis and follow up OHD, compared to a gold standard test (cytogenetic and conventional sequencing) is not conclusive, is scarce and with low or moderate quality. More publication whit higher quality, aimed to comparing the efficacy between the tests, with the design made for that purpose and with a higher number of participants are needed. Economic evaluation studies that assess the efficiency compared to other sequencing techniques are also necessary.

Therefore, the authors believe that more publication are needed and with higher quality design for quality to define whether the NGS is a smaller, equally or more effective for the diagnosis and monitoring of the OHD compared with the current testing techniques.

Introducción

Las tecnologías de *secuenciación de segunda o nueva generación* (NGS, por sus siglas en inglés) están revolucionando el diagnóstico genético. Constituyen diversas técnicas que identifican diferencias en las secuencias de ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN) complementario de un individuo al compararlo con uno de referencia.¹

La NGS es idónea para abordar la complejidad mutacional de los tumores, además de permitir la detección de alteraciones de tipo somático presentes en porcentajes bajos en las muestras, e incluso detectar inversiones, una clase de variación cuyo estudio resulta muy complicado para la mayoría de las otras técnicas.² La NGS es de gran relevancia para fines diagnósticos como alternativa a las técnicas de secuenciación de primera generación, las técnicas citogenéticas moleculares y de CGH arrays.³

En la actualidad, la secuenciación tradicional de ácidos nucleicos se realiza con el *método Sanger*, también conocido como método de los terminadores de cadena o dideoxi. Este método permite identificar la secuencia de solo una región de ADN en cada lectura/carrera. Es un proceso laborioso, que consume mucho tiempo y recursos humanos. Para realizar esta técnica, es esencial disponer de un ADN de cadena simple (molde) y un iniciador, denominado cebador. Este cebador se utiliza como sustrato de la enzima ADN polimerasa I que va a extender la cadena con nucleótidos marcados con fluorescencia, copiando de forma complementaria el molde de ADN y revelando la secuencia analizada. Necesita cantidades relativamente grandes de ADN para evaluar un solo gen y la coordinación y la compilación de los resultados de varias plataformas de análisis en un informe integrado.³⁻⁵

La citogenética convencional (estudio de los cromosomas mediante bandas G) se utiliza para el análisis del cariotipo de las células tumorales. Requiere un número adecuado de metafases de buena calidad y no puede detectar cambios submicroscópicos ni reorganizaciones cromosómicas que impliquen zonas del cromosoma con un análisis de bandas similar. Esta se complementa con otras técnicas, como la **hibridación in situ fluorescente (FISH)** y la **hibridación genómica comparada (CGH)**. La FISH permite determinar aneuploidías, microdeleciones, duplicaciones, inversiones, así como la adjudicación de un marcador genético a un cromosoma (cartografía genética). Usa segmentos de una única hebra de ADN que son tintados, o etiquetados, con una sustancia fluorescente que puede ligarse a un cromosoma específico; estos segmentos de ADN son llamados sondas. Las sondas hibridan con el ADN del paciente en la zona analizada, emitiendo una señal luminosa visible con el microscopio de fluorescencia. Esta técnica tiene una

gran especificidad, sensibilidad y rapidez ya que también puede utilizarse en interfase y no necesita cultivo celular. No puede detectar pequeñas deleciones y mutaciones.⁶ La CGH identifica y analiza alteraciones genéticas del tipo de ganancia o pérdida de material genético entre una muestra de ADN en comparación con una muestra de referencia y tampoco requiere de cultivo celular previo. Necesita una proporción de células malignas mínima del 25%. Permite la detección de variantes en el número de copias (CNV) de todo el genoma con una resolución 50 veces más alta que la citogenética. Detecta anormalidades cromosómicas en un 15-20% de las muestras (siendo de un 4% mediante análisis clásico del cariotipo). En general, no detecta los reordenamientos balanceados generales, los mosaicismos de bajo nivel y la poliploidía. A diferencia de la FISH, puede detectar anormalidades cromosómicas que no han sido descritas antes y detectar copias simultáneamente en múltiples loci del genoma.⁷

Respecto a las técnicas convencionales, el avance más importante con la NGS es la enorme cantidad de datos que puede producir, con el consecuente reto de poder almacenarlos y procesarlos. El análisis secundario y terciario de las secuencias, mediante software específicos es imprescindible.¹ Con la NGS el coste por base secuenciada disminuye drásticamente respecto a la secuenciación Sanger, cuando el número de muestras y/o el número de regiones secuenciadas son altos. La NGS permite secuenciar miles de regiones de ADN no sólo de un paciente, sino de hasta 384 muestras simultáneas de distintos pacientes en función de la plataforma que se utilice. Dependiendo del número de genes analizados, la profundidad de análisis y de la plataforma, se pueden estudiar paneles de entre 10 y 500 genes en grupos de entre 1-50 pacientes simultáneamente. A su vez posee mayor sensibilidad, desde un límite de detección de 15-20% de carga tumoral con las técnicas actuales, a la detección de mutaciones presentes en un 1% con esta nueva tecnología. La calidad de alineamiento y ensamblaje de las secuencias respecto al de referencia son fundamentales para evitar falsos positivos, mientras que las secuencias no alineadas pueden ser fuente de falsos negativos.²

Las enfermedades oncohematológicas (EOH) forman un grupo de entidades heterogéneas que tienen en común su origen en un trastorno hematopoyético. La tercera revisión de la Clasificación Internacional de Enfermedades para Oncología (CIE O-3)⁸ las clasifica en dos grupos principales en función del linaje celular: enfermedades oncohematológicas linfoides (EOH-L) y mieloides (EOH-M). Se ha estimado una incidencia cruda (Ic) europea para el período 2000-2002, de 29,64 casos con EOH-L por 100.000 habitantes (IC95%: 29,41-29,86) y una Ic de 9,73 casos con EOH-M por 100.000 habitantes (IC95%: 9,60-9,86).⁹

En general, tanto el diagnóstico como el pronóstico y el tratamiento de elección para los pacientes con EOH se basan en la presencia o ausencia

de alteraciones genéticas específicas. La NGS está proporcionando nuevos aspectos y perspectivas en estas áreas. Numerosas publicaciones señalan las ventajas de la utilización de estas técnicas en las EOH, por su alta sensibilidad y porque han acelerado descubrimientos biológicos y biomédicos, permitiendo comprender mejor la patogénesis, precisar el diagnóstico y realizarlo más rápidamente, identificar nuevas mutaciones somáticas submicroscópicas con significado pronóstico, clasificar la agresividad de una EOH y seleccionar el tratamiento efectivo desde el diagnóstico y experimentar con tratamientos personalizados.^{6,7,10,11} Sin embargo, tiene como dificultad la interpretación de la detección de variantes de la normalidad con significado desconocido (SUV) y el análisis computacional de los datos obtenidos con sentido clínico, sumado a los altos costes de instrumentación inicial y costes globales.^{3,6,7}

Debido a los avances tecnológicos en el desarrollo de técnicas de secuenciación de segunda generación, la evidencia de mejora del proceso de diagnóstico molecular y la demanda creciente por disponer de NGS en los centros sanitarios, es conveniente ofrecer a los profesionales sanitarios la mejor información disponible en la literatura científica, que valore el rendimiento diagnóstico y de seguimiento de la NGS, con las ventajas e inconvenientes de su utilización respecto a las técnicas de secuenciación de primera generación, las técnicas citogenéticas moleculares y de CGH arrays.

Características detalladas de la NGS

Definición de NGS: obtención de las secuencias correspondientes a fragmentos diferentes de ADN o ARN/ADN complementario presentes en una muestra de forma simultánea y sin necesidad de una separación previa de los mismos.

Sinónimos: ultrasecuenciación de alta capacidad (ultra-high-throughput sequencing), secuenciación de nueva generación o de segunda generación (Next Generation Sequencing, NGS), secuenciación profunda (deep sequencing) y secuenciación masiva paralela (Massive Parallel Sequencing, MPS).

Sensibilidad: se pueden obtener miles de lecturas de cada base por lo que tiene capacidad para alcanzar una alta sensibilidad, limitada por la tasa de error de la tecnología: (a) mutaciones puntuales (sustituciones o inserciones-delecciones) alrededor del 1%; (b) genes quimera, reordenamientos de gen o inserciones-delecciones de varias bases alrededor de 10^{-5} .

Flujo de trabajo: Si bien cada plataforma NGS tiene diferentes características, el esquema principal de trabajo es conceptualmente similar para todas ellas e incluye los siguientes pasos:

1. Preparación de librerías a partir de ADN o ARN.
2. Amplificación clonal de los fragmentos de ácidos nucleicos presentes en la librería.
3. Secuenciación de los fragmentos.
4. Análisis primario/secundario: traducción de las señales registradas en datos/ alineamiento y ensamblaje de las lecturas.

1. Preparación de librerías

Definición de librería: serie de fragmentos de ADN o ARN a cuyos extremos se une una pareja de oligonucleótidos, cuya secuencia es característica de cada tecnología de secuenciación comercializada, llamados adaptadores.

Técnicas de incorporación de adaptadores: frecuentemente mediante ligasas, también como colas de los cebadores en librerías de productos de PCR.

Multiplexado de muestras: el oligonucleótido unido a los fragmentos incluye además del adaptador una secuencia identificativa de cada muestra (10-12 pb, \geq (pb, \leq 96) diferentes secuencias).

Tipos de librerías:

–Según tipo de ácido nucleico:

- genoma (ADN genómico o mitocondrial): WGS (Whole-Genome Sequencing).
- exoma (exones de genes conocidos, facultativamente se incluyen otras regiones de interés): WES (Whole-Exome Sequencing).
- de regiones o genes diana (ADN o ARN): resecuenciación dirigida.
- transcriptoma (ARN mensajero)
- small RNA (miRNA, siRNA, piRNA y otros ARN no codificantes)

La WES permite la identificación de la secuencia completa del ADN de una muestra dada, al nivel de resolución de una sola base. En cambio, la secuenciación del exoma está precedida por una etapa de captura que selecciona las regiones del genoma a codificar (aproximadamente 1% del genoma).

–Según metodología:

- con fragmentación inicial física (nebulización, ultrasonicación) o enzimática
- con fragmentación inicial seguida de captura mediante hibridación a sondas

- amplificación mediante PCR (no excluye fragmentación posterior en productos de PCR larga)

–Otros pasos de los procedimientos de preparación:

- reparación de extremos y de enlaces fosfodiéster entre nucleótidos
- selección de fragmentos de un tamaño determinado en gel de agarosa
- eliminación de cebadores e inhibidores (partículas magnéticas o columnas)
- cuantificación y evaluación de la calidad del ADN o ARN de partida y de la librería final

2. Amplificación clonal

Aislar cada uno de los fragmentos de la librería y realizar copias de los mismos a fin de intensificar la señal que será registrada durante la secuenciación. La presencia de fragmentos distintos espacialmente próximos proporciona señales no válidas durante la secuenciación, al detectar varios nucleótidos en la misma posición que son asignados a un mismo fragmento.

Técnicas habituales:

- PCR en emulsión de cada fragmento unido a una partícula haciendo uso de los adaptadores
- formación de clusters separados de copias clonales de los fragmentos sobre una superficie sólida, a la cual se hibridan mediante los adaptadores

3. Secuenciación masiva paralela - Plataformas de segunda generación capacidad media

Tecnologías empleadas para la detección de incorporación de nucleótidos durante la polimerización del ADN en los diferentes instrumentos:

- fluorescencia procedente de nucleótidos o sondas marcados
- quimioluminiscencia en los pirosecuenciadores
- determinación del cambio de pH producido por el H⁺ liberado

4. Análisis primario/ secundario: traducción de las señales registradas en datos/ alineamiento y ensamblaje de las lecturas.

La NGS produce una cantidad de datos sin precedentes que un ordenador común no puede manejar.

En clínica, las tecnologías más empleadas son MiSeq Personal Sequencer de Illumina (actualmente de referencia) e PGM/Ion Proton de la tecnología Ion Torrent de Life Technologies. (<http://www.molecularecologist.com/next-gen-fieldguide-2014/>)

Objetivos

Objetivo general

Evaluar la eficacia de la secuenciación masiva (NGS), en comparación con una prueba de referencia o secuenciación convencional y citogenética, para el diagnóstico y seguimiento de enfermedades oncohematológicas.

Objetivos específicos

- Valorar el rendimiento diagnóstico de la técnica de secuenciación masiva (NGS): sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo.
- Evaluar la ocurrencia de modificaciones en el diagnóstico y el manejo de los pacientes como consecuencia de la información diagnóstica aportada por la NGS (subclasificaciones de la enfermedad y tratamientos dirigidos “dianas terapéuticas”).
- Evaluar modificaciones en el estado de salud de los pacientes provocados por los resultados diagnósticos de la NGS (supervivencia, morbilidad).

Métodos

Tipo de estudio

Revisión sistemática de la literatura científica.

Estrategia de búsqueda

Se realizó una búsqueda electrónica con fecha última de búsqueda el 8 de junio de 2015. Las fuentes de información fueron las siguientes: MEDLINE (PubMed), Embase y la base de datos de revisiones sistemáticas de Cochrane. También se realizó la búsqueda manual de la bibliografía de los estudios finalmente incluidos.

La estrategia de búsqueda empleada en cada una de las bases de datos se encuentra detallada en el Anexo 1.

Selección de los estudios

Este trabajo fue realizado de acuerdo con los criterios de elaboración de revisiones sistemáticas de la declaración PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) publicada en 2009.¹²

Todas las citas (títulos y resúmenes) identificadas mediante la búsqueda electrónica se descargaron a una base de datos de Reference Manager. Los duplicados fueron eliminados y las citas restantes fueron examinadas por un revisor, aplicando criterios de inclusión fijados con anterioridad. Se contó con el apoyo de un especialista en enfermedades oncohematológicas con experiencia en las técnicas analizadas. Los resúmenes que cumplieron los criterios de inclusión fueron analizados mediante la lectura del texto completo.

Criterios de inclusión

Participantes (población)

Personas con alguna enfermedad oncohematológica (específicamente leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfática crónica, síndrome mielodisplásico y mieloma múltiple) candidatas a la realización de análisis del ADN utilizando las pruebas NGS.

Intervenciones (descripción tecnológica)

- NGS
- Método Sanger
- Otras: citogenética molecular/ FISH/CGH array

Comparaciones

Estudios en los que se comparan los resultados de las pruebas de NGS con sus pruebas de referencia o gold estándar, en pacientes con enfermedades oncohematológicas.

Resultados

–Efectividad:

- Sensibilidad, especificidad y valores predictivos.
- Número de mutaciones detectadas
- Número y porcentaje de pacientes con al menos una mutación
- Número de mutaciones nuevas detectadas que no se observen con el método de referencia.
- Número de copias de variantes estructurales [copy number variants; CNV]. Variantes de nucleótido único o mutaciones puntuales, pequeñas inserciones y deleciones, y también variantes estructurales tanto equilibradas (inversiones y traslocaciones) como desequilibradas (deleciones o duplicaciones).
- Detección de variante de nucleótido único (SNV).
- Concordancia entre pruebas.

–Relacionados con la aplicación de la prueba en el laboratorio:

- Número de reacciones en paralelo.
- Tiempo carrera (Tiempo necesario en el instrumento para conseguir la longitud máxima de lectura).
- Lecturas/carrera (en millones).
- Bases/Lecturas.
- Capacidad de secuenciación (Gb/carrera).
- Frecuencia variante (%).
- Profundidad de cobertura.

–Impacto de los resultados de la prueba:

- Modificaciones del diagnóstico inicial.
- Cambios en las decisiones terapéuticas o manejo de los pacientes después de realizar NGS.

Diseño de los estudios:

Se incluirán ensayos clínicos aleatorizados (ECA), revisiones sistemáticas y meta-análisis, estudios comparativos de evaluación diagnóstica.

Criterios de exclusión

- Estudios que no comprueben los resultados de la NGS con alguna prueba de referencia o secuenciación convencional y citogenética.
- Estudios realizados en diferentes patologías y que no den los resultados desagregados por patología.
- Estudios que describan los resultados en función del número de muestras y no en función del número de pacientes. En casos en los que el número de muestras por paciente sea elevado, los resultados podrían verse influenciados por unos pocos pacientes y es necesario analizar las características de los mismos.
- Estudios con tamaño muestral menor de 30 pacientes.

Análisis de la evidencia

Se realizó la lectura crítica de los estudios incluidos. A partir de la información extraída en tablas de evidencia se elaboró una síntesis narrativa y un análisis descriptivo de los principales hallazgos de cada estudio. La información más relevante se presentó en tablas.

Se analizó el nivel de evidencia científica de los estudios de acuerdo a la clasificación del Scottish Intercollegiate Guidelines Network (Anexo 2). Se analizó la calidad metodológica con la herramienta QUADAS (Quality Assessment Diagnostic Accuracy Studies)¹³ (Anexo 3).

Extracción de datos

Se realizó la extracción de los siguientes datos de los estudios incluidos en la revisión, recogiendo en unas tablas de evidencia científica:

- Autor
- Año de la publicación
- Año del estudio
- País/Región

- Diseño del estudio:
 - tipo de diseño epidemiológico
 - intervención
 - seguimiento
 - enmascaramiento
 - método de aleatorización
- Tamaño muestral
- Criterios de selección de los pacientes
- Características iniciales de los pacientes participantes
- Características de la tecnología: prueba de referencia usada
- Variables de resultado
- Observaciones

Resultados

Resultados de la búsqueda

La búsqueda localizó un total de 649 citas, de las cuales quedaron 562 después de eliminar las citas duplicadas automáticamente. Fue identificada manualmente una cita a través de la lectura de un resumen presentado en un congreso.¹⁴

La mayoría de los estudios fueron excluidos durante el primer cribado de títulos y resúmenes: por realizar un análisis general de la NGS (160 citas), ser estudios que utilizaban NGS pero no comparaban con una prueba de referencia (159 citas) o abordaban otra temática como por ejemplo patogénesis y tratamiento de las enfermedades (112 citas). En el anexo 4 se detalla el diagrama de flujo con el número de las citas incluidas y excluidas de acuerdo con las directrices PRISMA. Diecisiete citas fueron seleccionadas para la lectura completa del artículo, y de estas, 12 fueron excluidas (anexo 5): cinco citas¹⁵⁻¹⁹ por ser resúmenes de congresos científicos que no permiten la evaluación de la calidad del estudio ni obtener demasiada información sobre el mismo; dos artículos^{20,21} analizaban muestras de laboratorios y no informaban los resultados en pacientes, tres artículos²²⁻²⁴ tuvieron tamaño muestral insuficiente; un artículo²⁵ no comparaba los resultados, solo confirmaba los resultados obtenidos con NGS y un artículo utilizaba como población de estudio a neonatos con síndrome de down.²⁶ Finalmente se incluyeron un total de cinco artículos^{14, 27-30} que cumplieron los criterios de inclusión. En el anexo 6 se detallan en tablas de evidencia las características generales de los estudios incluidos.

Diseño y características de los estudios incluidos

En el análisis geográfico se observó que la mayoría de los estudios incluidos eran europeos (uno de España, dos de Italia y uno de República Checa). El único estudio procedente de otro continente fue americano (EEUU y Canadá).

Todos los estudios se publicaron después del año 2013: dos en 2014 y tres en 2015. Todos los estudios fueron publicados en inglés. El periodo agrupado de inclusión de casos y recogida de datos de los estudios que reportaron esta información (N=4) fue desde 1996 hasta el 2014.

En cuanto al diseño, uno de los estudios fue cohorte retrospectivo y cuatro fueron series de casos prospectivos. Todos los estudios fueron

clasificados como nivel 2, 3 de evidencia según la clasificación de la Scottish Intercollegiate Guidelines Network (anexo2). La mayoría de los estudios realizaron el trabajo en personas con LLC (N=4) y uno en personas con MM. Todos los estudios tuvieron al menos 50 participantes en su tamaño muestral: dos estudios con tamaño muestral bajo (< 100) y tres estudios con tamaño muestral intermedio (100-500). La suma total de pacientes en los cinco artículos fue de 945: 812 con LLC y 133 con MM.

En la tabla 1 se recoge la valoración de los estudios con la herramienta QUADAS de valoración de la evidencia para estudios de pruebas diagnósticas. En ninguno de los artículos se consideró a la muestra representativa. Los criterios de selección fueron bien descritos en tres de los cinco artículos incluidos. Tres de los cuatro estudios realizados en personas con LLC informaron las características iniciales de los pacientes y los criterios de selección, pero con diferencias entre ellos: pacientes en estadios tempranos de la enfermedad en dos estudios y el tercero en enfermos en estadio tardío. En el estudio realizado en pacientes con MM el criterio de selección estaba ligado a las características de la muestra. Respecto al riesgo de incurrir en sesgos, tres estudios no realizaron o no informaron la utilización de pruebas en paralelo y ninguno de los estudios reportó interpretar los resultados de forma enmascarada. Uno de los estudios podría estar incurriendo en sesgo de verificación parcial y ninguno de los estudios ha incurrido en sesgo de verificación diferencial.

Tabla 1. Valoración de los ítems de la herramienta QUADAS

Estudio (año publicación)	Lionetti et al. ²⁷ (2014)	Kantorova et al. ³⁰ (2015)	Rossi et al. ²⁸ (2014)	Mc Clure et al. ²⁹ (2015)	Martinez-Lopez et al. ¹⁴ (2014)
1. Muestra representativa	No	No	No	No	No
2. Criterios de selección bien descritos	Si	No	Si	No	Si
Muestra de casos consecutiva	Si	No claro	Si	No claro	No claro
Extracción de datos	Prospectivo	Prospectivo	Prospectivo	Prospectivo	Retrospectiva
3. Patrón de referencia bien clasificado	Si	Si	Si	Si	Si
4. Si el patrón y la prueba no se aplican simultáneamente, ¿es razonable pensar que la enfermedad no haya evolucionado en ese tiempo?	Si (no paralelo)	Si (no paralelo)	Si (Paralelo)	Si (Paralelo)	Si
5. Sesgo de verificación parcial (cuando no todos los pacientes tienen comparación con el patrón)	No claro	No	No	No	No
6. Sesgo de verificación diferencial (cuando tienen distinto patrón)	No	No	No	No	No
7. Patrón de referencia independiente de la prueba	Si	Si	Si	Si	Si
8. Detalle de la ejecución de la prueba	Si	Si	Si	Si	Si
9. Detalle de la ejecución del estándar	Si	Si	Si	Si	Si
10. La prueba se interpretó desconociendo el resultado del patrón	Si	Si	No claro	No claro	No claro
11. El patrón se interpretó desconociendo el resultado de la prueba	No	No	No claro	No claro	No claro

Estudio (año publicación)	Lionetti et al. ²⁷ (2014)	Kantorova et al. ³⁰ (2015)	Rossi et al. ²⁸ (2014)	Mc Clure et al. ²⁹ (2015)	Martinez-Lopez et al. ¹⁴ (2014)
12. La información clínica disponible en la interpretación de la prueba es la misma que habrá cuando se use en la práctica	Si	Si	Si	Si	Si
13. Se informa de los resultados no interpretables	Si	No	No claro	Si	Si
14. Se explican las pérdidas	No claro	No claro	Si (ninguna)	No claro	Si

Resultados sobre efectividad

En relación a los resultados, ninguno de los cinco estudios tuvo como objetivo comparar la efectividad de la técnica NGS con su prueba de referencia. La mayoría de ellos tuvo como objetivo identificar una determinada mutación y/o analizar el estado mutacional y su correspondencia con la clínica.²⁷⁻³⁰ Un estudio analizó el seguimiento y el valor pronóstico de la enfermedad residual mínima (ERM) utilizando distintas pruebas¹⁴. Por lo tanto, los resultados se obtuvieron a partir de comparaciones indirectas.

Ningún estudio reportó en sus resultados sensibilidad, especificidad y valores predictivos de las pruebas que utilizaron, y ninguno evaluó la ocurrencia de modificaciones en el diagnóstico y el manejo de los pacientes como consecuencia de la información diagnóstica aportada por la NGS (nuevas subclasificaciones de la enfermedad o dianas terapéuticas nuevas). Solo un estudio analizó la supervivencia global (SG) y el tiempo de progresión (TP) de manera comparativa y midió la concordancia entre pruebas.¹⁴ La tabla 2 resume los principales resultados.

La mayoría de los estudios utilizaron la secuenciación convencional (SANGER) como prueba de referencia (N=3), un estudio utilizó tanto ARMS-PCR como SANGER, otro estudio utilizó FASAY, DHPLC y AmpliChip y otro CFM y ASO-PCR.

Los estudios incluidos proporcionan evidencia de que la NGS tiene efectividad mayor o igual de detección de mutaciones que las pruebas de referencia.

Lionetti et al.²⁷ analizaron el número de pacientes con la mutación NOTCH1 c.7541_7542delCT en pacientes con LLC, encontrándose mayor número cuando se realizó la NGS (145 vs 49 con ARMS-PCR y 25 con SAN-

GER). Este estudio valoró el impacto clínico pronóstico de esta mutación, la cual se asoció a un aumento estadísticamente significativo del riesgo terapéutico y a una disminución del tiempo mediano de supervivencia libre de progresión.

Kantarova et al.³⁰ analizaron el número de mutaciones TP53 y el número de pacientes con dicha mutación en pacientes con LLC. La NGS confirmó los resultados de las mutaciones identificadas por las pruebas de referencia (FASAY, DHPLC y AmpliChip) e identificó 24 pacientes con mutaciones adicionales de bajo nivel (<10% de ADN) y 8 pacientes con mutaciones de muy bajo nivel no detectadas por las otras pruebas.

Rossi et al.²⁸ analizaron el número de mutaciones TP53 detectadas y el número de pacientes con dicha mutación, en pacientes con LLC. La NGS detectó 85 vs 35 (SANGER) mutaciones y a 46 pacientes con mutaciones en comparación con los 28 con SANGER. Por otra parte, la NGS detectó 50 mutaciones subclonales de TP53 que fueron validadas mediante AS-PCR.

Mc Clure et al.²⁹ analizaron el estado de hipermutación somática (SHM) y el reporte del gen dominante IGHV en pacientes con LLC, con resultado igual obtenido en ambas pruebas, NGS y SANGER: 31 casos sin mutación y 19 casos con mutación y con tasas de mutación en el rango de 0,3% a 13,6%. No obstante, mencionan que se observaron discordancias pequeñas en el porcentaje de mutaciones, pero sin afectar al resultado clínico final. La máxima diferencia de mutación identificada en este estudio fue de 2,2% (47 casos).

Martínez-López et al.¹⁴ es el único estudio que valora seguimiento y evalúa el valor pronóstico de la ERM en pacientes con MM. El número de personas detectadas con ERM fue mayor con NGS (110 vs. 99 con CFM y 41 con ASO-PCR). La concordancia entre la NGS y la CFM fue del 83% con un r^2 de 0,58. Cinco pacientes dieron positivos con CFM y negativos con NGS, de los cuales sólo uno había progresado en el momento de la publicación. Doce pacientes que fueron negativos con CFM y positivos con NGS tuvieron un TP intermedio (mediana de 50 meses, $P= 5,05$) en comparación con los casos con ERM con NGS negativa. La concordancia entre NGS y ASO-PCR fue del 85% con un r^2 de 0,54. El grado de concordancia según el coeficiente de correlación, entre NGS y las dos pruebas diagnósticas, fue moderado

Tabla 2. Resultados y características principales de los estudios incluidos

Características	Lionetti et al. ²⁷ (2014)	Kantorova et al. ³⁰ (2015)	Rossi et al. ²⁸ (2014)	Mc Clure et al. ²⁹ (2015)	Martinez-Lopez et al. ¹⁴ (2014)
Utilización	Diagnóstico	Diagnóstico	Diagnóstico	Diagnóstico	Seguimiento
Tamaño muestral	384	69	309	50	133
Enfermedad	LLC	LLC	LLC	LLC	MM
Identificación	Mutación NOTCH1 c.7541_7542 delCT	Mutación TP53	Mutaciones pequeñas de subclones de TP 53	Hipermutación somática (SMH) y gen dominante	Enfermedad residual mínima (ERM)
Comparación	- NGS - ARMS-PCR - SANGER	- NGS - FASAY, DH-PLC y AmpliChip (FDA)	-NGS -SANGER	-NGS -SANGER	- NGS - CFM - ASO-PCR
Resultados	- Nº de pacientes con mutación: 145(NGS); 49(ARMS-PCR); 25 (SANGER). - Frecuencia de lectura de mutación: 0,02-1 75% (NGS); >0,7%. (ARMS-PCR/SANGER).	- Nº de mutaciones: 58(FDA); NGS confirma - Nº de pacientes con mutaciones: 37 (FDA); NGS confirma NGS identifica 24 pacientes con mutaciones adicionales de bajo nivel y 8 con mutaciones de muy bajo nivel.	- Nº de mutaciones: 35 (SANGER); 85 (NGS) - Nº y % de pacientes con mutación: 28, 9,1% (SANGER); 46, 14,8% (NGS) SANGER no identificó ninguna mutación no detectada por NGS. NGS detectó 50 mutaciones subclonales de TP53 adicionales que fueron validadas mediante AS-PCR.	Nº de SMH y detección del gen dominante: resultados idénticos con ambas pruebas. Se observaron discordancias pequeñas en cuanto al porcentaje de mutaciones, pero sin afectar al resultado clínico final.	ERM NGS: 110 CFM: 99 ASO-PCR: 41 Concordancia (ERM) <u>NGS vs CFM:</u> 83% r ² :0,58 <u>NGS vs ASO-PCR:</u> 85% r ² :0,54 Pacientes ERM CFM+/NGS-: 1/5 con progresión hasta el momento de la publicación.

Discusión

La evidencia que proporcionan los cinco estudios analizados en relación a la mayor o igual efectividad de la NGS para el diagnóstico y seguimiento de enfermedades oncohematológicas y respecto a las pruebas de referencia (técnicas de secuenciación de primera generación, técnicas citogenéticas moleculares y de CGH arrays), es escasa y de baja/moderada calidad.

En los estudios incluidos se observó que la NGS en pacientes con LLC detectó mayor número de mutaciones NOTCH1 c.7541_7542delCT y TP53 que las pruebas de referencia.^{27, 28, 30} Por otra parte, e igualmente en pacientes con LLC, el análisis de la hipermutación somática de la inmunoglobulina de cadena pesada (SHM) con las técnicas de secuenciación NGS y SANGER, dio igual resultado.²⁹ En enfermos con MM, NGS permitió detectar mayor número de pacientes con ERM.¹⁴

Se conoce que, en pacientes con LLC, la presencia de la mutación NOTCH1 c.7541_7542delCT y del gen supresor de tumor TP53 se asocian a un peor pronóstico (menor tiempo de supervivencia global) y resistencia a tratamientos específicos^{27, 28, 30-32}; que la detección de la SHM es útil para predecir el tiempo de tratamiento y una mejor supervivencia global^{29, 33}, y que predicen mayor supervivencia libre de progresión y global los estudios de ERM en pacientes con MM.¹⁴

Los estudios incluidos no evaluaron la sensibilidad, especificidad y valores predictivos de las pruebas que utilizaron. Tampoco los estudios analizaron la ocurrencia de modificaciones en el diagnóstico y el manejo de los pacientes como consecuencia de la información diagnóstica aportada por la NGS (nuevas subclasificaciones de la enfermedad o dianas terapéuticas nuevas). Solo un estudio analizó la supervivencia global y el tiempo de progresión de manera comparativa; la concordancia entre pruebas fue moderada.¹⁴

La principal limitación de esta revisión fue que los estudios localizados tuvieron como objetivo identificar una mutación determinada y/o analizar el estado mutacional y su correspondencia con la clínica, sin llegar a formular como tal, valorar la efectividad comparada de las técnicas empleadas. Todo esto, ha condicionado que sus resultados se basen en comparaciones simples e indirectas, con la consecuente disminución de la calidad de la evidencia hallada.

El bajo número de publicaciones incluidas, podría estar reflejando el escaso tiempo de utilización de la NGS para el diagnóstico y seguimiento de los tumores hematológicos, así como el número reducido de centros que hasta la fecha tienen acceso a ella. Por otra parte, esta revisión ha excluido un importante número de citas, casi el 30% de las localizadas, por inexistencia de comparación de los resultados de la NGS con alguna prueba de referencia o secuenciación convencional y citogenética; han quedado fuera de la misma algunos estudios relevantes, que evidencian nuevas

alteraciones moleculares no detectadas por las técnicas convencionales, si bien aún se desconoce, en la mayor parte de ellas, su significado clínico. Estudiar estas nuevas múltiples mutaciones simultáneamente generará futuras utilidades y aplicaciones de la NGS que posibilitarán: i) redefinir el pronóstico de los tumores hematológicos; ii) encontrar alteraciones que sean dianas terapéuticas específicas del tumor de un individuo dado; iii) detectar lesiones moleculares que predigan la resistencia a tratamientos y iv) monitorizar el tratamiento de estos enfermos de forma precisa.³⁴⁻³⁷

Las expectativas que genera la tecnología y la incidencia aproximada de cánceres hematológicos en España, con 3000 casos-año de leucemia linfática crónica, 3500 casos-año de leucemia aguda, 1500 casos-año de síndrome mielodisplásico, 2000 casos-año de mieloma múltiple, 1000 casos-año de mielofibrosis primaria y 3000 casos-año de linfomas, hace prever la realización de, al menos, 13000 estudios al año (1100 estudios al mes).³⁸ La capacidad de los nuevos equipos de secuenciación, que permiten generar gigabytes de secuencias en un día y la secuencia de miles de genes de diferentes tumores en pocas horas, hace aconsejable y muy conveniente concentrar los estudios en un número limitado y controlado de centros especializados, para así maximizar los requerimientos materiales, personales y formativos que requiere la correcta utilización de la tecnología.

Conclusiones

La evidencia disponible sobre la eficacia de la NGS para el diagnóstico y seguimiento de enfermedades oncohematológicas, en comparación con una prueba de referencia de secuenciación convencional y citogenética no es concluyente, es escasa y de calidad baja/moderada. Se requieren estudios de mayor calidad, cuyo objetivo sea comparar la efectividad entre pruebas, diseñados para ese fin y con un número más elevado de participantes.

Los autores consideran que se necesitan más publicaciones y de mayor calidad para definir si la NGS es una prueba menor, igual o más efectiva, para el diagnóstico y seguimiento de enfermedades oncohematológicas que las técnicas actuales.

Anexos

Anexo 1. Estrategia de búsqueda

Base de datos	Búsqueda	Pregunta (palabra clave)
Pubmed	#1	"hematologic malignancy"
	#2	"chronic lymphocytic leukemia"
	#3	"acute myeloid leukemia"
	#4	"multiple myeloma"
	#5	"Myelodysplastic syndromes"
	#6	"acute myeloblastic leukemia"
	#7	(((((("acute myeloblastic leukemia") OR "Myelodysplastic syndromes") OR "multiple myeloma") OR "acute myeloid leukemia") OR "chronic lymphocytic leukemia") OR "hematologic malignancy")
	#8	"high throughput sequencing"
	#9	"next generation sequencing"
	#10	("next generation sequencing") OR "high throughput sequencing"
	#11	(((((("acute myeloblastic leukemia") OR "Myelodysplastic syndromes") OR "multiple myeloma") OR "acute myeloid leukemia") OR "chronic lymphocytic leukemia") OR "hematologic malignancy") AND ("next generation sequencing") OR "high throughput sequencing")
Embase	#1	'myelodysplastic syndromes'/exp OR 'myelodysplastic syndromes'
	#2	'multiple myeloma'/exp OR 'multiple myeloma'
	#3	'acute myeloid leukemia'
	#4	'acute myeloblastic leukemia'
	#5	'chronic lymphocytic leukemia'/exp OR 'chronic lymphocytic leukemia'
	#6	'hematologic malignancy'/exp OR 'hematologic malignancy'
	#7	#1 OR #2 OR #3 OR #4 OR #5 OR #6
	#8	'high throughput sequencing'/exp
	#9	'next generation sequencing'/exp
	#10	#8 OR #9

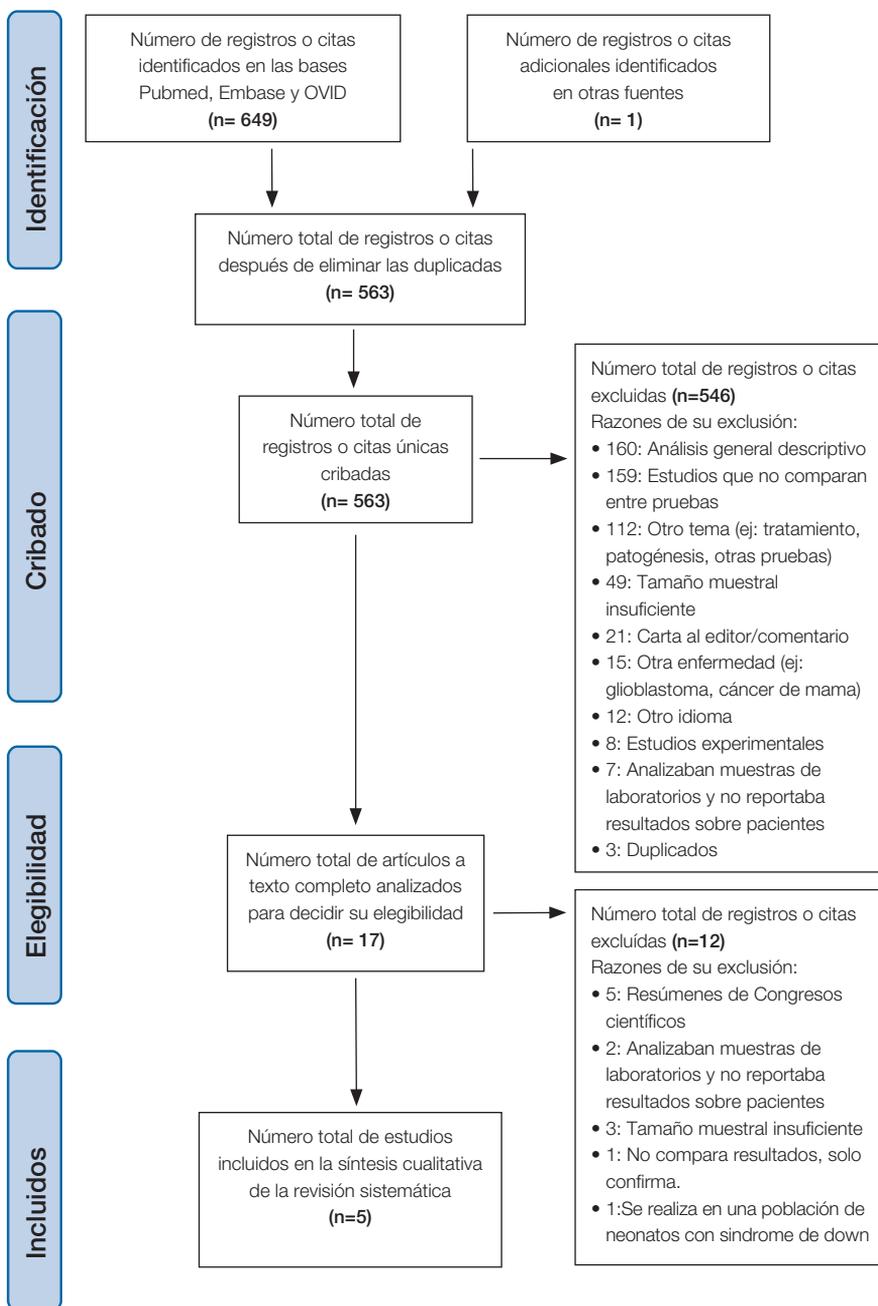
Anexo 2. Nivel de calidad de la evidencia científica.
 Clasificación SIGN (Scottish Intercollegiate Guidelines
 Network)

	Clasificación de evidencia científica
1++	Meta-análisis de alta calidad, revisiones sistemáticas de ensayos controlado y aleatorizados (ECA) o ECA con riesgo de sesgos muy bajo
1+	Meta-análisis bien realizados, revisiones sistemáticas de ECA, o ECA con riesgo de sesgos bajo
1-	Meta-análisis, revisiones sistemáticas de ECA, o ECA con riesgo de sesgos alto
2++	Revisiones sistemáticas de alta calidad de estudios de cohortes o casos- controles. Estudios de cohortes o casos- controles con riesgo de sesgos muy bajo y alta probabilidad de que la relación sea causal
2+	Estudios de cohortes y casos- controles bien realizados y con riesgo de sesgos bajo y probabilidad moderada de que la relación sea causal
2-	Estudios de cohortes y casos- controles con riesgo de sesgos alto y riesgo significativo de que la relación no sea causal
3	Estudios no analíticos (Ej. Serie de casos)
4	Opinión de expertos

Anexo 3. Herramienta Quadas (Quality Assessment Diagnostic Accuracy Studies)

ITEMS	SI	NO	NO CLARO
1. ¿Es representativa la muestra?	()	()	()
2. ¿Se describen bien los criterios de selección?	()	()	()
3. ¿Patrón de referencia bien clasificado?	()	()	()
4. Si el patrón y la prueba no se aplican simultáneamente, ¿es razonable pensar que la enfermedad no haya evolucionado en ese tiempo?	()	()	()
5. ¿Sesgo de verificación parcial? (cuando no todos los pacientes tienen comparación con el patrón)	()	()	()
6. ¿Sesgo de verificación diferencial? (cuando tienen distinto patrón)	()	()	()
7. ¿Es el patrón de referencia independiente de la prueba? (la prueba no forma parte del patrón)	()	()	()
8. Detalle de la ejecución de la prueba	()	()	()
9. Detalle de la ejecución del estándar	()	()	()
10. ¿Se interpretó la prueba sin conocer el resultado del patrón?	()	()	()
11. ¿ Se interpretó el patrón sin conocer el resultado de la prueba?	()	()	()
12. ¿La información clínica disponible en la interpretación de la prueba es la misma que habrá cuando se use en la práctica?	()	()	()
13. ¿Se informa de los resultados no interpretables?	()	()	()
14. ¿Se explican las pérdidas?	()	()	()

Anexo 4. Diagrama de flujo PRISMA 2009



Anexo 5. Motivo de exclusión de los estudios excluidos

Estudio (año publicación)	Motivo de exclusión
Jethwa et al. (2012) ¹⁴	Tipo de publicación: resumen de congreso
Shih et al. (2013) ¹⁵	Tipo de publicación: resumen de congreso
Bally et al. (2014) ¹⁶	Tipo de publicación: resumen de congreso
Takamatsu et al. (2014) ¹⁷	Tipo de publicación: resumen de congreso
Morgan et al. (2015) ¹⁸	Tipo de publicación: resumen de congreso
Spencer et al. (2013) ¹⁹	Describe los resultados en función del número de muestras
Abel et al. (2014) ²⁰	Describe los resultados en función del número de muestras
Ladetto et al. (2014) ²¹	Tamaño muestral menor de 30 participantes
Thol et al. (2012) ²²	Tamaño muestral menor de 30 participantes
Luthra et al. (2014) ²³	Tamaño muestral menor de 30 participantes
Smith et al. (2010) ²⁴	No confirma los resultados de la NGS con alguna prueba de referencia
Roberts et al. (2013) ²⁵	Población: analiza pacientes sin enfermedad oncohematológica diagnosticada

Anexo 6: Tablas de evidencia de los estudios incluidos

Estudio	Lionetti et al. ²⁷ (2014)
País/Región	Italia
Objetivo	Investigar la mutación NOTCH1 c.7541_7542delCT por medio de NGS en casos de LLC y LMB. Determinar las relaciones entre esta mutación y otras características clínicas y biológicas, así como con el impacto clínico de la enfermedad.
Diseño del estudio	
Tipo de diseño	Observacional comparativo (serie de casos). Prospectivo. Casos registrados en el ensayo clínico multicéntrico GISL (Grupo Italiano Studio Linfomi).
Comparación	NGS ARMS-PCR SANGER
Intervención	Se tomaron muestras de sangre periférica dentro del primer año tras el diagnóstico. En 48 casos se volvieron a tomar muestras tras 24/36 meses de estabilización de la enfermedad. Se detectaron mutaciones del gen IGHV por inmunofluorescencia directa. Se midieron ZAP70 y CD38 por citometría de flujo. Se realizó un análisis con FISH para detectar deleciones 13q14, 17p13 y 11q22-q23 y trisomía 12. Se detectaron mutaciones NOTCH1 mediante amplificaciones con PCR (FastStart High Fidelity Polymerase), pirosecuenciación y secuenciación profunda (Genome Sequencer Junior). Se detectaron del alelo NOTCH1, c.7541_7542delCT con ARMS-PCR.
Años del estudio	2013
Seguimiento (meses)	39 (mediana)
Enmascaramiento	No
Método de aleatorización	No procede
Participantes	
Tamaño muestral	384 pacientes con LLC
Criterios de inclusión	Pacientes de edad ≤ 70 años con diagnóstico de LLC en estadio A de Binet
Criterios de exclusión	No menciona
Características iniciales	Pacientes en etapas tempranas de la enfermedad: Recuento linfocitario de al menos 5000x10 ⁹ /l; 291 (75,8%) pacientes en estadio 0 de Rai, 52 (13,5%) pacientes en estadio I y 28 (7,3%) en estadio II. La edad mediana de los pacientes con LLC fue de 61 años, 174 hombres y 110 mujeres. Pacientes reclasificados como linfocitosis monoclonal tipo B (LMB): 100 de los 291 pacientes en estadio 0, con una edad mediana de 62 años, 49 hombres y 51 mujeres.

Estudio	Lionetti et al. ²⁷ (2014)
Características de la tecnología	Se amplificó el ADN genómico utilizando FatStart High Fidelity Polymerase (Roche). En un segundo paso de amplificación, se añadieron identificadores MID y adaptadores de secuenciación a ambos extremos de los amplicones. La PCR fue purificada mediante perlas Agencourt AMPure XP. Las muestras se cuantificaron mediante tinción con "picogreen" y se detectaron con el fluorómetro Victor X2. Los productos de la PCR fueron añadidos a ratios equimolares como preparación para la pirosecuenciación Roche-454 Life Sciences. La biblioteca de amplicones obtenida se añadió a la emulsión de PCR para la secuenciación con el instrumento Genome Sequencer Junior. Para establecer la frecuencia de alelos mutados, se mapearon los resultados con la secuencia de referencia y se analizaron con el software Amplicon Variant Analyser (Roche).
Resultados	
Variables de resultados	Nº de pacientes con mutación NOTCH1 c.7541_7542delCT Nº de mutaciones no detectadas por el método que se compara
Resultados	<p>NGS: Nº de pacientes con mutación NOTCH1 c.7541_7542delCT: 145 Frecuencia de lectura de mutación de 0,02% al 75%. La técnica de secuenciación profunda es capaz de detectar la delección dinucleótido incluso a nivel clonal mínimo de "bajo nivel". Profundidad de cobertura (mediana): 1510x</p> <p>ARMS-PCR: Nº de pacientes con mutación NOTCH1 c.7541_7542delCT: 49 (12,8%) Frecuencia de lectura de mutación > 0,7%. No se validó con una técnica independiente. A pesar de esto, solo se observó un porcentaje prácticamente nulo de falsos positivos con esta tecnología cuando se secuenciaron cinco réplicas del NOTCH1 de tipo salvaje línea celular Jurkat (en promedio, 0,01% de la secuencia mutada lee en 1461 Total de Lecturas, rango de 1349 hasta 1688).</p> <p>SANGER Nº de pacientes con mutación NOTCH1 c.7541_7542delCT : 25 Frecuencia de lectura de mutación ≥ 7%.</p>

Estudio	Lionetti et al. ²⁷ (2014)
Observaciones	<p>EN LA DISCUSION LOS AUTORES MENCIONAN: Aunque la técnica NGS es cada vez más factible y rentable, especialmente cuando se aplica a la resecuenciación dirigida de genes candidatos, se requiere un equipo que todavía no está disponible en todos los laboratorios. Por otra parte, la alta sensibilidad de ARMS-PCR observada en este estudio, demuestra que es un método conveniente para detectar la mutación, incluso a niveles muy bajos, en condiciones en que muchos pacientes de otro modo hubieran sido considerados de tipo salvaje. La determinación cuantitativa por NGS ha puesto de manifiesto que, aunque hubo casos en los que el porcentaje de la variante de secuenciación de lectura fue sugestivo de la presencia de una mutación heterocigótica en toda la población tumoral, la mutación NOTCH1 a menudo afectó sólo a un pequeño sub-clon neoplásico. También valora la prevalencia de la mutación NOTCH1 c.7541_7542delCT en LLC y LMB, el impacto pronóstico de la mutación NOTCH1 c.7541_7542delCT y el análisis secuencial de las mutaciones NOTCH1. Estos resultados no los compara con la prueba de referencia.</p> <p>Prevalencia de la mutación NOTCH1 c.7541_7542delCT en LLC (13,4%) LMB (11%) y casos estadio 0 de Rai (14,2%)</p> <p>Impacto pronóstico de la mutación NOTCH1 c.7541_7542delCT: Asociada a un aumento estadísticamente significativo del riesgo terapéutico y a una disminución del tiempo mediano de supervivencia libre de progresión (HR= 2,34; 95%CI: 1,37-3,99; tiempo mediano 52 frente a 82,5 meses). Tras un análisis multivariante, sólo mantuvo condición de factor de riesgo para un peor pronóstico la presencia de IGHV y LLC.</p> <p>Análisis secuencial de las mutaciones NOTCH1: No se encontraron diferencias en las frecuencias de mutaciones durante la progresión de la enfermedad, excepto en un caso, donde se pasó de encontrar mutaciones en el 1.11% de las lecturas en el momento del diagnóstico a encontrar 16.9% en las muestras a los 36 meses.</p>
Nivel de evidencia	3

Estudio	Kantorova et al.³⁰ (2015)
País/Región	República Checa (Hospital Universitario Brno)
Objetivo	Determinar las limitaciones de los métodos comúnmente empleados para el examen de la mutación TP53 en pacientes con LLC y proponer un abordaje óptimo para su detección
Diseño del estudio	
Tipo de diseño	Observacional comparativo (serie de casos). Prospectivo.
Comparación	DHPLC, FASAY (confirmadas ambas con SANGER) y AmpliChip p53 Research Test NGS
Intervención	Se extrajo sangre periférica y se realizó hisopado bucal a todos los pacientes. Se comparó el uso de DHPLC, FASAY (confirmadas ambas con SANGER) y AmpliChip p53 Research Test, para detectar mutaciones TP53. A un subgrupo (69 pacientes) también se le realizó NGS ultra-deep (32 TP53-tipo salvaje y 37 TP53-mutado):Plataforma MiSeq (Illumina)
Años del estudio	2004-2014
Seguimiento (meses)	No realiza
Enmascaramiento	No
Método de aleatorización	No procede
Participantes	
Tamaño muestral	69 pacientes con 4 métodos (de 182 pacientes con LLC)
Criterios de inclusión	Pacientes con pronóstico desfavorable con estadios avanzados de la enfermedad, pacientes con estatus genético IGVH y/o del (17p)
Criterios de exclusión	No menciona
Características iniciales	Edad mediana al diagnóstico: 61 años; 115 hombres, 67 mujeres Estadio RAI: 26 en estadio 0, 55 en estadio I/II, 97 en estadio III/IV Pacientes con gen IGHV mutado: 33
Características de la tecnología	Las muestras de ADN se amplificaron utilizando lectura-revisada ("proof-reading") Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (Biolabs). Cada producto de la PCR fue purificado por separado mediante Agencourt AMPure XP y cuantificado usando QuBit dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies). Los amplicones purificados se mezclaron a ratios equimolares según el número de moléculas y se diluyeron a 1ng. La biblioteca indexada se preparó con Nextera XT DNA Preparation Kit (Illumina) y se secuenció mediante MiSeq Reagent Kit v2 (300 ciclos, Illumina). Las lecturas secuenciadas se pre-procesaron y alinearon con la secuenciación de referencia (GenBank: CRGh37.p9) utilizando CLC Genomic Workbench v. 6.0.4. (CLC Bio). Las variaciones se detectaron usando el paquete-R deepSNV.
Resultados	
Variables de resultados	Nº de mutaciones TP53 detectadas Nº de pacientes con mutación TP53Nº de mutaciones no detectadas por el método que se compara

Estudio	Kantorova et al. ³⁰ (2015)
Resultados	<p>Solo se informan los resultados de los pacientes a los que se les hace NGS (69 pacientes):</p> <p>FASAY, DHPLC y AmpliChip Nº de mutaciones TP53 detectadas: 58 Nº de pacientes con mutación TP53: 37 Nº de paciente con mutaciones de muy bajo nivel de detección (probado en 32 pacientes con mutaciones TP53 de tipo salvaje): 5 (realizado con FASAY)</p> <p>NGS Nº de mutaciones TP53 detectadas: confirma resultados previos Nº de pacientes con mutación TP53: confirma resultados previos Nº de paciente con mutaciones adicionales de bajo nivel (<10% de ADN): 24 Nº de paciente con mutaciones de muy bajo nivel de detección (probado en los 32 pacientes con mutaciones TP53 de tipo salvaje): 8</p>
Observaciones	<p>Este estudio utiliza NGS para confirmar los resultados de las pruebas de referencia. Analiza las ventajas de utilizar NGS, pero no enfoca el análisis de forma comparativa con la prueba de referencia.</p> <p>Si lo hace entre los otros métodos utilizados, para los que describe el tipo de mutaciones identificadas:</p> <p>Nº y % de mutaciones missense Nº y % mutaciones no-missense Nº y % mutaciones del marco de lectura Nº y % de mutaciones del sitio de empalme Nº y % de deleciones Nº y % de mutaciones sin sentido</p> <p>EN LA DISCUSION LOS AUTORES MENCIONAN: La NGS tiene un enfoque prometedor para la detección de mutaciones TP53. Este estudio confirmó la presencia de todas las mutaciones de TP53 evaluadas y permitió la detección de mutaciones de TP53 adicionales de bajo nivel en las células de LLC, que podría ser objeto de una mayor selección clonal. Sin embargo, usando NGS, la determinación de los errores que pueden ser inducidos durante la amplificación por PCR de las muestras es importante. A pesar de tener mayor sensibilidad y eficiencia de tiempo, las principales limitaciones son el precio del equipo de laboratorio y los altos costes directos, junto con la necesidad de un perfil especialista en bioinformática</p>
Nivel de evidencia	3

Estudio	Rossi et al.²⁸ (2014)
País/Región	Italia (Universidad de Avogadro)
Objetivo	Analizar el impacto clínico de las mutaciones pequeñas de subclones de TP 53
Diseño del estudio	
Tipo de diseño	Observacional comparativo (serie de casos). Prospectivo
Comparación	SANGER NGS
Intervención	Se analizó sangre periférica al diagnóstico y seguimiento, mediante NG, para estudiar la mutación en el gen TP53. En cada ensayo se amplificaron 60 amplicons de 10 pacientes utilizando PCR y posterior NGS con en Genome Sequencer Junior (Life Science). También se realizó en paralelo la validación con secuenciación Sanger. Se desarrolló un algoritmo bioinformático para extraer la información de las mutaciones subclonales fuera del ruido basal (error por ruido de fondo). Con esta aproximación se logró detectar mutaciones representadas en al menos el 0,3% de los alelos. Las variantes subclonales fueron validadas por ASO-PCR.
Años del estudio	1996-2011
Seguimiento (meses)	Mediana: 8,1 años. Ninguna perdida
Enmascaramiento	No
Método de aleatorización	No procede
Participantes	
Tamaño muestral	309 pacientes con LLC
Criterios de inclusión	Pacientes recién diagnosticados de Leucemia linfocítica crónica según los criterios definidos en el taller del Instituto Nacional de Cáncer (IWCLL-NCI)
Criterios de exclusión	No menciona
Características iniciales	Edad mayor de 70 años: 51,8%; Varones : 53,4% Estadio Binet A: 79,3%; B: 12%; C : 8,7% Identidad IGHV > 98%: 35,5%
Características de la tecnología	La secuenciación NGS de las mutaciones TP53 se realizó utilizando PCRy basándose en bibliotecas de amplicones. La región de interés se cubrió por 6 parejas de cebadores, cada uno flanqueado por secuencias etiquetadas para codificar las muestras. En cada experimento, 60 amplicones se amplificaron con polimerasa Taq de alta fidelidad (FatStart High Fidelity Polymerase, Roche) y se secuenció con Genome Sequencer Junior (Roche Science) para obtener una cobertura de 2000 por amplicon
Resultados	
Variables de resultados	Nº de mutaciones TP53 detectadas Nº y % de pacientes con mutación TP53 Nº de mutaciones no detectadas por el método que se compara

Estudio	Rossi et al.²⁸ (2014)
Resultados	<p>Sanger Nº de mutaciones TP53 detectadas: 35 Nº y % de pacientes con mutación TP53: 28 (9,1%) Nº de mutaciones no detectadas por el NGS: 0</p> <p>NGS Nº de mutaciones TP53 detectadas: 85 Nº y % de pacientes con mutación TP53: 46 (14,8%) Nº de mutaciones no detectadas por Sanger: 50 mutaciones subclonales de TP53 que fueron validadas mediante AS-PCR</p>
Observaciones	<p>Otros análisis realizados: Fueron mutaciones subclonales de única variante de TP53 un 5,8% (18/309) de CLL, mientras que coexistieron en la misma población leucémica junto con una mutación TP53 clonal en 3,2% (10/309) de los casos. Considerando la delección 17p13 entre los defectos genéticos dirigidos al gen TP53, mutaciones subclonales de TP53 fueron la única lesión TP53 en un 4,8% (15/309) de LLC. En general, los pacientes portadores de mutaciones exclusivamente subclonales representaron el 30% (15/50) de los casos de todos los que albergan defectos TP53</p> <p>EN LA DISCUSION LOS AUTORES MENCIONAN: La NGS añade significativamente valor al análisis de los defectos TP53 genéticos en LLC al permitir la identificación de pequeñas mutaciones de subclones TP53 entre los pacientes, que de otro modo se considerarían de tipo salvaje para el gen TP53 de acuerdo con la secuenciación de Sanger. Esto se debe a su alta sensibilidad (0,1-1%)</p>
Nivel de evidencia	3

Estudio	Mc Clure et al.²⁹ (2015)
País/Región	Canadá /EEUU
Objetivo	Determinar si la secuenciación con NGS es capaz de analizar la hipermutación somática (SMH) en pacientes con LLC y agilizar su análisis
Diseño del estudio	
Tipo de diseño	Observacional comparativo (serie de casos). Prospectivo
Comparación	SANGER NGS
Intervención	Se evaluaron muestras de sangre y de aspirado de médula ósea en paralelo usando dos protocolos de secuenciación de Sanger y de secuenciación con Ion Torrent
Años del estudio	No lo menciona
Seguimiento (meses)	No realiza
Enmascaramiento	No
Método de aleatorización	No procede
Participantes	
Tamaño muestral	50 pacientes con LLC
Criterios de inclusión	No menciona
Criterios de exclusión	No menciona
Características iniciales	No describe
Características de la tecnología	Se realizó PCR utilizando cebadores FR1 y el consenso JH determinado para el análisis con Sanger. Los productos se purificaron mediante perlas 1x5 Agencourt AMPure XP siguiendo instrucciones del fabricante. La biblioteca se cuantificó usando un fluorómetro Qubit (Life Technologies) y cada muestra se diluyó a 6 ng/uL. Las muestras de los pacientes se agregaron para generar la biblioteca para la secuenciación. El kit 400-bp se utilizó según instrucciones del fabricante. El producto se cargó en un chip Ion 316 generación 2 y secuenció en el Ion Torrent PGM. Para cada muestra, los fragmentos se alinearon según una configuración de referencia que contenía toda la secuencia germinal IGHV usando el software Ion Torrent Suite v. 3.4.1. Se eliminaron los cebadores y se analizaron simultáneamente las primeras 25 lecturas hacia adelante y reversas con el software IMG/Quest.
Resultados	
Variables de resultados	Estado de SHM y reporte del Gen dominante IGHV

Estudio	Mc Clure et al. ²⁹ (2015)
Resultados	<p>Las muestras de los 50 pacientes arrojaron resultados idénticos en ambos ensayos (Sanger y NGS) en cuanto a la interpretación del estado de SHM y reporte del gen dominante IGHV. Treinta y un casos sin mutación y 19 casos con mutación, con tasas de mutación en el rango de 0,3% a 13,6%.</p> <p>En 1 caso la secuenciación del gen IGHV arrojó resultados discordantes entre ambas plataformas. Tenía una sola posición de la base que se interpretó como una guanina en una secuencia de rastreo limpia generada por el método de Sanger pero tenía algunas lecturas con una guanina y algunas con una citosina después de la secuenciación por el PGM.</p> <p>Se observaron discordancias pequeñas en cuanto al porcentaje de mutaciones, pero sin afectar al resultado clínico final. La máxima diferencia de mutación identificada en este estudio fue de 2,2% (47 casos) y en ningún caso esta diferencia alteró el resultado final con respecto a la condición de SHM.</p>
Observaciones	<p>No menciona el periodo de estudio</p> <p>EN LA DISCUSION LOS AUTORES MENCIONAN: La NGS es un método fiable para evaluar el estado IGHV SHM y más eficiente, por lo que probablemente se convertirá en el método de elección.</p> <p>NGS llevó más tiempo que SANGER (12 vs 24 hr), aunque el tiempo de análisis de datos fue menor para NGS, porque es semiautomático.</p> <p>Además con NGS se eliminan errores de interpretación generados por la manipulación manual con SANGER. NGS fue más cara por muestra pero más barata si estas se procesan simultáneamente.</p>
Nivel de evidencia	3

Estudio	Martinez-Lopez et al.¹⁴ (2014)
País/Región	España
Objetivo	Evaluar el valor pronóstico de la detección de enfermedad mínima residual (ERM) mediante secuenciación en pacientes con MM, así como la concordancia entre los niveles de ERM medida por citometría de flujo multiparamétrica (CFM), ASO-PCR y secuenciación de alto rendimiento
Diseño del estudio	
Tipo de diseño	Cohorte retrospectivo
Comparación	NGS CFM y ASO-PCR
Intervención	Se realizó la secuenciación de alto rendimiento. Se analizó ERM utilizando los ensayos IGH-VDJH e IGK o IGH-VDJH, IGH-DJH y IGK y por medio de ASO-PCR (tecnología TaqMan) y CFM
Años del estudio	2000-2013
Seguimiento (meses)	No describe
Enmascaramiento	No
Método de aleatorización	No procede
Participantes	
Tamaño muestral	133 pacientes con MM
Criterios de inclusión	Disponer de muestra con más de 3 µg
Criterios de exclusión	Se excluyeron del análisis de ERM los pacientes cuyas muestras no identificaban clones de mieloma con alta frecuencia (>5%).
Características iniciales	No describe
Características de la tecnología	La secuenciación de alto rendimiento se realizó de acuerdo con el método LymphoSIGHT (Sequentia). Para las muestras de MM, se amplificó el ADN genómico con sets de cebadores locus-específicos para el locus de la cadena pesada de inmunoglobulina completa (IGH-VDJH), de la IGH incompleta (IGH-DJH) y del locus K de la inmunoglobulina (IGK). El producto amplificado se sometió a secuenciación y se obtuvieron las secuencias y las frecuencias de los distintos clonotipos. Se analizó el ERM a los pacientes con alta frecuencia de clon de mieloma con los ensayos IGH-VDJH e IGK, o IGH-VDJH, IGH-DJH e IGK. Una vez que fue determinada la cantidad absoluta de moléculas derivadas del cáncer presentes en cada muestra, se realizó una medición final de ERM, dando el número de moléculas por 1 millón de equivalentes celulares.
Resultados	
Variables de resultados	Valores de supervivencia según la técnica utilizada. Correlación de ERM medidas con CFM, ASO-PCR y NGS Pronóstico

Estudio	Martinez-Lopez et al. ¹⁴ (2014)
Resultados	<p>Valores de supervivencia según la técnica utilizada (tiempo de progresión y supervivencia global):</p> <p>CFM</p> <p>-Número de pacientes con ERM: 99</p> <p>TP:</p> <ul style="list-style-type: none"> • <10⁵: no alcanzada • >10⁵: 32 meses (24-40) <p>SG:</p> <ul style="list-style-type: none"> • <10⁵: no alcanzada • >10⁵: 110 meses (50-150) <p>ASO-PCR</p> <p>Número de pacientes con ERM: 41</p> <p>TP:</p> <ul style="list-style-type: none"> • <10⁵: no alcanzada • >10⁵: 26 meses (20-32) <p>SG:</p> <ul style="list-style-type: none"> • <10⁵: no alcanzada • >10⁵: no alcanzada <p>NGS</p> <p>Número de pacientes con ERM: 110</p> <p>TP:</p> <ul style="list-style-type: none"> • <10⁵ : 80 meses (48-112) • >10⁵: 31 meses (26-37) <p>SG:</p> <ul style="list-style-type: none"> • <10⁵: no alcanzada • >10⁵: 81 meses (40-122) <p>Concordancia:</p> <p>Concordancia con CFM: 83% de las muestras dio resultados concordantes: 60 (61%) fueron ERM positivas y 22 (22%) fueron ERM negativas por ambas técnicas, con un r2 de 0,58.</p> <p>Discrepancia entre técnicas: 12 pacientes fueron negativos con CFM y positivos con NGS; los 5 pacientes restantes tenían el patrón opuesto CFM+ / NGS-</p> <p>Concordancia con ASO-PCR: 85% de las muestras: 20 (49%) fueron ERM positivas y 15 (36%) fueron ERM negativas por ambos métodos, con un r2 de 0,54. No se analizaron las discrepancias.</p> <p>Pronóstico</p> <p>Los pacientes con ERM negativa evaluada con NGS (con TP mediano no alcanzado) tuvieron un pronóstico significativamente mejor que el de las muestras con CFM+/NGS+ (TP mediano 29 meses, P= 0,0001). Pacientes con ERM CFM-/NGS+ tuvieron un TP intermedio (mediana de 50 meses, P= 5,05) en comparación con los casos con ERM con NGS-.</p> <p>Pacientes con ERM CFM+/NGS-: De los 5 casos sólo un paciente había progresado en el momento de la publicación.</p>

Estudio	Martinez-Lopez et al. ¹⁴ (2014)
Observaciones	<p>EN LA DISCUSION LOS AUTORES MENCIONAN: La NGS evalúa los marcadores tumorales de ADN estables y específicos, proporcionando una cuantificación directa, sensible y objetiva de la carga de enfermedad del mieloma. En este estudio, la NGS identificó un marcador tumoral en el 91% de los pacientes con MM, y por lo tanto fue “aplicable” a 0,90% de los pacientes con MM. La aplicabilidad es un factor crítico en la evaluación de cualquier técnica de evaluación ERM, debido a que una mayor tasa de aplicación se traduce directamente en más pacientes que pueden beneficiarse. La NGS proporciona una mejora significativa en comparación con aplicabilidad ASO-PCR (70%) y evita la necesidad de diseñar sondas de PCR individualizados. Sólo CFM ha demostrado una aplicabilidad más alta (casi el 100%); sin embargo, la sensibilidad de CFM es de 1 a 2 logs menor que el alcanzado por la NGS.</p> <p>También se valoraron como resultados:</p> <p>Identificación de reordenamiento clonal con secuenciación de alto rendimiento: Se detectó un clonotipo con frecuencia >5% en 121 de 133 pacientes con MM. La evaluación de ERM pudo realizarse en el 91% de los pacientes. El reajuste génico más frecuentemente detectado fue el IGH-VDJH (69%; 84/121), al menos un reajuste IGK en 55% (66/121), y reajuste IGH-DJH en 48% (58/121) de los pacientes. Se dispuso de muestras de seguimiento en 110 de 121 pacientes, permaneciendo 80 de ellos (73%) positivos tras la secuenciación con niveles de ERM $\geq 10^{-5}$.</p> <p>Valor pronóstico de la ERM detectada por secuenciación. La negatividad a ERM (ERM <10⁻⁵) se asoció a: mayor tiempo hasta la progresión del tumor (TTP), con una mediana de tiempo de 80 meses frente a 31 meses para pacientes positivos a ERM.</p> <p>Mayor supervivencia total (mediana no alcanzada frente a 81 meses en ERM+)</p>
Nivel de evidencia	2

Bibliografía

- (1) Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet* 2010;11:31-46.
- (2) Rodriguez-Santiago B, Armengol L. Next generation sequencing technology in pre- and postnatal genetic diagnosis. *Diagn Prenat* 2012;23:56-66.
- (3) Wilhelm J. Next-generation DNA sequencing techniques. *N Biotechnol* 2009;25.
- (4) Metzker ML. Emerging technologies in DNA sequencing. *Genome Res* 2005;15:1767-1776.
- (5) Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74:5463-5467.
- (6) Pospisilova S, Gonzalez D, Malcikova J et al. ERIC recommendations on TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2012;26:1458-1461.
- (7) Lukackova R, Gerykova BM, Majerova L, Mladosievicova B. Molecular genetic methods in the diagnosis of myelodysplastic syndromes. A review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2014;158:339-345.
- (8) WHO. International Classification of Diseases for Oncology, 3rd Edition (ICD-O-3). 2000. Geneva, World Health Organization.
- (9) Sant M, Allemani C, Tereanu C et al. Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. *Blood* 2010;116:3724-3734.
- (10) Baliakas P, Hadzidimitriou A, Sutton LA et al. Recurrent mutations refine prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2015;29:329-336.
- (11) Riva L, Luzi L, Pelicci PG. Genomics of acute myeloid leukemia: the next generation. *Front Oncol* 2012;2:40.

- (12) Urrutia G, Bonfill X. [PRISMA declaration: a proposal to improve the publication of systematic reviews and meta-analyses]. *Med Clin (Barc)* 2010;135:507-511.
- (13) Whiting P, Rutjes AW, Reitsma JB, Bossuyt PM, Kleijnen J. The development of QUADAS: a tool for the quality assessment of studies of diagnostic accuracy included in systematic reviews. *BMC Med Res Methodol* 2003;3:25.
- (14) Martinez-Lopez J, Lahuerta JJ, Pepin F et al. Prognostic value of deep sequencing method for minimal residual disease detection in multiple myeloma. *Blood* 2014;123:3073-3079.
- (15) Jethwa A, Hullein J, Stolz T et al. Genetic profile of chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2012;97:58.
- (16) Shih A, Chung SS, Abdel-Wahab O et al. Analysis of therapy-related MDS/AML identifies somatic mutations in nearly all samples and shorter survival associated with TP53 loss or mutation. *Leuk Res* 2013;37:S148-S149.
- (17) Bally C, Renneville A, Ades L et al. Detection of TP53 mutations in myelodysplastic syndromes (MDS) and acute myeloid leukemia (AML). A comparison between a functional method (FASAY) and next generation sequencing (NGS). *Blood* 2014;124.
- (18) Takamatsu H, Murata R, Zheng J et al. Prognostic value of sequencing-based minimal residual disease detection in multiple myeloma. *Blood* 2014;124.
- (19) Morgan E, Kuo F, Dal CP. Comparison of chromosomal abnormalities detected by karyotypic vs. targeted next-generation sequencing analysis in myeloid neoplasms. *Lab Invest* 2015;95:366A.
- (20) Spencer DH, Abel HJ, Lockwood CM et al. Detection of FLT3 internal tandem duplication in targeted, short-read-length, next-generation sequencing data. *J Mol Diagn* 2013;15:81-93.
- (21) Abel HJ, Al-Kateb H, Cottrell CE et al. Detection of gene rearrangements in targeted clinical next-generation sequencing. *J Mol Diagn* 2014;16:405-417.

- (22) Ladetto M, Bruggemann M, Monitillo L et al. Next-generation sequencing and real-time quantitative PCR for minimal residual disease detection in B-cell disorders. *Leukemia* 2014;28:1299-1307.
- (23) Thol F, Kolking B, Damm F et al. Next-generation sequencing for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukemia patients with FLT3-ITD or NPM1 mutations. *Genes Chromosomes Cancer* 2012;51:689-695.
- (24) Luthra R, Patel KP, Reddy NG et al. Next-generation sequencing-based multigene mutational screening for acute myeloid leukemia using MiSeq: applicability for diagnostics and disease monitoring. *Haematologica* 2014;99:465-473.
- (25) Smith AE, Mohamedali AM, Kulasekararaj A et al. Next-generation sequencing of the TET2 gene in 355 MDS and CMML patients reveals low-abundance mutant clones with early origins, but indicates no definite prognostic value. *Blood* 2010;116:3923-3932.
- (26) Roberts I, Alford K, Hall G et al. GATA1-mutant clones are frequent and often unsuspected in babies with Down syndrome: identification of a population at risk of leukemia. *Blood* 2013;122:3908-3917.
- (27) Lionetti M, Fabris S, Cutrona G et al. High-throughput sequencing for the identification of NOTCH1 mutations in early stage chronic lymphocytic Leukemia: Biological and clinical implications. *Blood* 2013;122.
- (28) Rossi D, Khiabani H, Spina V et al. Clinical impact of small TP53 mutated subclones in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2014;123:2139-2147.
- (29) McClure R, Mai M, McClure S. High-throughput sequencing using the ion torrent personal genome machine for clinical evaluation of somatic hypermutation status in chronic lymphocytic leukemia. *J Mol Diagn* 2015;17:145-154.
- (30) Kantorova B, Malcikova J, Smardova J et al. TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia: comparison of different detection methods. *Tumor Biol* 2015;36:3371-3380.
- (31) Malcikova J, Smardova J, Rocnova L et al. Monoallelic and biallelic inactivation of TP53 gene in chronic lymphocytic leukemia: selection, impact on survival, and response to DNA damage. *Blood* 2009;114:5307-5314.

- (32) Rossi D, Rasi S, Fabbri G et al. Mutations of NOTCH1 are an independent predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2012;119:521-529.
- (33) Shanafelt TD, Rabe KG, Kay NE et al. Age at diagnosis and the utility of prognostic testing in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 2010;116:4777-4787.
- (34) Bejar R, Stevenson KE, Caughey B et al. Somatic mutations predict poor outcome in patients with myelodysplastic syndrome after hematopoietic stem-cell transplantation. *J Clin Oncol* 2014;32:2691-2698.
- (35) Dohner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 2015;373:1136-1152.
- (36) Tefferi A, Guglielmelli P, Lasho TL et al. CALR and ASXL1 mutations-based molecular prognostication in primary myelofibrosis: an international study of 570 patients. *Leukemia* 2014;28:1494-1500.
- (37) Walker BA, Boyle EM, Wardell CP et al. Mutational Spectrum, Copy Number Changes, and Outcome: Results of a Sequencing Study of Patients With Newly Diagnosed Myeloma. *J Clin Oncol* 2015.
- (38) Pollán-Santamaría M, López-Abente Ortega G, Aragonés-Sanz N, González-Diego P, Navas-Acién A. Incidencia y mortalidad por leucemias en España. *SEMERGEN* 2001;27:313-316.

