

Dolors Colomer^{1,2}; Sandra Cabezas^{1,2}; Sandra Martinez¹; Mònica López-Guerra^{1,2}; Jeff Robson³;

¹Unitat Hematopatologia, Hospital Clinic, Barcelona; ²Institut d' Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS) Barcelona; ³Cepheid Europe, Toulouse, Francia.

INTRODUCCIÓN

El correcto manejo de los pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC) tratados con inhibidores de tirosina cinasa (ITK) requiere de la monitorización de los pacientes. El método estándar es la cuantificación del gen *BCR-ABL1* mediante PCR cuantitativa a tiempo real. Para que hubiera una buena reproducibilidad interlaboratorios surgió la necesidad de expresar los resultados en una escala internacional (IS). **Xpert® BCR-ABL ULTRA** (Cepheid, SunnyVale, USA) es un sistema automático de cuantificación del gen *BCR-ABL1*; que integra la extracción del RNA, la amplificación y la cuantificación del gen *BCR-ABL1* utilizando el gen *ABL* como gen control. El software del GeneXpert produce un informe para cada muestra analizada con resultado % *BCR-ABL1* (IS) y las copias absolutas del gen *ABL1* se pueden calcular manualmente según el valor Ct del mismo gen.

MÉTODOS

Se ha realizado la cuantificación del gen BCR-ABL en 60 muestras (cubriendo desde muestras al diagnóstico hasta muestras en RM mayor de grado 4.5) mediante el ensayo Xpert BCR-ABL Ultra y el ensayo de referencia de rutina recomendado por el European Leukemia Net, a partir de 4 ml de sangre para el protocolo del GeneXpert y 10 mL para el ensayo de referencia. El protocolo específico de Xpert BCR-ABL Ultra se presenta en la **figura 1**.

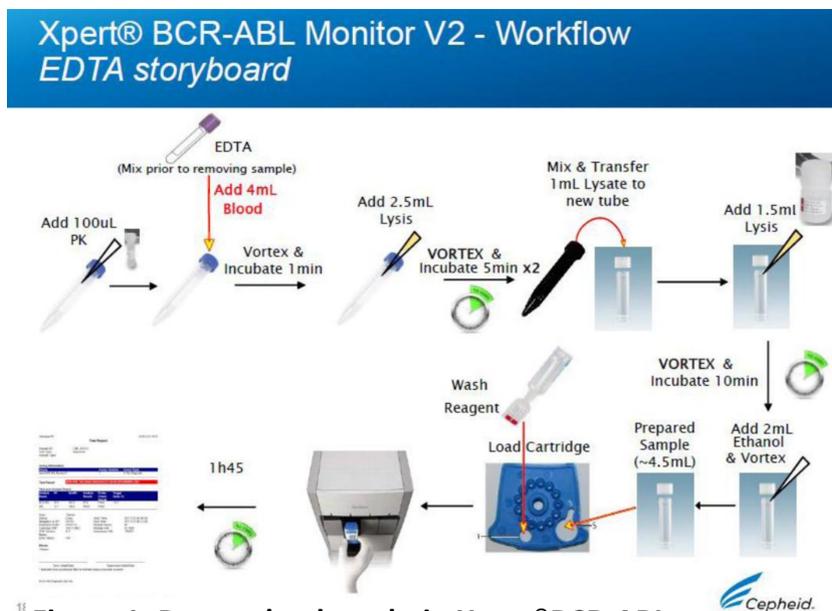


Figura 1. Protocolo de trabajo Xpert® BCR-ABL

Se ha analizado la concordancia entre los resultados obtenidos utilizando los criterios definidos por EUTOS, basados en que para que sea aceptable se deben cumplir 2 de los 3 requisitos siguientes: $\geq 50\%$ de muestras con una diferencia menor del 2x, $\geq 75\%$ de muestras con diferencia menor del 3x, $\geq 90\%$ de muestras con una diferencia menor del 5x.

Además se ha evaluado la linealidad, la concordancia y el sesgo utilizando el método de Bland-Altman

CONCLUSIONES

El nuevo sistema automatizado Xpert BCR-ABL Ultra da resultados muy reproducibles similares a los métodos manuales de referencia y es apto para la monitorización de pacientes de LMC tratados con ITK, llegando a detectar respuestas moleculares profundas (> RM grado 4,5). Además de expresar los resultados en IS, facilita el método para calcular el nº de copias *ABL1* a partir de los valores de las Ct y permite expresar los resultados de acuerdo con las recomendaciones de monitorización del gen *BCR-ABL1* en la LMC (*Leukemia*. 2015;29:999-1003).

RESULTADOS

Se han analizado 60 muestras de las cuales 54 presentan valores de *BCR-ABL1*^{IS} comprendidos entre el 75% y el 0.0032%. En la **figura 2** se muestran las Ct de las muestras y las correlaciones con el nº de copias

CASE	Xpert			biomid			CASE	Xpert			biomid		
	ABL CT	ABL COPIES		ABL CT	ABL COPIES								
1	12.2	23.126	22.937			116711.61	31	10.9	22.670	22.713	22.676	169666.26	
2	10.7	24.131	23.829			61554.58	32	12	22.612	22.691	23.248	154568.76	
3	11.4	22.742	22.990			190851.62	33	11.5	22.362	22.285		144729.21	
4	11.8	24.640	24.443			41933.836	34	12.1	22.543	22.559	22.461	189743.89	
5	11.3	23.855	23.848			66819.107	35	10.9	23.603	23.330	23.233	106292.06	
6	11.1	24.687	24.996			34328.781	36	11.7	23.864	23.837		51716.628	
7	12.5	22.844	22.890			190282.35	37	11.8	22.207	22.102		162251.94	
8	11.1	23.631	23.562			79448.717	38	11.4	23.380	23.350		71484.508	
9	12.3	23.889	23.629			75448.204	39	12.2	23.902	23.792		51875.944	
10	11.7	22.208	22.286			247163.07	40	10.9	23.610	23.521		62712.798	
11	11.8	23.644	23.821			76638.378	41	11.5	23.536	23.556		63496.503	
12	11.1	22.025	22.374			305596.9	42	12.2	24.240	24.262		39497.649	
13	11.7	23.150	23.034			167907.52	43	12.1	22.241	22.321		199876.35	
14	11.3	22.208	22.286			247163.07	44	10.5	22.891	22.842		91371.535	
15	11.8	23.263	23.337			23.344	178496.99	45	12.5	23.573	23.499	23.971	80887.145
16	11.3	22.260	22.490			22.67	319511.73	46	12.1	22.506	22.832		139637.4
17	11.8	23.418	23.281			23.372	173481.89	47	11.2	23.558	23.184		87145.016
18	11.4	22.927	22.840			159924.1	48	12.1	22.836	22.769	23.235	174082.01	
19	11.1	23.607	23.485			101669.22	49	11.4	23.098	23.336		96231.866	
20	11.2	23.822	23.933			23.766	129117.22	50	11.4	22.830	22.999	22.744	141514.86
21	10.9	23.470	23.350			23.289	177336.33	51	12.2	24.134	23.925	23.797	68130.822
22	10.6	23.963	23.616			103487.75	52	11.3	22.924	22.914		176116.41	
23	10.9	23.801	23.866			83454.8	53	12.1	23.464	23.561		118465.94	
24	12.5	23.986	24.130			24.191	108339.04	54	12.4	22.872	23.143		166706.3
25	11.1	22.158	22.182			260402	55	12.3	24.881	25.978		35042.196	
26	11.6	23.044	23.070			141962.58	56	11.5	23.346	24.843		41635.357	
27	10.6	24.007	23.852			24.012	119409.82	57	11.9	23.671	23.534	23.923	106351.01
28	11.6	22.892	22.901			22.786	151051.82	58	11.2	23.253	23.556	23.395	98438.742
29	11.4	23.426	23.318			114502.35	59	12	24.490	24.259		45312.203	
30	11.9	23.093	23.111			22.965	192379.58	60	11.6	23.799	23.638		70133.76

IRMM Copy Number	Positive & Test N.	Ave. Ct BCR-ABL	ABL
1065600	12/12	10.40	10.12
106560	12/12	13.98	13.02
10163	12/12	17.29	16.20
1006	12/12	20.38	19.38
103	12/12	23.74	22.67
10	22/22	27.46	26.44
5	24/24	28.22	27.36
3	18/24	28.91	27.95
1	11/24	29.83	28.76

Figura 2. Ct ABL1 y nº copias ABL1

De las 54 muestras analizadas, el 52% (28 muestras) presentan variaciones entre 0,5 y 2x; el 85% de los casos (46 muestras) están comprendidas entre el 0,33 y el 3x de variación y 50 muestras (93% de los casos) están comprendidos entre el 0,2 y el 5x de variación (**figura 3**).

DIFERENCIAS	MUESTRAS	PORCENTAJE	
2-FOLD	28	52%	> 50%
3-FOLD	46	85%	> 75%
5-FOLD	50	93%	> 90%
TOTAL	54		

Figura 3. variaciones entre ambos métodos

Se observa una muy buena correlación lineal entre ambos métodos ($R^2 = 0.924$) (**figura 4**).

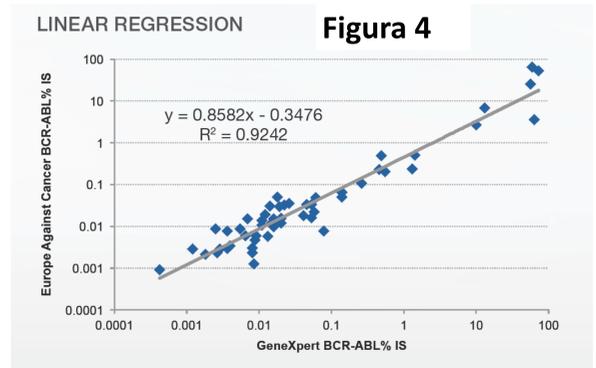


Figura 4

El análisis estadístico mediante Bland-Altman revela un ligero sesgo positivo de 0.13, que favorece el sistema Xpert BCR-ABL Ultra (**figura 5**).

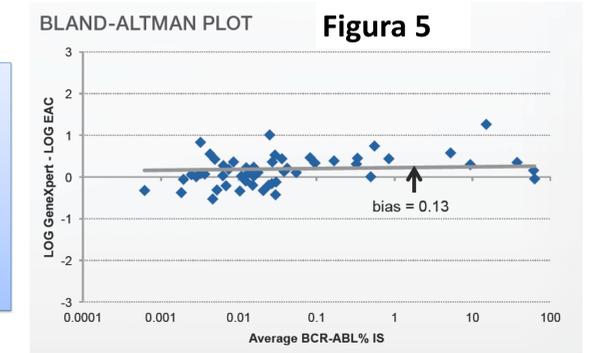


Figura 5

AGRADECIMIENTOS

