

TRABAJO FIN DE GRADO



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Grado en Medicina

Determinación de MSI en Carcinomas colorrectales por la plataforma "IDYLLA MSI test". Estudio comparativo de sensibilidad diagnóstica, tiempos de respuesta y costes con las dos técnicas usadas habitualmente

Autora: Andrea Muñoz Lajara

Director: Dr. José García Solano

Murcia, Mayo, 2020

TRABAJO FIN DE GRADO



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Grado en Medicina

Determinación de MSI en Carcinomas colorrectales por la plataforma "IDYLLA MSI test". Estudio comparativo de sensibilidad diagnóstica, tiempos de respuesta y costes con las dos técnicas usadas habitualmente

Autora: Andrea Muñoz Lajara

Director: Dr. José García Solano

Murcia, Mayo, 2020



UCAM
UNIVERSIDAD CATÓLICA
SAN ANTONIO

DEFENSA TRABAJO FIN DE GRADO

DATOS DEL ALUMNO	
Apellidos: MUÑOZ LAJARA	Nombre: ANDREA
DNI: 21065225-P	Grado MEDICINA
Facultad Ciencias de la Salud	
Título del trabajo: Determinación de MSI en Carcinomas colorrectales por la plataforma "IDYLLA MSI test". Estudio comparativo de sensibilidad diagnóstica, tiempos de respuesta y costes con las dos técnicas usadas habitualmente	

El Dr. JOSÉ GARCÍA SOLANO tutor del trabajo reseñado arriba, acredito su idoneidad y otorgo el V.º B.º a su contenido para ir a Tribunal de Trabajo fin de Grado.

En Murcia, a 19 de MAYO de 2020

Fdo:

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor, José García Solano, por su completa disposición, dedicación y paciencia desempeñada durante toda la elaboración de este trabajo. Así como por haberme ofrecido las herramientas y conocimientos necesarios para poder realizarlo.

A todo el equipo del servicio de Anatomía patológica del Hospital General Universitario Santa Lucía de Cartagena, por abrirme sus puertas y prestar las instalaciones y ayuda necesaria.

A mi familia, por el apoyo incondicional depositado y el sacrificio invertido durante esta etapa académica, confiando en mí para que pudiera lograr mis metas.

A mis amigos de grado, por estos seis años de compañerismo, risas y confidencias que han sido indispensables.

A Iván, por haber sido un pilar fundamental durante esta etapa, ofreciéndome todo su apoyo siempre que lo necesitaba.

Por último, agradecer a la Universidad Católica San Antonio de Murcia por brindarme la oportunidad de estudiar Medicina.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	9
RESUMEN	15
ABSTRACT	17
INTRODUCCIÓN	19
OBJETIVOS DEL ESTUDIO	25
MATERIALES Y MÉTODOS	27
RESULTADOS	35
DISCUSIÓN	39
CONCLUSIONES.....	43
BIBLIOGRAFÍA	45
TABLAS E IMÁGENES	49

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

CCR	Cáncer colorrectal
CCRHs	Carcinomas colorrectales hereditarios
PAF	Poliposisadenomatosa familiar
CCRHNP	CCRH no polipósico o Síndrome de Lynch
MSI	Inestabilidad de microsatélites
MSI-L	Inestabilidad de microsatélites baja
MSI-H	Inestabilidad de microsatélites alta
MMR	Complejo de genes reparadores
MSS	Estabilidad o ausencia de inestabilidad de microsatélites
IHQ	Inmunohistoquímica
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

RESUMEN

Introducción: la determinación del estatus MSI en los CCR es importante por su valor pronóstico y predictivo de la respuesta a la quimioterapia. Su determinación se puede llevar a cabo mediante el análisis inmunohistoquímico (IHQ), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o, a través de la técnica “Idylla MSI test”. Los objetivos del presente estudio son valorar la concordancia diagnóstica entre las tres técnicas, determinar el tiempo de respuesta y el coste por determinación y repercutido con cada una de ellas.

Materiales y métodos: estudio observacional, analítico y de cohortes, en el que se analizó la presencia de MSI mediante las tres técnicas (IHQ, PCR e Idylla test) en 16 pacientes diagnosticados de CCR en el Hospital General Universitario Santa Lucía de Cartagena, entre enero de 2009 y enero de 2019. El grado de concordancia fue definido por el coeficiente Kappa de Cohen.

Resultados y discusión: hemos observado como la concordancia entre la prueba de PCR y el test Idylla ha sido exacta ($k=1$), siendo ésta estadísticamente significativa. Por el contrario, la concordancia entre la determinación por IHQ en comparación con los dos test restantes (PCR e Idylla), ha sido moderada ($k=0,5$), no siendo esta estadísticamente significativa. Las tres técnicas han detectado MSI cuando la pérdida era de dobles proteínas. En cambio, solo la técnica IHQ ha detectado MSI cuando había pérdida de una proteína no dominante.

Conclusión: la técnica de IHQ se postula como el test más fiable en el diagnóstico de MSI del CCR. Los resultados diagnósticos de los test Idylla y PCR son semejantes. En cuanto al tiempo de respuesta, el test Idylla es el que tiene un tiempo de respuesta mejor. Y en relación al coste por prueba, la técnica PCR es el test más económico.

Palabras clave: Cáncer colorrectal, Inestabilidad de microsatélites, Inmunohistoquímica, Reacción en cadena de la polimerasa, Idylla test.

ABSTRACT

Introduction: The determination of the MSI status in the CCR is paramount due to its prognostic and predictive value of response to chemotherapy. Its determination can be carried out by means of immunohistochemistry analysis (IHC), polymerase chain reaction (PCR) or, through the “Idylla test” technique. The objectives of the current study are to value the diagnostic agreement among the three techniques, determine the response time and the cost by determination, and the repercussions of each one of them.

Materials and methods: observational, analytical and of cohort study, in which the presence of MSI was analysed through three techniques (IHC, PCR and Idylla test) in 16 patients diagnosed with CCR at the Hospital General Universitario Santa Lucia de Cartagena, between January 2009 and January 2019. The degree of agreement was defined by the Cohen’s kappa coefficient.

Results and discussion: we have observed how the agreement between the PCR test and the Idylla test was accurate ($k=1$), being this statistically significant. On the contrary, the concordance between the determination by IHC compared with the two remaining test (PCR and Idylla), has been moderate ($k= 0.5$), not being this statistically significant. All three techniques have detected MSI when the loss was from double proteins. Nevertheless, only the IHC technique has detected MSI when there was some loss of a non-dominant protein.

Conclusion: the IHC technique is postulated as the most reliable test in the diagnosis in the MSI assesment of CCR. The diagnostic results of the PCR and Idylla tests are similar. Regarding the response time, the Idylla test is the best concerning this matter. Finally, concerning costs the PCR technique is the cheapest test.

Key words: Colorectal cancer, Microsatellite instability, immunohistochemistry, Polymerase chain reaction, Idylla test.

INTRODUCCIÓN

El cáncer colorrectal (CCR) representa el tumor más frecuente diagnosticado en España en ambos sexos, siendo el segundo en varones después de próstata y el segundo en mujeres después de mama. En relación a la mortalidad por cáncer en nuestro país, el CCR es la segunda causa de fallecimiento en ambos sexos tras el cáncer de pulmón.¹ Desde el punto de vista epidemiológico, la edad media de presentación es 70-71 años y, la mayoría de las personas que lo padecen, tienen más de 50 años en el momento del diagnóstico. La incidencia del CCR varía en función de la edad, siendo ésta el principal factor de riesgo para padecerlo, incrementándose de forma notoria a partir de la quinta década. No hay claro predominio de cáncer por sexo.¹

La mayor parte de los CCR tienen un origen esporádico, dado que las mutaciones que lo desarrollan tienen lugar en la línea celular somática. Hay un pequeño porcentaje de CCR que se originan en la línea celular germinal y se les denomina carcinomas colorrectales hereditarios (CCRHs).²⁻⁵ La presencia de una lesión premaligna conocida como adenoma o pólipo adenomatoso, es el factor de riesgo más importante desencadenante de un CCRHs. Dentro de este subtipo de CCRHs, los más importantes en cuanto a frecuencia estarían: la poliposisadenomatosa familiar (PAF) y el CCRH no polipósico (CCRHN) o síndrome de Lynch. Este último representa el 75% de los CCRHs.^{2,3}

Los tumores malignos colorrectales pueden originarse en cada una de las tres capas: mucosa, muscular y serosa. El tipo histológico más frecuente es el adenocarcinoma en un 90-95%.¹

Desde un punto de vista etiopatogénico, existen tres vías de carcinogénesis bien caracterizadas en el CCR.⁶

En primer lugar, tenemos la **vía supresora o inestabilidad cromosómica**. Es la vía más frecuentemente implicada y se caracteriza por la presencia de anomalías cromosómicas con pérdidas y ganancias alélicas.

Estas alteraciones promueven la carcinogénesis mediante la inactivación de genes supresores de tumores (APC, SMAD4, DDC y TP53) y el aumento del número de

copias de oncogenes. Es la responsable del 80% de CCR esporádicos.⁶ Cuando se produce la mutación del gen APC en la línea germinal, tiene lugar la PAF.²⁻⁵

La segunda vía de carcinogénesis en frecuencia es la **inactivación transcripcional mediada por metilación de las citosinas**. Éstas, se hallan localizadas en las llamadas islas CpG del promotor de determinados genes supresores de tumores.⁶

En tercer lugar, tenemos la **vía mutadora o inestabilidad de microsatélites (MSI)**, base de este estudio, por lo que a continuación, vamos a explicarla con mayor detalle.

Esta vía, supone una vía alternativa a la supresora, en la que el mecanismo de carcinogénesis es el acúmulo de mutaciones en el genoma por un defecto en el llamado sistema de reparación del ADN, compuesto por cuatro genes (MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2). Estas mutaciones tienden a ocurrir con mayor frecuencia en secuencias repetitivas cortas del ADN (microsatélites), lo que comporta el acúmulo de mutaciones en determinados genes claves en el ciclo celular que contienen dichos microsatélites. Aparece en más del 95% de CCRHNP, sin embargo, cuando observamos un tumor con MSI es más probable que se trate de un CCR esporádico que de un CCRHNP, puesto que el primero es el tipo de CCR más frecuente, como hemos comentado anteriormente. Esta vía constituye el marcador fenotípico del síndrome de Lynch, en el que existe una mutación germinal en uno de los cuatro genes reparadores del ADN, siendo la inactivación de MLH1 la más frecuente. Esta vía de carcinogénesis se ha asociado recientemente a la vía serrada de carcinogénesis, en la que la lesión precursora del CCR es el pólipo serrado en lugar del adenoma convencional.⁶

Destacar que, puede encontrarse más de una vía alterada en un mismo CCR.⁶

Hay tres grandes grupos de CCR con inestabilidad de microsatélites. El CCR serrado, que aproximadamente en un 15% puede presentar inestabilidad de microsatélites y, los CCR con características histopatológicas de inestabilidad de microsatélites (MSI-H): el CCRHNP o Síndrome de Lynch y el CCR MSI-H esporádico. Ambos van a presentar las mismas características histopatológicas. Son CCRs con heterogeneidad morfológica y zonas mucinosas que incluso, incluyen células en anillo

de sello, con zonas medulares y tubulares sin necrosis intraluminal y, todo esto, asociado a una intensa respuesta linfoide peritumoral con formación de folículos linfoides reactivos peritumorales (respuesta linfoide de tipo Crohn) e intratumoral (linfocitos intraepiteliales:TILs).⁷

No obstante, aunque las características histopatológicas en los dos grupos sean muy semejantes, las características clínicas y moleculares van a diferir entre ellos:

- 1- En el Síndrome de Lynch, el patrón de herencia es autosómico dominante con alta penetrancia, aunque incompleta. Está causado por mutaciones germinales en alguno de los genes reparadores del ADN "MMR" (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2). La mayoría se han identificado en los genes MLH1 (50 %) y MSH2 (40 %). Este síndrome predispone al desarrollo de CCR, principalmente, así como a neoplasias extracolónicas como el cáncer de endometrio, ovario, intestino delgado, estómago, uréter, vía biliar, páncreas, próstata, entre otros. El Síndrome de Lynch se caracteriza por el desarrollo temprano de CCR, habitualmente a una edad media de 45 años, dos décadas antes que los tumores esporádicos aproximadamente y un número escaso de adenomas. No se ha podido establecer relaciones sólidas genotipo-fenotipo aunque, se han observado determinadas tendencias. Así, las mutaciones en MSH2 se han asociado a una edad de diagnóstico de CCR más temprana y a un mayor predominio de tumores extracolónicos que en MLH1. Las mutaciones en MSH6 se asocian a un mayor riesgo de desarrollar cáncer endometrial y a una edad de diagnóstico del CCR más tardía. El diagnóstico del Síndrome de Lynch emprende un reto diagnóstico debido a la gran heterogeneidad clínica que posee. Por esta razón, se han descrito distintos criterios clínicos que permiten sospecharlo. En la actualidad, disponemos de los criterios de Amsterdam I-II y los de Bethesda revisados que se basan tanto en la historia familiar de cáncer de los pacientes como en las características moleculares de los tumores asociados a este síndrome. De este modo, si el tumor presenta MSI-H y/o ausencia de expresión de una determinada proteína reparadora por inmunohistoquímica (IHQ), se procede a la búsqueda de mutaciones en el gen MMR candidato a estudio.⁸

2- En la gran mayoría de los CCR MSI-H esporádicos, el fenotipo MSI se explica por la ausencia de expresión del gen MLH1 provocada por la hipermetilación de su promotor. La edad de presentación del CCR suele ser a partir de los 50 años. En los CCR MSI-H esporádicos, el marcador molecular que resulta de gran utilidad para distinguirlo de los CCR MSI hereditarios es la mutación V600E del gen BRAF. Esta mutación está presente en el 80-90% de los tumores MSI esporádicos con metilación bialélica del promotor de MLH1, pero sin embargo, no se detecta en los tumores MSI hereditarios asociados a una mutación germinal en MLH, como el Síndrome de Lynch.⁸

Un aspecto importante de los CCRs es la respuesta al tratamiento, cada vez más personalizada en función de sus características moleculares. Por este motivo, en los últimos años, se ha hecho imprescindible identificar si existe inestabilidad de microsatélites en los diferentes tipos de cáncer. A grandes rasgos, los CCR con MSI tienen un pronóstico mejor que los CCR con estabilidad de microsatélites (MSS) y, su respuesta a tratamiento es diferente.

Recientemente, la evidencia clínica ha demostrado que la presencia de MSI constituye un biomarcador predictivo para el tratamiento con inmunoterapia.⁹

Además de MSI, también influye la carga mutacional tumoral y la expresión de una proteína transmembrana de tipo 1 con un papel inmunorregulador significativo mediante la supresión del sistema inmunitario (PD-1). La relación entre estos marcadores es compleja y todavía no está claro si la presencia de varios ellos es superior a la de uno solo.⁹

El tratamiento habitual del CCR metastásico se basa en quimioterapia sistémica que mejora la mediana de supervivencia global. Se utiliza como piedra angular el 5-fluorouracilo en combinación con Leucovorina.¹⁰ Años más tarde, junto a estos tratamientos se ha complementado el Irinotecan u oxiplatino. Los CCRs con MSI responden de forma diferente a la quimioterapia convencional. Presentan una mejor respuesta al tratamiento con irinotecán.¹¹ Sin embargo, existen estudios contradictorios sobre la sensibilidad de estos tumores al principal agente quimioterápico del CCR, el 5-fluorouracilo.¹²

Los últimos estudios consideran que la MSI, en estadios II de enfermedad, no

predice una mejor respuesta a dicho tratamiento. Este hecho es de suma importancia pues actualmente, los pacientes con CCR estadio II y MSI no son candidatos a recibir esta quimioterapia adyuvante.¹³

La mayor prevalencia de mutaciones para el CCR metastásico se debe a mutaciones RAS. Las mutaciones NRAS son obligatorias antes de iniciar el tratamiento con anticuerpos monoclonales anti- EGFR en pacientes con CCR metastásico. Puesto que éstos, Cetuximab y Panitumumab, se utilizan de manera restringida en pacientes con CCR metastásico que presentan mutación KRAS de tipo salvaje y mutación del exón 2.¹⁰

La mutación BRAF V600E es un biomarcador significativo de pobre pronóstico en CCR aunque, su valor como biomarcador para predecir la respuesta al anticuerpo monoclonal anti-EGFR, no es claro. En la Sociedad Europea de pautas de oncología médica se recomienda la prueba de mutación BRAF como marcador pronóstico.

Además, el estado mutacional de BRAF es un indicador importante en pacientes con CCR con MSI que probablemente se beneficiarán de tratamiento con inmunoterapia.¹⁰

Con este estudio, queremos aportar nueva información para la detección de MSI en CCRs puesto que actualmente, el diagnóstico de MSI adquiere un gran valor diagnóstico, dado que su presencia influye en el pronóstico y tratamiento del CCR.

La detección de MSI en el CCR se puede realizar mediante tres técnicas.

La primera es mediante el estudio inmunohistoquímico de las proteínas reparadoras MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2 en el tejido tumoral. El patólogo observa si hay pérdida de expresión de alguna de estas proteínas. Si no se observa tinción nuclear en las células neoplásicas y, sin embargo, se mantiene la tinción positiva en las células normales adyacentes del estroma, del tejido linfoide o de la mucosa normal colónica (control interno positivo), se considera la inmunotinción negativa y por tanto, el adenocarcinoma sería inestable (MSI-H).¹³

La segunda técnica que podemos emplear es el análisis de microsatélites sobre material genético, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y electroforesis, valorándose las mutaciones en los nucleótidos que constituyen los microsatélites. Se tiende a utilizar marcadores mononucleótidos (BAT-26 es el más

empleado) puesto que, no necesitan ser comparados con ADN no tumoral.⁵ Los resultados que obtenemos permiten clasificar la inestabilidad en tres grados: tumor con alta inestabilidad de microsatélites (MSI-H); tumor con baja inestabilidad de microsatélites (MSI-L) y; tumor con ausencia de inestabilidad de microsatélites o tumor con estabilidad de microsatélites (MSS).¹³

La tercera, es el análisis de microsatélites mediante la plataforma “IDYLLA MSI TEST”, base del presente estudio. Esta prueba es totalmente automatizada y realiza la detección de inestabilidad de microsatélites directamente de secciones de tejido tumoral embebido en parafina fijada con formalina (FEPE) utilizando PCR seguido de un análisis de curva de fusión de alta resolución.¹⁴ Realiza la detección de mutaciones en 7 nuevos loci MSI (ACVR2A, BTBD7, DIDO1, MRE11, RYR3, SEC31A y SULF2). Al igual que la PCR, no requiere el análisis de muestra de tejido normal.

En este estudio, vamos a explicar con más detalle cómo se realiza la detección de MSI mediante la técnica IDYLLA TEST. Además, compararemos su concordancia diagnóstica, su rapidez de respuesta y el coste total (que incluye el de la determinación de la técnica y el repercutido referido al tiempo utilizado por los profesionales para realizar la técnica), frente a las otras dos técnicas utilizadas habitualmente: inmunohistoquímica y PCR.

OBJETIVOS DEL ESTUDIO

OBJETIVO PRINCIPAL:

1. Comparar los resultados de la detección de inestabilidad de microsatélites por la técnica de IDYLLA TEST con los resultados obtenidos de las dos pruebas que se utilizan habitualmente: técnica de IHQ y PCR, determinando la concordancia diagnóstica entre las tres técnicas.

OBJETIVOS SECUNDARIOS:

1. Valorar el tiempo de respuesta con cada una de las técnicas en la realización de la inestabilidad de microsatélites desde el día de la petición de la técnica hasta el día de salida de resultados.

2. Valorar el coste por determinación y repercuido de cada una de las tres técnicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se trata de un estudio observacional, analítico, de cohortes, con una toma de información de manera retrospectiva. El estudio se ha llevado a cabo en el servicio de Anatomía Patológica del Hospital General Universitario Santa Lucía de Cartagena, entre diciembre de 2019 y mayo de 2020. Este hospital presta atención sanitaria a un total de 280.000 habitantes.

Para su realización, se identificaron los casos de CCR a estudio sobre los que se había analizado la presencia de MSI mediante la técnica de inmunohistoquímica. Estos casos fueron diagnosticados en el área de dicho hospital entre enero de 2009 y enero de 2019. Durante este periodo de tiempo, se diagnosticaron 1234 CCRs de los cuales, 435 tenían realizada la MSI con la técnica de IHQ. Destacar, que se incluyeron en el estudio únicamente los casos de CCR que disponían de inmunohistoquímica y de muestra de material genético. Se excluyeron aquellos casos de CCR sin inmunohistoquímica o sin muestra de ADN disponible.

Como las determinaciones del Test Idylla de que disponemos para realizar el trabajo son limitadas (n=16), se optó por seleccionar del total de casos estudiados por IHQ (n=435), aquellos con pérdidas de expresión por parejas MLH1 con PMS2 (n=2 casos) y MSH2 con MSH6 (n=2 casos) que son las más habituales en la clínica diaria y casos con pérdida de expresión de proteína no dominante en solitario, que son muy raros en la práctica clínica: pérdida de PMS2 (n=2 casos) y pérdida de MSH6 (n=2 casos). El resto de casos (n=8) son casos cogidos al azar de entre el total de casos restantes. Una vez constituido el tamaño muestral del estudio (n=16), se recogió el informe inmunohistoquímico de cada caso, en una base de datos tipo Microsoft Excel, y se realizó el análisis de MSI mediante las otras dos técnicas a valorar: PCR e Idylla test.

Estudio inmunohistoquímico

El análisis de MSI mediante inmunohistoquímica se le realizó a todos aquellos casos de CCR cuyas características histopatológicas hacían sospechar la existencia de MSI.

Para ello, una muestra representativa del tumor y de la mucosa normal adyacente fue fijada en formol, incluida en parafina y dividida en secciones de 3 μm . Cada muestra fue procesada con el sistema PT link (Dako, Glostrup, Denmark).

En cada muestra de tejido tumoral se analizó la expresión de cuatro de las proteínas que forman el complejo de inestabilidad MMR (hMLH1, hMSH2, hMSH6 y hPMS2), por separado.

Cuando la tinción para cada proteína, fue positiva en más de un 50% de núcleos de células tumorales, se consideró que estaba siendo expresada y que, por tanto, no existía MSI. Para poder comparar los resultados de la inmunohistoquímica con la PCR e Idylla test, se denominó a este evento como MSS.

Cuando únicamente se tiñeron entre un 10% y un 50% de núcleos de células tumorales, se consideró que la expresión de la proteína era parcial y que la presencia de MSI era baja (MSI-L). En cambio, cuando sólo hubo tinción en menos del 10% de núcleos de células tumorales, se consideró que había pérdida de expresión de la proteína estudiada y que por tanto, la presencia de MSI era alta (MSI-H). La tinción de la mucosa normal adyacente al tumor (células de las criptas, células del estroma y linfocitos) se usó como control interno positivo.

Análisis de inestabilidad de microsatélites por PCR

El análisis de MSI se realizó sobre material genético ya extraído. Para llevarlo a cabo se usó un panel de tres marcadores de mononucleótidos: BAT-25, BAT-26 y NR-27.

Las reacciones de amplificación tuvieron un volumen final de 20 μl y fueron preparadas con 10-100 ng de ADN; 1 amortiguador por PCR; 1,5 mM de MgCl₂; 0,25 mM de dNTP; 0,5 μM de cada cebador y 0,5 unidades de ADN polimerasa TaqPlatinum (Invitrogen). Esta disolución fue amplificada mediante PCR según las siguientes instrucciones: incubación inicial a 95°C durante 5 minutos, seguida de 40 ciclos a 95°C durante 30 segundos, 54°C durante 45 segundos, 72°C durante 60 segundos y finalmente, incubación a 72°C durante 10 minutos. Los marcadores amplificados fueron separados mediante electroforesis con el sistema QIAxcel.

La separación se realizó con un voltaje de 2 KV, un periodo de inyección de 30 segundos para el marcador de alineación y de 40 segundos para cada muestra, y un tiempo de separación de 700 segundos. Los resultados de la separación en el secuenciador se obtuvieron mediante el software Biocalculator de Quiagen.

Cuando se observaron alteraciones en el patrón de migración de las bandas del marcador se consideró que las secuencias de microsatélites contenían mutaciones. Los patrones de bandas dudosos fueron revaluados por un segundo observador.

En ningún caso, durante la evaluación, se conocían los resultados de la inmunohistoquímica.

Se consideró que había ausencia de MSI en el tumor (MSS) cuando no se detectaron alteraciones en los marcadores estudiados. Se interpretó que la presencia de MSI era baja (MSI-L) cuando únicamente uno de los marcadores fue positivo para MSI. Aquellos casos con dos o más marcadores alterados se consideraron como CCRs con presencia alta de MSI (MSI-H).

Análisis de inestabilidad de microsatélites por Plataforma IDYLLA TEST

Mediante el método Idylla test, se introduce la muestra que queremos analizar en el cartucho. Cada cartucho sirve para una sola muestra y tras utilizarlo se debe tirar.

La muestra cargada en el cartucho se escanea mediante un código de barras. De este modo, existe menor error a la hora de poner los números de muestra manualmente y menor contaminación. Esta es prácticamente imposible puesto que los cartuchos van cerrados y no hay contacto de la muestra con la plataforma. En cambio, es sensible al aire ambiente, por lo que puede existir contaminación ambiental.

Los biomarcadores de homopolímeros monomórficos que se utilizan para comprobar la existencia de MSI son 7: ACVR2A, BTBD7, DIDO1, MRE11, RYR3, SEC31A y SULF2. Estos biomarcadores son estables en distintas etnias para distintos tipos de cáncer. Esta técnica automatiza todo el proceso desde la preparación de la muestra hasta el informe del estado de MSI. La detección de MSI

es cualitativa, se amplifica por PCR y luego se analiza por detección de fusión de alta resolución mediante un score de MSI. Se elimina la necesidad de un control de procesamiento de muestra adicional en el cartucho.

Los tres posibles resultados que nos ofrece este instrumento son: no existencia de mutación, existencia de mutación o resultado inválido. Se interpreta como mutado si el score es de 0,5-1.

El patólogo tiene que delimitar mínimo un 20% de células tumorales en la muestra. Si esto no se cumple, es necesario realizar una ampliación de células tumorales en la muestra. Las muestras deben fijarse con formol al 10% durante mínimo 6 horas y embeberse en parafina a puntos de fusión menor de 60°.

No se deben emplear muestras teñidas, si lo están, deben desteñirse previamente al uso de esta plataforma. Las muestras se pueden poner en portas o en microtubos y los cortes se pueden guardar a 15-30° durante 60 días. Los cortes deben ser de 5 o de 10 micras y la muestra completa, debe rellenar el cuadrado que contiene el cartucho. Por último, los filtros que se ponen en las muestras son con agua y es aconsejable quitar los linfocitos, las células estromales y las células necróticas.

De igual modo, se interpretaron los resultados como en la técnica PCR siendo las posibilidades: MSS, MSI-L o MSI-H.

Variables del estudio

- Marcadores IHQ: hMLH1, hMSH2, hMSH6 y hPMS2.
- Marcadores PCR: BAT-25, BAT-26 y NR-27.
- Marcadores Idylla: ACVR2A, BTBD7, DIDO1, MRE11, RYR3, SEC31A y SULF2.
- Resultados de las técnicas empleadas: MSS, MSI-L y MSI-H.
- Facultativos: técnico de laboratorio y patólogo.
- Tiempo de las técnicas: se mide en minutos y horas.
- Coste de las técnicas y facultativos: se mide en euros.

Análisis de tiempos de respuesta de cada una de las técnicas

Se ha realizado una búsqueda de los tiempos de respuesta de los informes de IHQ y de PCR para MSI en el programa informático Pathwin, que es específico de Anatomía Patológica, en el que constan las fechas de entrada de la petición dedicha prueba por parte del Servicio de Oncología y las fechas de salida de resultados que se plasman en el programa cuando las firma el patólogo.

Los tiempos del test Idylla se calcularon cuando se realizaron los test, considerando fecha de petición el día que se ha iniciado la realización del test y fecha de salida el día que se valida por parte del patólogo el resultado automático de la prueba.

Estudio de costes por determinación y repercutidos de las tres pruebas

Los costes por determinación se han consultado con el supervisor del Servicio de Anatomía Patológica que dispone de las tarifas totales de cada Kit que se adquiere para dichas determinaciones. Posteriormente, se calcularon los costes para cada técnica de manera individualizada. A este coste por técnica se le han sumado los costes repercutidos por el tiempo de trabajo que necesita el técnico de laboratorio para realizar cada técnica y patólogo para interpretarla. Para traducir este tiempo necesario de cada profesional en coste, se ha dividido el sueldo medio de cada profesional (al mes), entre el tiempo en minutos que dedica al mes en su trabajo (22 días laborables a 420 minutos por día = 9240 minutos al mes). Hemos considerado como media de sueldo de patólogo 3.500 euros al mes que divididos por los 9240 minutos que trabaja supone un gasto de 0,38 euros/minuto de trabajo. En el caso del técnico de laboratorio hemos considerado un sueldo medio al mes de 1300 euros que entre los 9240 minutos supone un gasto de = 0,14€/minuto. El coste repercutido por el tiempo de cada profesional se calculará multiplicando el tiempo que se necesita para cada prueba por los euros/minuto de cada uno.

Recogida y análisis de los resultados

Se creó una tabla de recogida de datos en Microsoft Excel y todos los análisis estadísticos se realizaron mediante el paquete del programa SPSS versión 20.0. Se agruparon los datos obtenidos en cada prueba en variables cualitativas (MSS o MSI). Puesto que no hay una prueba "Gold standard" para la detección de MSI

hemos comparado la concordancia diagnóstica entre las tres técnicas (IHQ, PCR e Idylla).

El análisis estadístico consistió en medir el grado de concordancia inter-técnicas mediante el empleo del test estadístico de coeficiente Kappa de Cohen (k). Este coeficiente permite identificar la proporción de concordancias observadas sobre el total de observaciones, excluyendo las concordancias atribuibles al azar. El índice Kappa toma valores entre -1 y +1, teniendo presente que los resultados más próximos a +1, disponen de un grado mayor de concordancia inter-observador. Mientras que, el valor Kappa más próximo o igual a 0, refleja que la concordancia observada es más atribuible al azar. Se asumió un grado de significación estadística (p) del 5% ($p < 0,05\%$).

Consideraciones Éticas

Este estudio se ha realizado respetando los principios y las normas éticas básicas que tienen su origen en la actual revisión (versión revisada de Fortaleza, Brasil, 2013) de la Declaración de Helsinki aprobada por la Asamblea Médica Mundial y el Convenio de Oviedo.

La información recogida para el estudio ha sido tratada siguiendo lo dispuesto en la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales (así como en su reglamentación posterior, Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal) y la Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica. Toda la información y datos con relación a pacientes o su participación en este estudio, han sido considerados confidenciales. El comité de ética del Hospital General Universitario Santa Lucía de Cartagena ha aprobado la realización del presente estudio.

El investigador ha garantizado que se mantiene el anonimato del paciente en toda la información introducida en el cuaderno de recogida de datos. El investigador conserva con carácter estrictamente confidencial todos los documentos relacionados con el estudio. Solamente el personal autorizado ha tenido acceso a estos archivos confidenciales. Todos los datos utilizados en los análisis y en los

informes de este estudio no han tenido ninguna referencia identificable de ningún nombre específico. Para ello, los datos han sido codificados garantizando el anonimato y confidencialidad en todo momento.

Limitaciones del estudio:

La limitación más grande de este trabajo es el poco número de casos que hemos podido estudiar, debido al número limitado de determinaciones que disponíamos del test Idylla que nos cedió el laboratorio gratuitamente para este trabajo. Por tanto, el tamaño muestral tan bajo dificulta mucho el poder realizar comparaciones entre las técnicas y el estudio estadístico entre ellas.

RESULTADOS

En este estudio se incluyó a un total de 16 pacientes diagnosticados de CCR a los que, ante la sospecha histopatológica de MSI, se les realizó el estudio inmunohistoquímico al diagnóstico. Seguidamente se realizó la MSI a estos 16 casos mediante la técnica de PCR y con el test Idylla, comparando los resultados de las tres pruebas.

Análisis de microsatélites mediante inmunohistoquímica, PCR e Idylla Test

El análisis de microsatélites mediante las tres técnicas se resume en la tabla 1.

Por IHQ se observa que un 50% son MSS y un 50% MSI-H. No hay casos MSI-L. Con la técnica de PCR y con Idylla test se observa que el 25% de los casos son MSI-H y un 75% MSS.

En relación a la **técnica de IHQ**, el 50% de los pacientes no han mostrado pérdida de ninguna de las proteínas analizadas (MLH1, MLH2, MLH6 y PMS2), por lo que son MSS (estos son los casos seleccionados al azar de todos los casos analizados por IHQ). En el otro 50% se observan los casos seleccionados para observar el comportamiento de las otras dos técnicas con esos tipos de inestabilidad: en el 25% pérdida de parejas de proteínas funcionales (MLH1-PMS2 y MSH2-MSH6) y en el otro 25% pérdida de sólo una proteína no dominante (MSH6 y PMS2).

Desde el punto de vista de la **técnica PCR**, en relación con los casos de pérdida de expresión de las parejas funcionales por IHQ, la técnica de PCR detecta igualmente inestabilidad. Un 12,5% ha mostrado mutación de las tres proteínas, un 6,25% ha presentado la pérdida conjunta de BAT-26 y NR-27 y otro 6,25% la pérdida de BAT-25 y BAT-26. El 75% de los pacientes no han presentado pérdida de ninguna de las 3 proteínas analizadas (BAT-25, BAT-26 y NR-27). En estos casos, se incluye el 25% de pacientes que son MSI-H por IHQ, en los que no se ha detectado la pérdida de expresión de sólo una proteína reparadora no dominante.

En relación al **test Idylla**, observamos que presenta resultados iguales que la técnica de PCR. En el 75% de pacientes no ha presentado ninguna pérdida de

las 7 proteínas analizadas (ACVR2A, BTBD7, DIDO1, MRE11, RYR3, SEC31A y SULF2). Se puede observar como el 18,75% ha mostrado la pérdida de las 7 proteínas y un 6,25% ha presentado la pérdida de 6 de ellas, todas exceptuando la proteína SEC31A.

Comparación estadística de las tres pruebas:

En la tabla 2 se resumen los resultados obtenidos tras emplear el test estadístico de coeficiente Kappa de Cohen (k).

Observamos como la concordancia entre la prueba de PCR y el test Idylla es exacta ($k=1$), siendo ésta estadísticamente significativa ($p<0.0001$). Por el contrario, la concordancia entre la determinación por IHQ en comparación con los dos test restantes (PCR e Idylla), es moderada ($k=0,5$), no siendo ésta estadísticamente significativa ($p=0,21$).

Análisis de tiempos de respuesta de cada técnica

Los tiempos de respuesta se resumen en la tabla 3.

Se han consultado los informes de cada una de las técnicas ($n=16$) realizadas por IHQ en el programa informático Pathwin. Se ha observado que existe una respuesta variable de entre 72 horas y 48 horas con una media de respuesta que está más próxima a 72 horas que a las 48 horas. Para la técnica de PCR se observó una media de respuesta de 48 horas y el test de Idylla estaba listo en 3 horas que se computó como un día (24 horas) de tiempo de respuesta.

Análisis de los costes totales: por determinación de cada técnica y costes repercutidos según el tiempo empleado en las técnicas por los facultativos

Los costes de las determinaciones se resumen en la tabla 4.

Con la técnica de **IHQ**, cada determinación tiene un coste de 15 euros. Por lo que las 4 determinaciones que hay que realizar (una por cada proteína) asciende a un coste total por paciente de 60 euros. Si tenemos en cuenta los costes repercutidos según el tiempo de cada profesional implicado en la misma (técnico y patólogo) vemos que el técnico necesita una media de 30 minutos para su realización que multiplicado por el coste por minuto de técnico se repercutirán 4,2

euros más y, el patólogo necesita unos 15 minutos para su diagnóstico por lo que se repercuten 5,7 euros más. En total la técnica de IHQ costaría 69,9 euros por paciente.

Cada técnica de **PCR** supone un coste de 40€. Si tenemos en cuenta el coste repercutido del técnico (30 minutos multiplicado por 0,14 euros el minuto) son 4,2 euros. De este modo el total de la prueba son 44,2 euros. No hay tiempo de patólogo en esta prueba ya que no participa.

El test **Idylla**, tiene un coste por cada determinación de 120€. Si le sumamos el tiempo repercutido del técnico (el patólogo no participa) (5 minutos multiplicado por 0,14 euros el minuto) que son 0,7 euros, obtenemos un total de 120,7 euros por determinación.

DISCUSIÓN

La determinación de si un adenocarcinoma colorrectal presenta o no inestabilidad de microsátélites es primordial para el oncólogo, ya que este análisis es un importante factor pronóstico y predictivo de la respuesta a ciertos tratamientos quimioterápicos.⁹⁻¹²

En la actualidad, se solicita a todos los adenocarcinomas colorrectales que son subsidiarios de valorarse por oncología. Normalmente la técnica se realiza por IHQ aunque en los hospitales con mayor número de recursos se puede realizar por PCR. No obstante, debido a la persistente preocupación del oncólogo por disponer lo antes posible de los resultados de las pruebas que solicita en general, y de esta en particular, y de la insistente preocupación de los gerentes de los hospitales de la contención del gasto, hemos creído interesante valorar la plataforma Idylla test. Esta es una técnica muy novedosa en el mercado que cuenta con una alta valoración por su rapidez en la obtención del resultado sin necesidad de multitud de recursos por parte del técnico de Anatomía Patológica ni del patólogo. Disponemos de un estudio de referencia sobre dicha plataforma que demostró la validez de la técnica para discriminar entre MSS y MSI-H mediante un análisis totalmente automatizado. Actualmente, debido a su reciente aparición, se continúa estudiando el desarrollo de marcadores de mayor rendimiento para la obtención de MSI.³⁰

Además, tenemos que comentar que el trabajo se ha realizado con solo 16 pacientes porque son las determinaciones que nos ha cedido la plataforma Idylla, gratuitamente, para poder realizar este trabajo.

En estudios previos ya se ha visto que la concordancia entre los resultados de la determinación de MSI por IHQ y la determinación por PCR es cercana al 100%.^{28,29} En nuestro trabajo, si comparamos los resultados obtenidos por IHQ con los de la PCR, observamos que la concordancia es menor ($k=0,5$). Al comparar los resultados de los casos en los que existe pérdida de parejas de proteínas, tanto la IHQ como la PCR detectan dicha inestabilidad, pero cuando se observa solo la pérdida de expresión de sólo una proteína no dominante, (pérdida de PMS2 o pérdida de MSH6 en solitario) la PCR no detecta inestabilidad. En los casos ($n=8$) en los que la IHQ no detectaba inestabilidad (no se observaba pérdida de expresión de ninguna proteína), la concordancia ha sido del 100% con la PCR.

Si comparamos los resultados de la IHQ con los del test Idylla observamos una respuesta parecida a la comparación con la PCR. El test Idylla detecta inestabilidad cuando hay pérdida de dobles proteínas, pero no cuando hay pérdida de solo una proteína no dominante. En los casos en los que la IHQ no detectaba inestabilidad, la concordancia también ha sido del 100% con el test Idylla.

Comparando el test Idylla y la PCR observamos que sus resultados son semejantes, logrando una concordancia exacta ($k=1$).

En cuanto al tiempo de realización de los test, observamos como la IHQ es el procedimiento que más tiempo requiere para obtener un resultado. El tiempo de la elaboración de la técnica por parte del técnico así como el tiempo del patólogo para poder valorar su resultado suele ser de unos 45 minutos de media. No obstante, en el trabajo asistencial diario, hay que priorizar en estas determinaciones IHQ porque la presión con esta técnica es muy grande en casi todas las áreas de la patología oncológica y la determinación de MSI suele en muchas ocasiones demorarse por haber otras pruebas IHQ más urgentes. En el caso de que no existiese tanta presión asistencial, el oncólogo podría disponer de resultados de esta prueba en 24h. No obstante, con motivo de este trabajo, se ha intentado acortar el tiempo de la IHQ al crear un protocolo en el que ya cuando se está diagnosticando el adenocarcinoma colorrectal, el patólogo selecciona el bloque del tumor y solicita dicha técnica sin necesidad de esperar a que la solicite el oncólogo. Con esto, el resultado de la IHQ de la MSI podría estar disponible casi al mismo tiempo que el resultado del estudio del adenocarcinoma, con lo que el oncólogo no observaría demora en el diagnóstico de dicha técnica.

En la PCR el tiempo de respuesta medio es de unas 48 h, pero al igual que con la técnica de IHQ, la presión asistencial obliga, en ocasiones, a demorar la prueba. Si la presión asistencial fuese menor, el oncólogo podría disponer de resultados de la prueba por PCR en unas 24 h.

En cuanto al test Idylla, como no había petición oficial, se ha calculado según la realización del mismo, que son unas 3h y se ha computado como 24h de tiempo de respuesta en una hipotética petición oficial por parte de Oncología. Aunque este test tarda muy poco tiempo en su realización, el tiempo de respuesta total

dependerá de la disponibilidad del personal técnico en cada momento para poder realizarlo. En caso de poca presión asistencial podría ser de unas horas.

En cuanto al coste de las pruebas, hemos observado que **Idylla test** es la más cara de todas (120,7 euros). La más barata es la PCR (44,2 euros) y la IHQ muestra un coste intermedio entre las dos, ligeramente mayor al de la PCR (69,9 euros). Como muchos de los laboratorios de Anatomía Patológica de la Región de Murcia no disponen de técnicas adecuadas ni del personal especializado para realizar PCR y cada vez más la presión asistencial sobre el patólogo a la hora de realizar técnicas de IHQ es mayor, el test Idylla se posiciona como una gran alternativa a la IHQ con resultados semejantes a la PCR. Además, esta prueba se puede realizar con un menor número de recursos técnicos y sin necesidad de conocimientos de biología molecular por parte del personal técnico que realiza la prueba. El coste por determinación es todavía muy alto, pero es de esperar que con el tiempo las determinaciones sean más baratas.

Si bien, estos resultados son poco valorables debido a que los casos en los que hemos realizado el estudio son escasos, debiéndose realizar más pruebas para llegar a unas conclusiones más fiables y definitivas. Este test Idylla es muy novedoso en el mercado y no hay todavía experiencia de sus resultados en ningún hospital de la Comunidad Autónoma de Murcia y pocos a nivel nacional.

Creemos que con vista a resultados obtenidos en este corto número de casos, la **determinación por IHQ** del estatus MSI es la técnica que utilizan todos los laboratorios de Anatomía Patológica de manera estándar. Esta técnica que tiene más precisión diagnóstica y cuenta con un coste más asequible, nos permite observar en qué tipo de tejido y células se produce la pérdida de expresión de cada una de las proteínas, mientras que en la técnica de PCR y test Idylla incluyen tanto células neoplásicas como normales o de otro tipo sin poder discriminarlas, lo que puede disminuir el rendimiento diagnóstico de estas pruebas. El único punto débil es su tiempo de respuesta, motivado por la presión asistencial.

La **técnica de PCR** para el estatus MSI es una prueba relativamente rápida y económica, pero que necesita una infraestructura a nivel de patología molecular y unos conocimientos técnicos específicos. No todos los laboratorios de Anatomía Patológica tienen este tipo de técnicas, reservándose solo para los hospitales de

mayor tamaño. Además, una de las mayores desventajas de la PCR es que algunos patrones de inestabilidad no son fácilmente reconocibles lo que puede producir errores en la interpretación y discrepancias entre observadores.

La **plataforma de Idylla** es una técnica que obtiene unos resultados semejantes a la PCR y que presenta el mejor tiempo de respuesta de los tres test aunque su coste sea bastante más elevado. La sencillez de manejo y que no sea necesario disponer de aparataje extra de patología molecular, así como la no necesidad de saber interpretar los resultados como ocurre en la PCR, hace que pueda tener un menor número de errores de interpretación de resultados interobservador. Es una tecnología muy reciente, pero con el paso del tiempo es muy probable que las determinaciones de la prueba sean mucho más baratas y pase a ser un equipo de primera línea en los laboratorios de Anatomía Patológica.

CONCLUSIONES

Comparando los resultados de los tres test, la técnica de IHQ se postula como el test más fiable en el diagnóstico de la MSI del adenocarcinoma colorrectal frente a los dos test restantes. Los resultados diagnósticos de los test Idylla y PCR son semejantes entre ellos.

En cuanto al tiempo de respuesta, el test Idylla es el que tiene un tiempo de respuesta mejor, siendo en general de 1 día en comparación con 2 y 3 días de la PCR y la IHQ, respectivamente.

En cuanto a coste por prueba, el test PCR es el test más económico de los tres, seguido por el de IHQ con un coste ligeramente superior y por último, con el test Idylla, que es el más caro.

BIBLIOGRAFÍA

1. González Flores, E. Cáncer de colon y recto. Sociedad Española de Oncología Médica. 14 enero 2020. [Consultado 4 abril 2020]. Disponible en: <https://seom.org/info-sobre-el-cancer/colon-recto?showall=1>
2. Abbas AK, Kumar V, Fausto N, Mitchell R. Robbins Patología Humana. 8ª. ed. Madrid: Elsevier; 2008.
3. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND. WHO Classification of Tumours of the Digestive System. 4th. ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2010.
4. American College of Medical Genetics. Technical standards and guidelines for genetic testing for inherited colorectal cancer (Lynch syndrome, familial adenomatous polyposis, and MYH-associated polyposis). United States of America. Genet Med; 2014.
5. Goel A, Nagasaka T, Hamelin R, Boland CR. An Optimized Pentaplex PCR for Detecting DNA Mismatch Repair-Deficient Colorectal Cancers. PloSONE. 2010;5(2):e9393.
6. Balaguer F, Piñol V, Castells A. Cáncer colorrectal. En: Miguel A. Montoro Huguet. Libro de Gastroenterología y Hepatología. Problemas comunes en la práctica clínica. 2ª Edición. Barcelona: Jarpyo Editores, S.A; 2012. p. 617-626.
7. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Rüschoff J, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. J Natl Cancer Inst. 2004;96(4):261-8.
8. Bandres F, Urioste M. Planteamientos básicos del cáncer hereditario: principales síndromes. Madrid: Fundación Tejerina; 2011.
9. Luchini C, Bibeau F, Ligtenberg MJL, Singh N, Nottegar A, Bosse T, et al. ESMO recommendations on microsatellite instability testing for immunotherapy in cancer, and its relationship with PD-1/PD-L1 expression and tumour mutational burden: a systematic review-based approach. Annals of Oncology. agosto de 2019;30(8):1232-43.
10. Prieto-Potin I, Montagut C, Bellosillo B, Evans M, Smith M, Melchior L, et al. Multicenter Evaluation of the Idylla NRAS-BRAF Mutation Test in

- Metastatic Colorectal Cancer. *The Journal of Molecular Diagnostics*. septiembre de 2018;20(5):664-76.
11. Bertagnoli MM, Niedzwiecki D, Compton CC, Hahn HP, Hall M, Damas B, et al. Microsatellite instability predicts improved response to adjuvant therapy with irinotecan, fluorouracil, and leucovorin in stage III colon cancer: Cancer and Leukemia Group B Protocol 89803. *J Clin Oncol*. 2009;27(11):1814-21.
 12. Tejpar S, Saridaki Z, Delorenzi M, Bosman F, Roth AD. Microsatellite instability, prognosis and drug sensitivity of stage II and III colorectal cancer: more complexity to the puzzle. *J Natl Cancer Inst*. 2011;103(11):841-4.
 13. Navarro S, Pérez-Saura P, Ramón y Cajal S, Salazar R, García-Foncillas J, Musulén Palet, et al. Consenso Nacional de la Sociedad Española de Anatomía Patológica y de la Sociedad Española de Oncología Médica. Recomendación para la determinación de biomarcadores en el carcinoma colorrectal. *Rev Esp Patol*. 2012;45(3):130-144.
 14. Samaison L, Grall M, Staroz F, Uguen A. Microsatellite instability diagnosis using the fully automated Idylla platform: feasibility study of an in-house rapid molecular testing ancillary to immunohistochemistry in pathology laboratories. *J Clin Pathol*. diciembre de 2019;72(12):830-5.
 15. Guerrero D, Balen E, Martínez-Peñuela JM, García-Foncillas J, Larrinaga B, Cristina Caballero M, et al. Asociación entre la inestabilidad de microsatélites y las características clínicas y anatomopatológicas en pacientes con cáncer de colon esporádico. *Medicina Clínica*. abril de 2005;124(12):441-6.
 16. Lin PS, Semrad TJ. Molecular Testing for the Treatment of Advanced Colorectal Cancer: An Overview. *Methods Mol Biol*. 2018;1765:281-297.
 17. Van Haele M, VanderBorghet S, Ceulemans A, Wieërs M, Metsu S, Sagaert X, et al. Rapid clinical mutational testing of *KRAS*, *BRAF* and *EGFR*: a prospective comparative analysis of the Idylla technique with high-throughput next-generation sequencing. *J Clin Pathol*. enero de 2020;73(1):35-41.
 18. Johnston L, Power M, Sloan P, Long A, Silmon A, Chaffey B, et al. Clinical performance evaluation of the Idylla NRAS-BRAF mutation test on

- retrospectively collected formalin-fixed paraffin-embedded colorectal cancer tissue. *J Clin Pathol*. abril de 2018;71(4):336-43.
19. Weyn C, Van Raemdonck S, Dendooven R, Maes V, Zwaenepoel K, Lambin S, et al. Clinical performance evaluation of a sensitive, rapid low-throughput test for KRAS mutation analysis using formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples. *BMC Cancer*. diciembre de 2017;17(1):139.
20. García-Solano J, Conesa-Zamora P, Carbonell P, Trujillo-Santos J, Torres-Moreno DD, Pagán-Gómez I, et al. Colorectal serrated adenocarcinoma shows a different profile of oncogene mutations, MSI status and DNA repair protein expression compared to conventional and sporadic MSI-H carcinomas. *Int J Cancer*. 2012;131(8):1790-9.
21. Franczak C, Dubouis L, Gilson P, Husson M, Rouyer M, Demange J, et al. Integrated routine workflow using next-generation sequencing and a fully-automated platform for the detection of KRAS, NRAS and BRAF mutations in formalin-fixed paraffin embedded samples with poor DNA quality in patients with colorectal carcinoma. Troncone G, editor. *PLoS ONE*. 27 de febrero de 2019;14(2):e0212801.
22. Diaz LA, Le DT, Yoshino T, Andre T, Bendell JC, Koshiji M, et al. KEYNOTE-177: Randomized phase III study of pembrolizumab versus investigator-choice chemotherapy for mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high metastatic colorectal carcinoma. *J Clin Oncol*. 2017;35(4).
23. Betés Ibáñez M, Muñoz Navas M. Factores pronósticos del cáncer colorrectal. *AnMed Interna (Madrid) [Internet]*. julio de 2008 [citado 8 de abril de 2020];25(7). Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-71992008000700001&lng=en&nrm=iso&tlng=en
24. Colling R, Wang LM, Soilleux E. Validating a fully automated real-time PCR-based system for use in the molecular diagnostic analysis of colorectal carcinoma: a comparison with NGS and IHC. *J Clin Pathol*. julio de 2017;70(7):610-4.
25. Le Flahec G, Guibourg B, Marcorelles P, Uguen A. Financial implications of Idylla testing in colorectal cancer, lung cancer and melanoma: a French laboratory point of view. *J Clin Pathol*. octubre de 2017;70(10):906-7.

26. Ortiz C, Dongo-Pflucker K, Martín-Cruz L, Carrillo CB, Mora-Alferez P, Arias A. Inestabilidad de microsatélites en pacientes con diagnóstico de cáncer colorrectal. :8.
27. Chen ML, Chen JY, Hu J, Chen Q, Yu LX, Liu BR, et al. Comparison of microsatellite status detection methods in colorectal carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol.* 2018;11(3):1431-1438.
28. Cawkwell L, Gray S, Murgatoyd H, Sutherland F, Haine L, Longfellow M, et al. Choice of management strategy for colorectal cancer based on a diagnostic immunohistochemical test for defective mismatch repair. *Gut.* 1999;45(3):409-415.
29. Dieumegard B, Grandjouan S, Sabourin JC, Le Bihan M-L, Lefrère I, Bellefqih, et al. Extensive molecular screening for hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2000;82(4):871-880.
30. De Craene B, Van de Velde J, Rondelez E, Vandebroek L, Peeters K, Vanhoey T, et al. Detection of microsatellite instability (MSI) in colorectal cancer samples with a novel set of highly sensitive markers by means of the Idylla MSI Test prototype. *JCO.* 20 de mayo de 2018;36(15_suppl):e15639-e15639.
31. Förster I, Brockmann M, Schildgen O, Schildgen V. Microsatellite instability testing in colorectal cancer using the QiaXcel advanced platform. *BMC Cancer.* 2018;18(1):484.

TABLAS E IMÁGENES

Tabla 1. Tabla de frecuencias de los resultados de MSI obtenidos mediante las tres técnicas diagnósticas utilizadas en este estudio.

	IHQ		PCR		IDYLLA	
	(n /%)		(n /%)		(n /%)	
MSI-H	8	50,0%	4	25,0%	4	25,0%
MSI-L	-	-	-	-	-	-
MSS	8	50,0%	12	75,0%	12	75,0%

Tabla 2. Comparación del coeficiente Kappa en las tres técnicas utilizadas en este estudio.

		PCR				IDYLLA			
		MSS	MSI-L / MSI-H	p-valor	kappa	MSS	MSI-L / MSI-H	p-valor	kappa
IHQ	MSS	8 (50%)	-			8 (50%)	-		,50
	MSI-L / MSI-H	4 (25%)	4 (25%)	,021	,50	4 (25%)	4 (25%)	,021	
		12 (75%)	4 (25%)			12 (75%)	4 (25%)		
		IHQ				IDYLLA			
		MSS	MSI-L / MSI-H	p-valor	kappa	MSS	MSI-L / MSI-H	p-valor	kappa
PCR	MSS	8 (50%)	4 (25%)			12 (75%)	-		
	MSI-L / MSI-H	-	4 (25%)	,021	,50	-	4 (25%)	,000	1
		8 (50%)	8 (50%)			12 (75%)	4 (25%)		
		IHQ				PCR			
		MSS	MSI-L / MSI-H	p-valor	kappa	MSS	MSI-L / MSI-H	p-valor	kappa
IDYLLA	MSS	8 (50%)	4 (25%)			12 (75%)	-		
	MSI-L / MSI-H	-	4 (25%)	,021	,50	-	4 (25%)	,000	1
		8 (50%)	8 (50%)			12 (75%)	4 (25%)		

p-valor para verificar la importancia de las diferencias entre categorías. Punto de corte de significación estadística inferior a 0,05.

Tabla 3. Tiempo de respuesta de cada una de las técnicas.

	IHQ	PCR	IDYLLA
Tiempo de respuesta	72h	48h	24h

Tabla 4. Costes totales de las técnicas (en euros).

	IHQ	PCR	IDYLLA
Coste Técnica	15X4=60	40	120
Repercutido Técnico	4,2	4,2	0,7
Repercutido Patólogo	5,7	0	0
TOTAL	69,9	44,2	120,7

Imagen 1: IHQ de CCR con MSI-H y pérdida de expresión de MLH1.

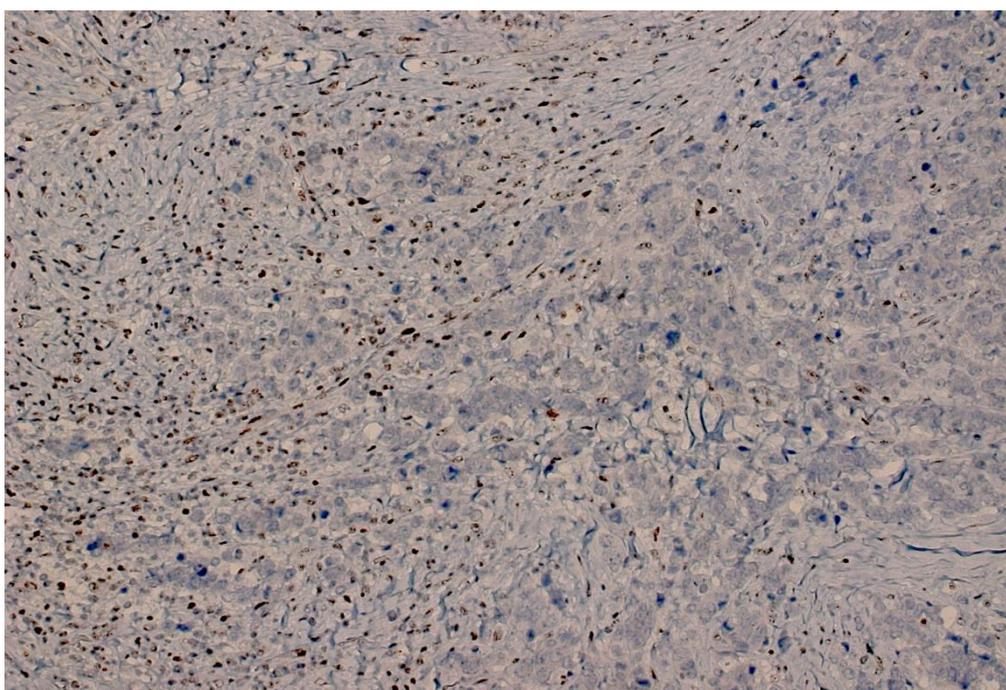


Imagen 2. IHQ de CCR con MSI-H y pérdida de expresión de MSH2 y MSH6.

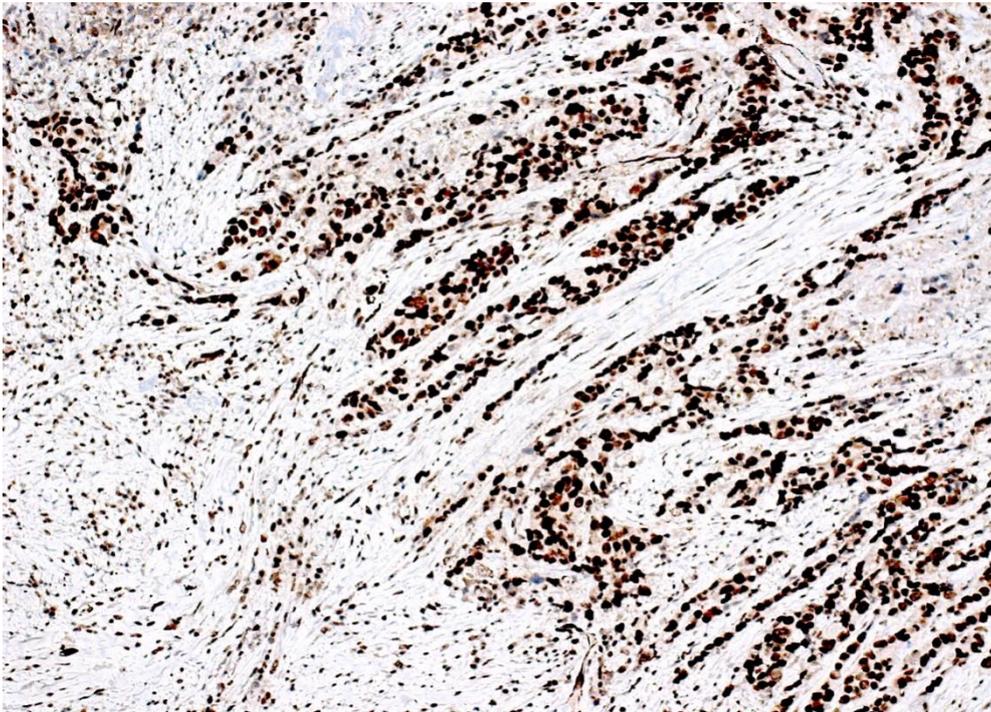


Imagen 3. IHQ de CCR con MSI-H y pérdida de expresión de PMS2.

