

## RECOMENDACIONES METODOLÓGICAS PARA EL MONITOREO MOLECULAR *BCR-ABL1* EN PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA POR PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL

IRENE LARRIPA<sup>1</sup>, MARÍA SOL RUIZ<sup>2</sup>, MARINA GUTIÉRREZ<sup>3</sup>, MICHELE BIANCHINI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Medicina Experimental (IMEX-CONICET), Academia Nacional de Medicina, <sup>2</sup>Centro de investigaciones Oncológicas, Fundación Cáncer (CIO-FUCA), Instituto Alexander Fleming, <sup>3</sup>Stambouliau, Buenos Aires, Argentina

**Resumen** Actualmente las guías clínicas para el manejo de pacientes con leucemia mieloide crónica incluyen el monitoreo molecular de *BCR-ABL1* por PCR cuantitativa en tiempo real; esta metodología permite definir la respuesta molecular. A pesar de la probada importancia pronóstica de la respuesta molecular, en muchos casos no se tiene en cuenta que la PCR cuantitativa puede producir datos muy variables, que pueden afectar la validez de los resultados, y hacer difícil la comparación entre diferentes laboratorios. Por lo tanto, para un manejo clínico óptimo, es absolutamente necesaria la estandarización de las metodologías de medición de *BCR-ABL1*. La estrategia para obtener valores de *BCR-ABL1* comparables consiste en la adopción de la escala internacional. La conversión a la escala internacional se logra mediante la aplicación de un factor de conversión específico para cada laboratorio; este factor de conversión se puede obtener mediante el uso de calibradores secundarios validados, que hoy se producen en Argentina, en el marco del programa nacional de armonización. Por otra parte, con el objetivo de mitigar las diferencias entre laboratorios y facilitar criterios uniformes en la interpretación de los resultados y presentación de los informes, decidimos preparar estas guías de laboratorio. Esto permitirá además a los laboratorios poder evaluar su calidad de trabajo, tarea muy importante, en particular para aquellos centros más aislados, que no tienen fácil acceso a costosos kits comerciales o programas internacionales de intercambio de muestras.

**Palabras clave:** leucemia mieloide crónica, monitoreo molecular, estandarización

**Abstract** *Guidelines for molecular monitoring of BCR-ABL1 in chronic myeloid leukemia patients by RT-qPCR.* Current clinical guidelines for managing chronic myeloid leukemia include molecular monitoring of *BCR-ABL1* transcript quantitative reverse-transcription PCR. Despite the proven prognostic significance of molecular response, it is not widely appreciated that quantitative reverse-transcription PCR potentially produces highly variable data, which may affect the validity of results, making comparability between different laboratories difficult. Therefore, standardized reporting of *BCR-ABL1* measurements is needed for optimal clinical management. An approach to achieve comparable *BCR-ABL1* values is the use of an international reporting scale. Conversion to the international scale is achieved by the application of laboratory specific conversion factor that is obtained by using validated secondary reference calibrators. Moreover, with the aim to mitigate the interlaboratory imprecision of quantitative *BCR-ABL1* measurements and to facilitate local laboratory results interpretation and reporting, we decide to prepare laboratory guidelines that will further facilitate interlaboratory comparative studies and independent quality-assessment programs, which are of paramount importance for worldwide standardization of *BCR-ABL1* monitoring results, in particular for those most isolated laboratories, with not easy access to commercial kits or sample interchange programs.

**Key words:** chronic myeloid leukemia, molecular monitoring, standardization

La introducción del *Gleevec* (Mesilato de Imatinib, Novartis) como inhibidor de tirosin quinazas (ITKs), en el tratamiento de primera línea de la leucemia mieloide crónica (LMC), transformó, no solamente el abordaje terapéutico de la LMC, sino también la evolución misma de la enfermedad y la metodología necesaria para monitorear la respuesta al tratamiento. Estos fenómenos se profundi-

zaron con la llegada de los ITKs de segunda generación, como por ejemplo el *Tasigna* (Nilotinib, Novartis), que por su mayor potencia, provoca, en la mayoría de los casos, una rápida normalización de los parámetros hematológicos y citogenéticos<sup>1</sup>. Consiguientemente, gracias a estas terapias molecularmente dirigidas, la mayoría de los pacientes con LMC, tratados en la fase crónica de la enfermedad, alcanzan la repuesta citogenética completa (RCC) al cabo de un año de tratamiento. Sin embargo, aun con RCC, la médula ósea puede todavía contener un número muy elevado de células leucémicas (alrededor de 10<sup>6</sup> células); esto sugiere dos importantes cuestiones: la

Recibido: 29-III-2016

Aceptado: 25-VII-2016

**Dirección postal:** Dr. Michele Bianchini, CIO-FUCA Instituto A. Fleming, Zabala 2836, 1426 Buenos Aires, Argentina  
e-mail: mbianchini@conicet.gov.ar

primera, que la normalización de los valores citogenéticos se debe a la baja sensibilidad de esta metodología de monitoreo, y no a la efectiva desaparición de la enfermedad, la segunda, la necesidad de recurrir a metodologías de monitoreo más sensibles.

Es así que en el estudio IRIS (*International Randomized Study of Interferon and ST1571*) fue necesario implementar la PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) con el objeto de medir, con una sensibilidad superior (hasta 10 000 veces más sensible), los niveles de transcrito quimérico *BCR-ABL1* en leucocitos de sangre periférica, de aquellos pacientes que alcanzaban la RCC<sup>2</sup>. En base a los resultados obtenidos en el IRIS, teniendo en cuenta la profundidad de la respuesta molecular alcanzada y el tiempo necesario para conseguir ese valor, se pudieron establecer “endpoints” moleculares con significado pronóstico<sup>3</sup>. El más significativo de ellos seguramente fue la definición de respuesta molecular mayor (RMMa; *BCR-ABL1*/gen control < 0.1%) que hoy todavía representa uno de los principales objetivos clínicos a alcanzar. También, a partir de este estudio, se definieron los umbrales moleculares para caracterizar la respuesta óptima, *warning* y falla, que tienen en cuenta no solamente la profundidad de la respuesta terapéutica alcanzada, sino también el tiempo necesario para obtenerla<sup>4</sup>.

Además de estas importantes cuestiones pronósticas, el IRIS evidenció, por primera vez, otro importante aspecto vinculado al manejo clínico del paciente con LMC: la necesidad de una armonización de las metodologías de qRT-PCR. Efectivamente, los resultados moleculares obtenidos en el IRIS son informados de acuerdo a metodologías armonizadas a una escala única de referencia, conocida como escala internacional (IS, del inglés *International Scale*). Por lo tanto hoy, la correcta interpretación clínica de los resultados cuantitativos, depende estrictamente de la posibilidad de contar con un laboratorio alineado a la IS.

Es interesante destacar que tanto la guía Americana (NCCN, *National Comprehensive Cancer Network*), como la Europea (ELN, *European Leukemia Net*), consideran al monitoreo molecular por qRT-PCR la mejor opción para definir respuesta terapéutica y el seguimiento del paciente; pero esto es válido siempre y cuando los estudios provengan de laboratorios alineados a la IS y validados todos los años; por tal motivo, a nuestro criterio, la estandarización, tiene que formar parte de un programa integral en el marco del control clínico de los pacientes con LMC<sup>5</sup>.

Nosotros recomendamos realizar el monitoreo molecular en forma regular durante el tratamiento cada 3 meses; sin embargo hay algunas diferencias con respecto a la frecuencia sugerida, dependiendo de la guía consultada: la ELN recomienda hacerlo a partir del tercer mes y luego cada 3 meses hasta alcanzar la RMMa; luego al menos cada 6 meses. La NCCN recomienda hacerlo al diagnóstico y luego cada 3 meses (o cada 6 una vez alcanzada la RCC) durante 3 años. Lo importante es entender que

un monitoreo molecular frecuente posibilita al médico: 1) determinar con precisión y rapidez qué nivel de respuesta alcanzó su paciente y si puede mantenerla en el tiempo; esto permite identificar rápidamente los casos con menor probabilidad de una respuesta óptima; 2) detectar tempranamente aumentos en los niveles de *BCR-ABL1*, posibilitando tomar rápidamente decisiones que pueden tener impacto en la evolución a largo plazo. Hay evidencias que indican que un aumento significativo en los niveles de *BCR-ABL1* (> 1 Log) durante el tratamiento anticipa con cierta precisión la posible recaída. 3) La disponibilidad de estudios moleculares seriados y a intervalos regulares permite conocer que, a pesar de la remisión molecular alcanzada, la batalla contra el clon leucémico está todavía en curso, y que cualquier reducción prematura en la “intensidad” del tratamiento podría favorecer el crecimiento del clon leucémico, con el consecuente aumento de los niveles de *BCR-ABL1*. A pesar de que la suspensión temporaria del tratamiento a veces responde a una decisión clínica (p.ej. toxicidad de la dosis utilizada) muchas veces es el resultado de una baja adherencia del paciente. Por lo tanto, realizar *tests* regularmente facilita identificar los períodos de baja adherencia. 4) El incremento en los niveles del *BCR-ABL1* podría también representar una señal de selección de algún clon mutado que confiera resistencia a los inhibidores; sin embargo, cabe aclarar que las mutaciones explican en promedio solo un 50% de los casos resistentes, con un porcentaje muy variable (entre 19 y 91%), que depende del método de detección, la población en estudio y el estadio de la enfermedad. Por lo tanto otras causas de resistencia, tanto dependientes como independientes del *BCR-ABL1* pueden estar dificultando una buena respuesta al tratamiento.

Teniendo en cuenta todo lo expuesto, el objeto de este trabajo es proponer criterios para la armonización, interpretación e informe de los *tests* moleculares realizados, con el propósito de monitorear la respuesta de pacientes con LMC tratados con inhibidores de tirosina quinasa. Estas recomendaciones son el producto de un consenso que se logró gracias a la colaboración de un grupo de expertos argentinos en el tema, que a través de su experiencia personal y las sugerencias de otras guías internacionales, consideraron útil preparar este documento dirigido y adaptado para la realidad latinoamericana. Esperamos que este trabajo contribuya a unificar criterios y mitigar las diferencias, haciendo más eficaz la toma de decisiones terapéuticas adecuadas.

### **Papel de la escala internacional para la armonización de las pruebas moleculares para *BCR-ABL1*: recomendaciones generales**

A pesar de que la qRT-PCR es la metodología de elección para el monitoreo molecular a nivel mundial, todavía falta

uniformidad y consenso en cuanto al procedimiento para obtener los resultados; además, es un método complejo, donde intervienen muchos factores, entre ellos: conservación de las muestras, extracción del ARN, retrotranscripción del ARN a ADNc, eficiencia de la qRT-PCR, plataforma utilizada y gen control empleado.

Por estas razones, la variabilidad final en los resultados puede ser muy elevada, comprometiendo su potencial significado clínico.

La IS representa un método práctico y teóricamente adoptable por cualquier centro, que posibilita la comparabilidad de los resultados de qRT-PCR obtenidos en diferentes laboratorios; consecuentemente, los médicos de cualquier parte del mundo pueden adoptar las guías internacionales de tratamiento para pacientes con LMC. Esta escala se establece en el año 2005, en ocasión del *meeting* de un grupo de expertos en LMC en el NIH (*National Institute of Health*, Bethesda, EE.UU.); además de la IS, como referencia para informar los resultados de qRT-PCR, el grupo de expertos evidenció la necesidad de determinar un factor de conversión (FC) específico, como herramienta para adoptar esta escala.

La IS es una derivación del estudio IRIS que, al utilizar por primera vez un material único de referencia, compuesto por ARNs de 30 pacientes con LMC al diagnóstico, sin tratamiento, lleva a cabo el primer proceso de estandarización. Con este material, cada uno de los 3 laboratorios principales que participaron del IRIS (Adelaida, Londres y Mannheim), pudo estimar un valor de referencia específico (valor basal), calculando el promedio de los cocientes *BCR-ABL1/gen control* obtenidos mediante qRT-PCR de las 30 muestras. Esto posibilitó la comparabilidad de los resultados de qRT-PCR, ya que estos se expresaban como reducción logarítmica con respecto al valor basal obtenido en cada laboratorio. Por eso, a veces, cuando nos referimos a la RMMa hablamos de una reducción de 3 Logs con respecto al valor basal (que no representa el valor inicial de cada paciente). Para poder transformar a una escala única de valores, y hacer más sencilla la comparación y la interpretación de los resultados, se introdujo la IS; de forma totalmente arbitraria se estableció que en la IS, el valor basal equivale al 100% (para esto se hacía necesario calcular un factor de conversión, fácilmente obtenible realizando el cociente  $100\%/\text{valor basal}\%$ ). En términos absolutos, por lo tanto, la RMMa adquiere en la IS, el valor del 0.1% ya que esto equivale a 3 Logs por debajo del 100%. Está claro que este mismo proceso de conversión tendrían que realizarlo todos aquellos laboratorios que quisieran alinear sus resultados a la IS; el problema es que, si al tiempo del IRIS los laboratorios disponían del material de referencia inicial, este obviamente no era suficiente para que más laboratorios en el mundo puedan determinar su FC a la escala internacional. Lo que sí había eran metodologías certificadas que podían garantizar la propagación de la

IS a través de un intercambio de muestras de pacientes; el laboratorio australiano de Timothy Hughes y Susan Branford en Adelaida se hizo cargo de esta importante tarea, que a pesar de ser laboriosa, costosa y accesible solo para grandes centros, ha posibilitado la armonización del monitoreo molecular de varios laboratorios, inclusive en Argentina<sup>6</sup>.

Sin embargo, lo ideal en este campo sería disponer de un material de referencia universal, que pueda ser recibido por el laboratorio que quiera estandarizarse, con frecuencia anual, para garantizar la conservación del FC. Por tal motivo *The first World Health Organization International Genetic Reference Panel for quantitation of BCR-ABL mRNA* fue aprobado por una comisión de expertos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2009; este material de referencia universal está disponible para los laboratorios de todo el mundo, como calibradores "primarios" de la OMS<sup>7</sup>. Técnicamente este material consiste en una mezcla de líneas celulares liofilizadas que expresan 4 niveles diferentes de *BCR-ABL1* en un rango de valores entre 10% y 0.01%; estos calibradores primarios tienen un valor nominal asignado, en base a una extensa caracterización con metodologías de qRT-PCR ya certificadas a la IS. Sin embargo, la dificultad en producir este material biológico sumado a la gran demanda, obligó a la organización internacional a reducir su ambicioso proyecto de estandarización mundial y limitar su disponibilidad solamente para aquellos centros que puedan producir calibradores "secundarios", es decir cuenten con las herramientas y *know-how* necesarios para generar calibradores derivados de los primarios; la tendencia entonces en este campo, es la de favorecer e incentivar iniciativas locales que puedan ayudar a descentralizar la producción y distribución de los calibradores.

En Argentina, por primera vez, gracias a la colaboración entre academia (Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires), investigación y desarrollo (CIO-FUCA, Instituto A. Fleming de Buenos Aires) y farmacéutica (Novartis Argentina SA), se concibió una iniciativa (Fig. 1) que tiene como principal objetivo generar calibradores secundarios para que todos aquellos laboratorios que quieran realizar el monitoreo molecular de la LMC, puedan hacerlo de acuerdo a la IS. El material en cuestión es concebido con los mismos criterios de los calibradores primarios de OMS y distribuido localmente con el soporte técnico necesario para su correcto uso e interpretación. Para su elaboración es importante generar *stocks* iniciales de HL-60 y K562 criopreservados en nitrógeno líquido, que permitan contar con grandes cantidades de células con un número de pasaje similar. Por otro lado, las células cosechadas para la realización de los calibradores deben encontrarse en fase de crecimiento exponencial, nunca superando una densidad de  $1 \times 10^6$  células/ml. La mezcla inicial de células HL-60 y K562, consiste en una dilución 50:1, la cual se corresponde con un valor nominal de %

BCR-ABL1/ABL1 cercano al 10%. Esta primera dilución es utilizada para realizar diluciones seriadas de factor 10, obteniendo mezclas cuyos valores nominales son cercanos a 1%, 0.1% y 0.01%. A continuación,  $2 \times 10^6$  de células en un volumen de 1ml de PBS son distribuidas en viales de vidrio aptos para liofilización, y mantenidos en hielo hasta el momento de ser colocados en el equipo (*AdVantage-Plus freeze dryer*, VIRTIS), el cual debe encontrarse pre-enfriado a  $-50^{\circ}\text{C}$ . Al finalizar el ciclo de liofilización, los viales son sellados y guardados a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su distribución. Su estabilidad a temperatura ambiente ha sido demostrada hasta los 6 meses. Sin embargo, en lo posible, es recomendable almacenar los calibradores a  $-20^{\circ}\text{C}$ , y el ARN extraído a partir de ellos debe ser guardado a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Con el objetivo de que cada laboratorio pueda conocer el límite de detección de su metodología, se ha elaborado un quinto calibrador secundario, cuyo valor nominal es de alrededor de 0.001%, es decir, 1-log de reducción con respecto al calibrador más diluido. Este calibrador no es utilizado en el cálculo del FC, sino que permite determinar cuál es la capacidad del método de detectar respuestas moleculares profundas (RM<sup>5.0</sup>). En caso de que el resultado, para este calibrador, sea indetectable, puede deberse a distintos factores, consideraremos las siguientes situaciones: 1) el número de copias de *ABL1* es menor que 100 000; 2) el número de copias de *ABL1* es mayor a 100 000.

En el primero de los casos los laboratorios deberán introducir modificaciones a su protocolo de qRT-PCR, que permitan aumentar el número de copias del gen control. Los factores que pueden contribuir a dicho aumento incluyen: evaluar la calidad de la muestra y del ARN obtenido; aumentar la cantidad de ARN y/o de *random primers* en la retro-transcripción; modificar los tiempos de retro-transcripción; evaluar la presencia de inhibidores en la reacción de qPCR provenientes de la retro-transcripción (mediante diluciones del ADNc).

En el segundo caso, es posible que exista una diferencia en la eficiencia de retro-transcripción del gen control *ABL1* en comparación con *BCR-ABL1*. Dado que las curvas de eficiencia son normalmente realizadas con plásmidos, no evalúan las diferencias en la eficiencia de retro-transcripción. Es importante tener presente que el paso de retro-transcripción introduce una variabilidad significativa en el proceso de cuantificación, particularmente en una situación de baja expresión del gen *target*, baja concentración de ARN, y pobre calidad del material de partida<sup>8</sup>. Se sugiere entonces, a manera de análisis exploratorio (no de rutina), evaluar la eficiencia del paso de retro-transcripción utilizando curvas de ARN. Para ello, es recomendable utilizar un ARN *carrier* (como ARNt de otra especie, p.ej. levadura) como diluyente. La eficiencia de amplificación de *BCR-ABL1* y el gen control debe ser similar para que la cuantificación sea válida a lo largo de un rango amplio de cantidades iniciales de gen *target*.

En conclusión, el material que se entrega para la armonización corresponde a 2 paneles de 5 calibradores secundarios (10 viales en total) necesarios para determinar el FC a la escala internacional, para cualquier metodología de PCR cuantitativa del *BCR-ABL1*. Cada ampolla contiene la mezcla de las dos líneas celulares liofilizada, en 5 proporciones diferentes, que reproducen 5 niveles de expresión diferentes del reordenamiento quimérico, en un rango de cocientes BCR-ABL1/gen control entre 10%-0.001%. Como se muestra en la Fig. 1, este material es utilizado para el programa de estandarización a la escala internacional en América Latina; gracias a esta iniciativa ya contamos con 18 laboratorios estandarizados mediante este proceso, provenientes de 7 países diferentes latinoamericanos (Argentina, Uruguay, Paraguay, Costa Rica, Panamá, Guatemala, Colombia). El programa sigue vigente para garantizar el seguimiento de los 18 laboratorios y abierto para que más laboratorios se sumen.

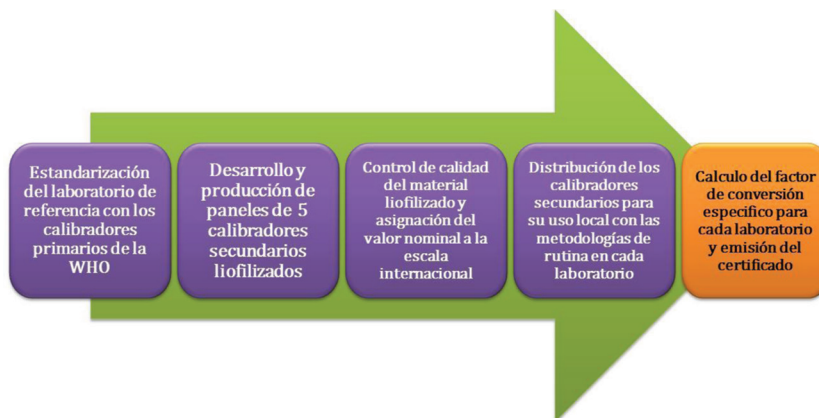


Fig. 1.– Esquema representativo del diseño general del programa de estandarización, desde la armonización del laboratorio de referencia mediante los calibradores primarios de OMS, hasta la obtención del FC específico para los laboratorios que participan del programa a través de los calibradores secundarios. WHO: OMS

### Recomendaciones generales para el proceso pre-analítico y analítico

La qRT-PCR es una metodología particularmente poderosa pero al mismo tiempo muy compleja; involucra muchos pasos y su éxito depende fundamentalmente de la cantidad y calidad del ARN total que se obtiene a partir de la muestra biológica. Una baja cantidad de ARN total reducirá la sensibilidad del ensayo, perjudicando la posibilidad de detectar una respuesta molecular profunda, mientras que una baja calidad afectará además la comparabilidad de los resultados con estudios anteriores, generando posiblemente toma de conductas terapéuticas sub-óptimas.

*Pre-analítico: obtención de muestras de sangre, procesamiento y extracción de ácidos nucleicos.*

El seguimiento molecular del paciente con LMC por qRT-PCR puede realizarse a partir de médula ósea (MO) o sangre periférica (SP), en ambos casos anticoaguladas con EDTA al 0.5%. Cualquiera haya sido la elección del tipo de muestra es mandatorio no modificarla y mantener el mismo tipo de muestra durante el seguimiento del paciente, garantizando así una mejor comparabilidad de los resultados en el tiempo. Dada la facilidad de acceso y obtención que la SP posee suele ser ésta la muestra preferida.

El volumen de SP necesario para un buen rendimiento dependerá del número de células hematopoyéticas nucleadas presentes en la misma y de la optimización del procedimiento de separación en cada laboratorio. Por eso es recomendable poder contar con un conteo celular previo; en caso de que este no sea posible se recomiendan por lo menos 10 ml de sangre para pacientes en tratamiento (> 10 ml para aquellos pacientes en respuesta molecular profunda).

La sangre puede almacenarse a 4 °C hasta el momento de procesarla (hasta 24 horas máximo). Es importante que los tubos contengan la cantidad de sangre indicada, ya que la cantidad de EDTA en los tubos está calculada para ese volumen. Si la concentración de EDTA es más alta de lo estándar, puede ocasionar inhibición en la reacción de PCR. Las muestras de SP son sometidas a un fraccionamiento celular. Existen dos procedimientos posibles:

- Utilización de un *buffer* de lisis de glóbulos rojos (RCLB).
- Utilización de un *buffer* amonio (solución de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  14.4 mM y  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  1 mM) en agua bidestilada.

En ambos casos el pellet celular obtenido se puede congelar a -20 °C por 3-4 días como máximo antes de ser procesado; nosotros recomendamos el uso del método con *buffer* de amonio, sin congelar la muestra.

La separación por centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque o Ficoll-Paque plus no es

recomendable para los casos de LMC porque afecta a la sensibilidad del ensayo y la posibilidad de poder detectar enfermedad mínima residual.

La extracción del ARN desde MO o SP debe hacerse por un método que asegure la calidad del ácido nucleico. Debe implementarse un procedimiento de aislamiento en un ambiente libre de nucleasas y, de ser posible, en un espacio destinado solamente para el procesamiento de la muestra. Las ARNasas se pueden introducir accidentalmente en cualquier punto del procedimiento a través de una técnica inadecuada. Dado que la actividad ARNasas es difícil de inhibir, es esencial prevenir su introducción. Las siguientes indicaciones se deben observar cuando se trabaja con ARN:

- Siempre use guantes desechables sin talco. La piel a menudo contiene bacterias y hongos que pueden contaminar una preparación de ARN y ser una fuente de ARNasas.
- Utilice recipientes estériles, material de plástico libre de ARNasas y pipetas automáticas reservadas para el trabajo con ARN para prevenir la contaminación cruzada.

Para la purificación del ARN, se somete el pellet celular a una extracción con tiocianato de guanidinio/fenol/cloroformo y una posterior precipitación con isopropanol. Este procedimiento puede ser realizado mediante TRIzol (ThermoFisher), que además posibilita posponer la extracción y guardar la muestra biológica lisada a -20 °C hasta una semana. Finalmente el ARN precipitado se lava con etanol 75% y se re-suspende en agua libre de ribonucleasas, para conservarse a -20 °C o a -80 °C según el tiempo requerido para uso posterior. La cantidad de ARN puede evaluarse espectrofotométricamente a 260 nm y su pureza a 280 y 230 nm. En este sentido, se recomienda una evaluación estricta de la calidad del material obtenido, cualquiera sea el método de extracción utilizado, mediante la relación de absorbancia a 260 nm vs. 280 nm, que estima la contaminación con proteínas, y la relación de absorbancia a 260 nm vs. 230 nm, que estima la contaminación con alcoholes (ej. fenoles) contaminantes durante la extracción.

Recomendamos evitar el uso de las membranas de sílice para la extracción de ácidos nucleicos debido a la baja capacidad de extracción cuando se utilizan volúmenes de muestras grandes y con muchas células. Sin embargo, estas membranas pueden resultar útiles cuando se hace necesario limpiar una muestra de ARN extraída con TRIzol y que resultó contaminada con algún inhibidor de la reacción de PCR (en general se pueden identificar estos casos cuando el gen control no muestra señal o es muy débil durante la reacción de PCR). Estas columnas permiten realizar un lavado y purificación del ARN en forma muy sencilla, rápida y efectiva.

Finalmente, la muestra de ARN puede ser conservada con el agregado de inhibidor de RNAsas para su mayor durabilidad en el tiempo, en particular para prevenir de-

gradación frente a eventuales descongelamientos que pueda sufrir la muestra almacenada.

*Analítico: copiado del ARN a ADNc y amplificación por PCR en tiempo real (real time).*

La aplicación clínica de una metodología de biología molecular requiere información sobre la sensibilidad y especificidad analítica, la precisión y reproducibilidad del ensayo, es decir caracterizar una serie de parámetros técnicos como parte del proceso de estandarización. Estos parámetros pueden ser definidos a través de los calibradores secundarios ya que, además de poder usarlos para estimar el FC, permiten caracterizar sensibilidad, precisión y reproducibilidad.

La sensibilidad analítica del método se refiere al número mínimo de copias que pueden ser medidas con precisión; esto difiere del concepto de sensibilidad clínica que representa el porcentaje de individuos con una determinada enfermedad que es detectado positivo para esa condición particular. La sensibilidad se expresa como límite de detección (LOD, del inglés *Limit of detection*), que es la concentración mínima que puede ser detectada con una precisión razonable (generalmente con probabilidad del 95%). EL LOD teóricamente alcanzable para una PCR es de 3 copias (teniendo en cuenta la distribución de Poisson).

Cuando hablamos de especificidad analítica nos referimos a la capacidad de detectar el *target* específico en lugar de otros inespecíficos; mientras que la especificidad diagnóstica es el porcentaje de individuos sin la enfermedad para los cuales el método nos da un resultado negativo.

La precisión del ensayo se refiere a la diferencia entre el valor experimentalmente obtenido y el valor real para una determinada muestra.

La repetitividad (también conocida como variabilidad intra-ensayo) se refiere a la precisión y estabilidad del ensayo en mediciones repetidas sobre la misma muestra en la misma corrida. Puede expresarse como desvío estándar (SD; cuando consideramos el  $C_t$  o el número de copias) o bien como coeficiente de variación (CV; cuando consideramos el número de copias pero no válido para el  $C_t$ ). La reproducibilidad (también conocida como variabilidad inter-ensayo) se refiere a la variabilidad en los resultados entre corridas o entre diferentes laboratorios y se expresa como SD o CV del número de copias (nunca como variación del  $C_t$ )<sup>9</sup>.

#### *Problema de la variabilidad*

El mismo proceso de armonización del *test* molecular a la escala internacional mediante los calibradores secundarios posibilita al laboratorio conocer los parámetros asociados a la variabilidad, tanto intra- como inter-laboratorio,

y sensibilidad o límite de detección del método. Estos parámetros deben ser conocidos por cada laboratorio por distintos motivos:

- distinguir el componente técnico de la variación en la respuesta molecular de los pacientes en respuesta al tratamiento
- evaluar la reproducibilidad del método y por lo tanto la validez de su FC a lo largo del tiempo
- detectar eventuales problemas que puedan surgir en el proceso completo de monitoreo

La metodología empleada para la cuantificación de transcritos por retro-transcripción y PCR en tiempo real posee una variabilidad intrínseca al método que, en condiciones óptimas, ronda el 30%, medida como coeficiente de variación. Esta variación corresponde a mediciones realizadas con la misma metodología, los mismos operadores, en el mismo laboratorio. Si adicionamos la variabilidad aportada por los distintos métodos de extracción de ARN, conservación de muestras, retro-transcripción, gen control utilizado, y cuantificación por qPCR, la misma puede ser mucho mayor; esto es evidenciado por el amplio rango de FC obtenido (entre 0.18 y 13.5) en un estudio de 36 laboratorios que realizaron la armonización de su método con el laboratorio de Adelaida<sup>6</sup>.

Para poder evaluar el CV de cada laboratorio, a partir del ARN extraído de los calibradores secundarios, se hace necesario realizar varias reacciones de retro-transcripción, las cuales serán evaluadas en distintas corridas, realizadas durante varios días. De este modo, puede estimarse la variación intra- e inter-corrida, que incluye a la variabilidad aportada por el método de extracción de ARN, retro-transcripción y qPCR. El protocolo detallado del proceso de calibración mediante calibradores secundarios es indicado por el laboratorio encargado de producirlos y distribuirlos, que estará encargado de analizar la calidad de los datos.

El CV es una medida de la dispersión de los datos que es independiente de la escala y unidad de la variable, lo cual permite comparar fácilmente dicha dispersión. El cálculo del CV intra- e inter- corrida se realiza mediante la siguiente fórmula:

$$CV = SD/M$$

SD = desvío estándar muestral

M = media muestral

Importante: esto es válido siempre y cuando el número de muestras sea grande ( $n \geq 30$ )

#### *Indicaciones generales para el ensayo*

A continuación, algunas recomendaciones generales a tener en cuenta en la práctica diaria del *test* analítico: 1) utilizar siempre la misma metodología validada, siguiendo siempre un mismo protocolo propio de cada laboratorio. 2) Utilizar siempre la misma cantidad de muestra (ARN o ADNc) para todos los pacientes, y también el mismo

volumen para la reacción de *BCR-ABL1* y del gen control. 3) Estandarizarse a la escala internacional (esto es imprescindible para poder comparar los resultados con otros laboratorios). 4) Controlar los parámetros de la cuantificación en cada corrida, teniendo en cuenta que las eficiencias de amplificación de *BCR-ABL1* y gen control deben ser lo más similares posibles. Gráficamente, esto implica que las curvas de cuantificación para cada transcripto deben ser paralelas y superpuestas. Matemáticamente esto significa que tienen el mismo valor de pendiente y ordenada al origen. Los valores de la pendiente y la ordenada al origen de cada uno deben mantenerse similares en las distintas corridas.

La utilización de la curva de calibración elegida requiere algunas consideraciones adicionales: la teoría indica que lo ideal es realizar una curva de calibración para el gen control y otra para *BCR-ABL1* en cada corrida. Sin embargo, los laboratorios de referencia han observado una variabilidad inter-corrida de las curvas que no es significativa si todos los parámetros del proceso se mantienen constantes. Por lo tanto, la frecuencia debe determinarse en cada laboratorio, en función del número de muestras que se procesan en simultáneo. Sin embargo, es absolutamente necesario realizar una curva de calibración nueva cada vez que algún factor del proceso se modifique. Es recomendable llevar un registro de los valores de  $C_t$  obtenidos para las curvas de calibración a lo largo del tiempo. Esto permite evaluar la calidad del material utilizado para la construcción de las curvas y para la cuantificación. Las curvas de calibración permiten evaluar la eficiencia de amplificación de los genes control y *BCR-ABL1*. Ésta debe ser similar para ambos genes, y mayor al 90%. Los datos de  $C_t$  son utilizados para realizar una regresión lineal, lo cual permite estimar el número de copias en la muestra incógnita por interpolación del valor de  $C_t$  obtenido. Esto implica que es estrictamente necesario que el valor de  $C_t$  de la muestra esté incluido en el rango de cuantificación de la curva de calibración, ya que la extrapolación puede llevar a graves errores en la estimación. Los valores de  $C_t$  para los puntos más diluidos de la curva suelen presentar mayor variación que los más concentrados, debido al mayor peso que tiene la fluctuación al azar en los primeros. Por lo tanto, es recomendable cuantificar como mínimo por duplicado los puntos más diluidos de la curva.

Los controles positivos de ARN (de baja y alta carga tumoral) son útiles para decidir si una corrida es aceptable o no (Fig. 2). Una manera sencilla de hacer esto es evaluar los SD de los calibradores (por ejemplo el calibrador cercano al 10% y aquel cercano al 0.1%); registrar el valor medio y los SD en un período de tiempo y determinar así la variación del método. Una vez establecido el intervalo, exigir que los valores que se van obteniendo de las muestras de pacientes estén dentro de ese intervalo (valor medio  $\pm$  2SD). Si una curva o una largada, no cumple los

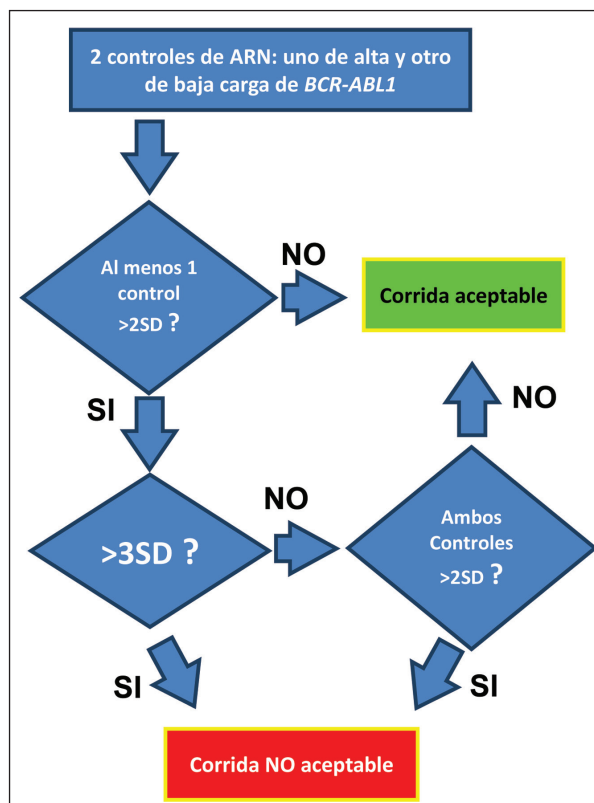


Fig. 2.- Algoritmo sugerido para la toma de decisiones con respecto a la corrida de qRT-PCR. Al tener en cuenta la variabilidad del método y el valor de los controles positivos de ARN (de alta y baja carga de transcripto quimérico) se puede decidir en forma objetiva cuando es necesario repetir una corrida por completo, debido a que hubo una diferencia significativa en los valores esperados, que podrían indicar algún error metodológico o cambio en las condiciones.

requisitos, es necesario repetirla para no incluir un factor mayor de variación. Recordar que los métodos moleculares tienen un CV elevado. Verificar el CF cada vez que se produzca un cambio en la metodología (instrumento, metodología, enzimas, volúmenes de reacción, etc.) o al menos una vez por año, según como lo indique el laboratorio de referencia.

Otro dato a tener en cuenta es que la escala internacional, y las respuestas moleculares, son válidas para las variantes más frecuentes de p210 (e13a2 y e14a2) pero existen casos de LMC que expresan variantes raras de *BCR-ABL1*. El monitoreo de estos casos requiere un tratamiento especial. Se recomienda generar un método de cuantificación, por ejemplo por clonación del producto de fusión en un plásmido para generar una curva estándar específica para esa variante (p.ej. e1a2; e19a2). Los resultados para el monitoreo se pueden expresar en función del nivel basal, como disminuciones logarítmicas. Es fundamental en estos casos aclarar que los endpoints moleculares establecidos con valor pronóstico no incluyen estas otras isoformas de la oncoproteína.

## Recomendaciones para la correcta interpretación de los resultados moleculares

La cuantificación se expresa como un cociente (%) entre el número de copias de *BCR-ABL1* y el número de copias de un gen de referencia, generalmente *ABL1*:

$$\left[ \frac{\text{N}^\circ \text{ copias BCR-ABL1}}{\text{N}^\circ \text{ copias gen control}} \right] \times 100 \times \text{FC} = \text{Cociente}(\%)^{\text{IS}}$$

IS = indica que el resultado está alineado a la escala internacional

El uso de un gen control apropiado permite hacer el ensayo más reproducible y comparable en el tiempo. Los tres genes control más estudiados y empleados son *BCR* (utilizado en el estudio IRIS), *ABL1* y *GUSB* (utilizados por el consorcio europeo). El uso de estos genes es recomendable dado que el nivel de expresión y estabilidad son muy similares al de *BCR-ABL1*. Es interesante observar que el resultado cuantitativo que se obtiene a través de la qRT-PCR es un valor relativo (no absoluto), que surge del cociente entre el número de copias estimado de *BCR-ABL1* y el número de copias estimado para el gen control (gracias a curvas estándar de diluciones plasmídicas). Sin embargo, este cociente, una vez transformado a la IS a través de la multiplicación por el FC, adquiere un significado absoluto, debido a que la escala internacional está anclada a dos valores específicos (el 100% y el 0.1%). Por este motivo también, los valores de qRT-PCR expresados en la IS, al tomar un significado absoluto se vuelven independientes del valor inicial de *BCR-ABL1* de cada paciente.

Cuando se cumplen las condiciones anteriores, se pueden calcular el número de copias de *BCR-ABL1* y de *ABL1* en cada muestra. Una muestra se considera evaluable cuando contiene al menos 10 000 copias de *ABL1* en cada muestreo (si se corre por duplicado). Esto

implica que muestras de ARN que no logran este número deben considerarse NO evaluables para la cuantificación y se debe solicitar una nueva muestra del paciente<sup>10</sup>.

De manera similar a la definición de RMMa, que se basa en el límite de 0.1%<sup>IS</sup> (3 Logs de reducción con respecto al valor basal del IRIS, RM<sup>3.0</sup>) definimos la RM<sup>4.0</sup> (0.01%<sup>IS</sup>, 4 Logs de reducción), RM<sup>4.5</sup> (0.0032%<sup>IS</sup>, 4.5 Logs de reducción) y RM<sup>5.0</sup> (0.001%<sup>IS</sup>, 5 Logs de reducción) (Tabla 1).

Teóricamente, el mínimo número de copias de *BCR-ABL1* cuantificable debería ser el punto más bajo de la curva. Sin embargo, nosotros recomendamos adoptar un criterio más objetivo en la definición de muestras positivas o negativas; el *cutoff* de positividad debería corresponder al valor del número de ciclos obtenido por la intercepta al origen (valor de "b" en la función matemática de la curva) +1C<sub>t</sub>. Por ejemplo:

¿Cuál sería el límite de positividad en una corrida con una "b" = 39.5?

$$C_{t(\text{cutoff})} = 39.5 + 1 = 40.5$$

Por lo tanto:

Muestras  $\geq 40.5 \Rightarrow$  Negativa (-)

Muestras  $< 40.5 \Rightarrow$  Positiva (+)

De acuerdo a ello se consideran indetectables aquellas muestras con valores de C<sub>t</sub>  $\geq (b + 1)$ .

También hay que tener en cuenta que los controles negativos no deberían en ningún momento mostrar señal por encima del *threshold* fijado; sin embargo podemos tolerar una positividad de estos controles hasta el límite dado por (b + 2);

¿Cuál sería el límite de tolerancia de los controles negativos en una corrida con una "b" = 39.5?

$$C_{t(\text{cutoff})} = 39.5 + 2 = 41.5$$

Por lo tanto:

Controles negativos  $\geq 41.5 \Rightarrow$  OK

Controles negativos  $< 41.5 \Rightarrow$  Warning (Repetir corrida)

Cuando se corren muestras por duplicado o triplicado y se obtienen valores positivos y otros negativos (definidos

TABLA1.– Valores de referencia de la escala internacional y definición de la respuesta molecular

% BCR-ABL1/ABL1	Reducción logarítmica	Resp. Molecular	Nº copias gen ABL*
$\leq 0.001\%$ o indetectable	$\geq 5.0$ log	RM 5.0	$\geq 100\ 000$
$\leq 0.0032\%$ o indetectable	$\geq 4.5$ log	RM 4.5	$\geq 32\ 000$
$\leq 0.01\%$ o indetectable	$\geq 4.0$ log	RM 4.0	$\geq 10\ 000$
$\leq 0.1 - 0.01\%$	$\geq 3.0$ log	RMMayor	
$\leq 1 - 0.1\%$	$\geq 2.0$ log	RMMenor	
$\leq 10 - 1\%$	$\geq 1.0$ log	RMMinima	
$> 10\%$	$< 1.0$ log	RMNula	

\*En el caso de resultados indetectables se debe tener en cuenta el número de copias del gen ABL para establecer el nivel de respuesta molecular (RM).



en base a los criterios de arriba); se recomienda siempre considerar la muestra como positiva.

Teniendo en cuenta el LOD teórico que mencionamos más arriba, cuando el valor de copias obtenido es un número menor a 3, se recomienda llevarlo a 3 copias y hacer los cálculos correspondientes con ese valor<sup>11</sup>.

Lo ideal sería tener un duplicado o triplicado de las muestras; sin embargo, a veces por cuestiones de presupuesto y de cantidad de muestras que se pueden incluir en cada corrida resulta conveniente evitar repetir el ensayo. Por lo tanto nosotros recomendamos realizar duplicados *ad hoc*, es decir repetir aquellas muestras que tienen un cociente muy cercano al *cutoff* de cada categoría de respuesta molecular (es decir que se encuentre dentro del intervalo de variabilidad del ensayo, para ese nivel de expresión) (Fig. 3). En estos casos se recomienda sumar las copias de BCR-ABL1 y las copias de ABL para calcular la relación, siempre y cuando ABL sea  $\geq 10\ 000$  en cada réplica. O sea:

$$\text{Cociente\%(IS)} = (\text{BCR-ABL}^1 + \text{BCR-ABL}^2) / (\text{ABL}^1 + \text{ABL}^2) \times 100 \times \text{FC}$$

Esto se realiza para obtener un dato más preciso y fehaciente del estado del paciente, sobre todo para aquellos casos con respuestas moleculares más profundas ( $\geq \text{RM}^{4.0}$ ).

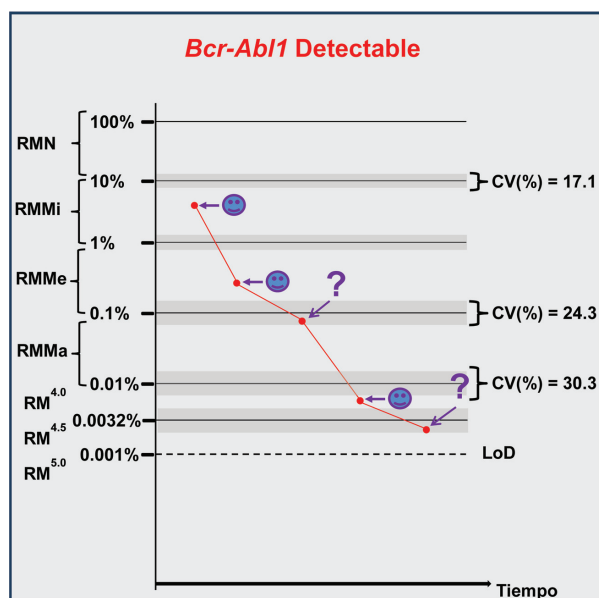


Fig. 3.— Gráfica representativa para repetir el test molecular en base al criterio *ad hoc*. Cuando el resultado cae en el área gris (intervalo que indica el coeficiente de variación específico por cada nivel de expresión del *BCR-ABL1*) es recomendable repetirlo y promediar el valor de los dos estudios, con el objeto de aumentar la precisión del resultado final. Los puntos marcados con (?) deberían ser repetidos, mientras que para aquellos con el *smile* no es necesario.

Dado que las respuestas moleculares se definen en base al N° de copias de ABL, aquellos laboratorios que utilicen otro gen de referencia, como *BCR* o *GUSB*, es recomendable que establezcan con sus propios métodos cuál es la relación entre ABL y el gen de referencia utilizado, para equiparar los números de copias. Por ejemplo, algunos laboratorios europeos definieron que *GUSB* equivale a 2.4x (n copias de *ABL1*). Para realizar esto es necesario analizar muestras en paralelo con *ABL1* y el gen de referencia a equiparar.

### Recomendaciones para estandarizar las respuestas moleculares indetectables

En la era de los ITKs de segunda generación y aparición de protocolos de discontinuación, es cada vez más importante no solamente tener una metodología alineada a la IS, sino también poder medir respuestas moleculares muy profundas, es decir, contar con metodologías de alta sensibilidad. Debido a la potencia de los ITKs, durante el tratamiento la masa tumoral puede bajar a niveles que son indetectables aun para la qRT-PCR; tampoco en este caso podemos asumir que el clon leucémico haya desaparecido ya que se estima que pueden permanecer hasta  $10^6$  células leucémicas; la negatividad en estos casos se debe a que la dilución de células tumorales está por debajo del límite de sensibilidad del método. La definición de la respuesta molecular necesita tener en cuenta que la sensibilidad del ensayo es variable de centro a centro, y también de muestra a muestra. Por esta razón el término respuesta molecular completa (RMC), muy utilizado en un principio, hoy ha sido reemplazado por respuesta molecular (RM) de acuerdo al nivel de sensibilidad que se pudo alcanzar en cada muestra; este parámetro obviamente está directamente relacionado con la calidad y cantidad de ARN y es cuantificable a partir de la estimación del número de copias del gen control. La RM por lo tanto se expresa de acuerdo al número de copias que se pudieron medir del gen control en cada muestra, pudiendo en algunos casos sumar estas copias provenientes de múltiples mediciones de la misma muestra. Es así que podemos uniformar la definición de respuestas moleculares indetectables teniendo en cuenta el número de copias del gen control, que es el que marca la sensibilidad con la cual podemos descartar la presencia de *BCR-ABL1*;  $\text{RM}^{4.0}$  cuando *ABL1* > 10 000 copias,  $\text{RM}^{4.5}$  con *ABL1* > 32 000 copias, y  $\text{RM}^{5.0}$  con *ABL1* > 100 000 copias (Tabla 1). Esto obviamente depende también de la capacidad de cada laboratorio de medir en forma comparable los valores absolutos del número de copias del gen control.

**Agradecimientos:** Agradecemos al laboratorio Novartis Argentina SA por el apoyo brindado en la realización del programa de estandarización a la escala internacional mediante los calibradores secundarios.

**Conflicto de intereses:** Ninguno para declarar

## Bibliografía

- Baccarani M, Cortes J, Pane F, et al. European Leukemia Net. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European Leukemia Net. *J Clin Oncol* 2009; 27: 6041-51.
- O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, et al. IRIS Investigators. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2003; 348: 994-1004.
- Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, et al. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2006; 355: 2408-17.
- Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, et al. European Leukemia Net recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood* 2013; 122: 872-84.
- Branford S, Cross NC, Hochhaus A, et al. Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukaemia. *Leukemia* 2006; 20: 1925-30.
- Branford S, Fletcher L, Cross NC, et al. Desirable performance characteristics for BCR-ABL measurement on an international reporting scale to allow consistent interpretation of individual patient response and comparison of response rates between clinical trials. *Blood* 2008; 112: 3330-8.
- White HE, Matejtschuk P, Rigsby P, et al. Establishment of the first World Health Organization International Genetic Reference Panel for quantitation of BCR-ABL mRNA. *Blood* 2010; 116: e1111-7.
- Bustin SA, Dhillon HS, Kirvell S, et al. Variability of the reverse transcription step: practical implications. *Clin Chem* 2015; 61: 202-12.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009; 55: 611-22.
- Cross NC, White HE, Müller MC, et al. Standardized definitions of molecular response in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2012; 26: 2172-5.
- Cross NC, White HE, Colomer D, et al. Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2015; 29: 999-1003.
- White H, Deprez L, Corbisier P, et al. A certified plasmid reference material for the standardisation of BCR-ABL1 mRNA quantification by real-time quantitative PCR. *Leukemia* 2015; 29: 369-76.

## APÉNDICE

### Plásmido de referencia

El sistema utilizado para estimar el número absoluto de copias varía entre los distintos laboratorios. Mientras que la mayoría utiliza curvas de plásmidos comerciales, cuya cantidad de copias por unidad de volumen está certificada, es posible también utilizar curvas de plásmidos producidos *in-house*. Aunque la variabilidad aportada por la curva de calibración dentro de un mismo laboratorio resulta parcialmente absorbida por la armonización del proceso a la escala internacional, este factor puede contribuir a la variabilidad inter-laboratorio, y es necesario realizar algunas consideraciones con respecto a su utilización.

La construcción de una curva de calibración implica contar con muestras cuyo número de copias del gen a medir sea conocido. Si se trata de plásmidos comerciales, éstos ya son provistos como tubos diferentes que contienen cantidades conocidas de plásmidos en un rango determinado. Actualmente los plásmidos comerciales que existen en el mercado ofrecen distintos rangos de cuantificación, con lo cual es necesario seleccionar adecuadamente el producto a adquirir para que incluya el rango de cuantificación de las muestras normalmente medidas en el laboratorio. En el caso de plásmidos *in-house*, la estrategia consiste en obtener una solución de plásmidos linealizados, muy concentrada, que pueda ser cuantificada con alta precisión, la cual es utilizada para realizar diluciones seriadas que abarquen el rango necesario para la cuantificación de las muestras. Es necesario tener en cuenta que la realización de diluciones seriadas es un factor que puede introducir variabilidad al proceso, especialmente en las diluciones mayores. Para minimizar la degradación del ADN, una posibilidad es el agregado de ADN o ARN exógeno, tal que no aporte secuencias del gen de interés (por ej. ARNt, disponible comercialmente), pero sí masa de ácido nucleico, contribuyendo a la estabilidad y manejo del mismo. Con respecto a la cuantificación del *stock* inicial, es recomendable la utilización de PCR digital para obtener un valor preciso. De lo contrario, es posible cuantificar el plásmido mediante la combinación de medición de la absorbancia (por ej. con Nanodrop) con un análisis de la calidad del plásmido (por ej. con gel de agarosa o *BioAnalyzer*). Finalmente, es recomendable la esterilización por filtrado de dicha solución, para minimizar la degradación del ARN, la cual puede llevar a un error en la estimación del número de copias.

En la actualidad se encuentran disponibles plásmidos de referencia que han sido elaborados con el objetivo de minimizar la variabilidad inter-laboratorio en la cuantificación del número absoluto de copias de *BCR-ABL1* y gen control<sup>12</sup>. Este plásmido incluye, en la misma molécula, las secuencias correspondientes a los transcritos de *BCR-ABL1* (variante e14a2), y de los tres genes control: *ABL1* (incluido en la secuencia de *BCR-ABL1*), *GUSB* y *BCR*.

Por lo tanto, puede ser utilizado por laboratorios que emplean distintos genes control. Su distribución está mediada por el *Institute for Reference Materials and Measurements* de Bélgica, y por distribuidores autorizados de la Unión Europea. Este material incluye 6 diluciones plasmídicas, cuantificadas por PCR digital y evaluadas por qPCR, que abarcan un rango de  $1 \times 10^6$  a 10 copias por  $\mu\text{l}$ .

*Informe de resultados*

El informe de los resultados tiene que incluir toda la información relevante para una correcta interpretación clínica del valor numérico informado; sin embargo tiene que ser conciso para no generar confusión entre los médicos y/o pacientes. Además, los informes provenientes de diferentes centros deberían coincidir en cuanto al formato y al tipo y cantidad de información reportada para que sea más fácil su interpretación en el tiempo, cuando los pacientes cambian el lugar donde realizan el monitoreo (Fig. 4). Por lo tanto un buen informe tiene que ser:

1. Fácil de leer y conciso
2. Comparable entre diferentes centros
3. Contener información suficiente para entender la condición del paciente

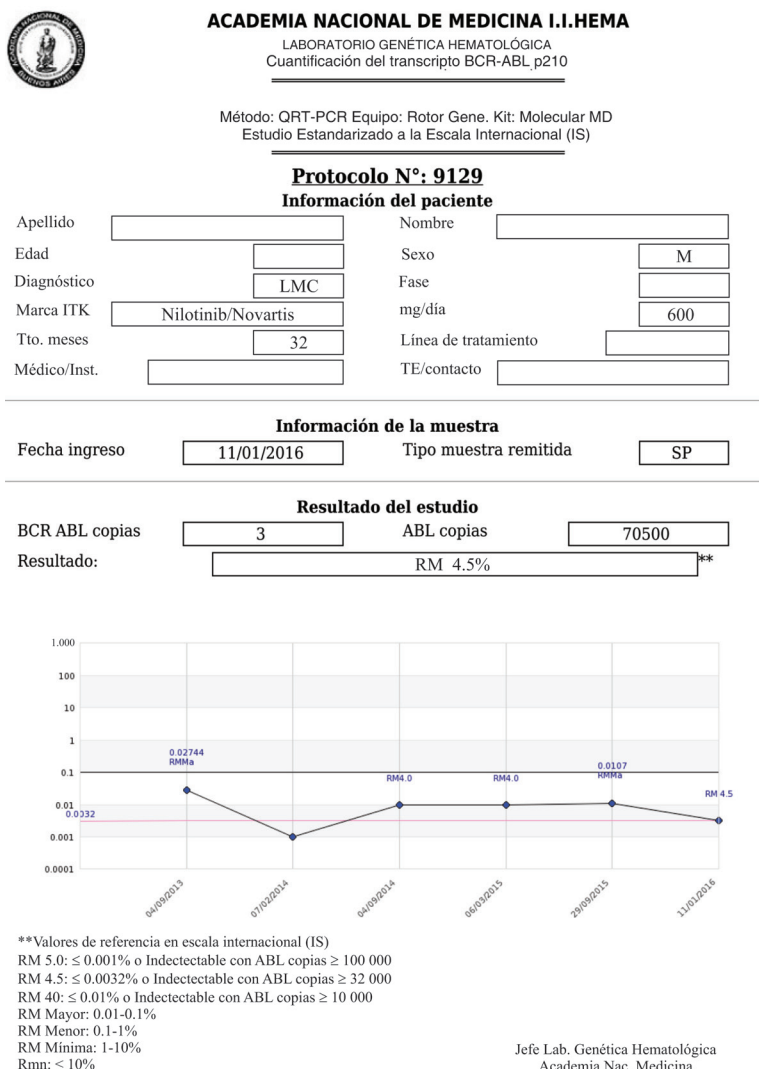


Fig. 4.– Ejemplo de informe con todos los datos que deben incluirse en el mismo. El resultado del estudio corresponde al último punto de la curva reportada en el gráfico.

*Informe de resultados: Listado de información importante*

- Nombre y apellido del paciente
- Código único interno del paciente (p.ej. DNI)
- Código único interno de la muestra
- Edad o fecha de nacimiento del paciente
- Sexo
- Tipo de muestra (SP o MO)
- Fecha de ingreso
- Inhibidor y dosis
- Estandarización a la escala internacional
- Resultados PCR cuantitativa:
  - o *Número de copias de BCR-ABL1*
  - o *Número de copias de ABL*
  - o *Cociente BCR-ABL1/Gen control (de acuerdo a la IS)*
  - o *Nivel de respuesta molecular alcanzada de acuerdo a la escala internacional*
- Gráfica del historial de los estudios anteriores del paciente (*Follow-up*)
- Firma y aclaración del responsable

*Listado de información opcional*

- Plataforma empleada y tipo de química
- Fecha de extracción de la muestra
- Fecha del informe
- Fecha de diagnóstico inicial
- Información del médico solicitante
- Tipo de transcripto BCR-ABL1 (PCR cualitativa)
- Límite de detección del método
- Estudios de mutaciones en *ABL1* (tipo de mutación, método de detección, cuantificación de la mutación)
- Comentarios (recomendación próximo estudio, eventual repetición, aumentos bruscos en los valores etc.)
- Tabla recordatoria de los valores de referencia a la escala internacional
- Tabla recordatoria de la respuesta