

ESTUDIO DEL REORDENAMIENTO BCR-ABL MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL: CUANTIFICACIÓN ABSOLUTA FRENTE A RELATIVA, RESULTADOS DEL GRUPO ESPAÑOL DE BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA AEHH

A. Jiménez Velasco, M. Albajar, P. Algara, M. Balbín, F. Barros, P. Bolufer, I. Buño, D. Colomer, F. Cuevillas, N. Erill, R. García Lozano, J.A. García Marco, A. García Orad, MT. Gómez, M. González, A. Gutiérrez, L. Hermosín, M.J. Larráyo, N. Llecha, J.M. Minguela, C. Montoriol, J. Román Gómez, B. Sánchez Vega, L. Zamora y J. Martínez.

Grupo de Biología Molecular de la Asociación Española de Hematología y Hemoterapia.

Introducción: La monitorización del nivel de expresión del reordenamiento *BCR-ABL*, mediante PCR cuantitativa en tiempo real (PCRctr), es básica durante el tratamiento de la Leucemia Mieloide Crónica (LMC). El estudio IRIS establece la Respuesta Molecular Mayor en un nivel de *BCR-ABL* inferior al 0.1%, así los pacientes que alcanzan esta respuesta, tras 12 meses de tratamiento con Imatinib, van a presentar menor probabilidad de progresión que los que no la logran. Dependiendo del método empleado en la cuantificación de *BCR-ABL*, este valor o ratio del 0.1% puede variar entre laboratorios, condicionando decisiones terapéuticas erróneas. El objetivo de nuestro estudio ha sido comparar el método de cuantificación absoluta frente al de cuantificación relativa del gen de fusión *BCR-ABL*, en laboratorios pertenecientes al grupo Español de Biología Molecular de la AEHH (GEBM).

Material y métodos: Diluciones celulares de la línea de LMC K562 en células de sujetos sanos en una proporción del 0.1%, 1% y 10%, fueron preparadas en el laboratorio de T. Hughes (Adelaida, Australia) y posteriormente congeladas en Trizol. Un laboratorio de referencia del GEBM preparó ADNc de estas diluciones y lo envió a otros 5 laboratorios para su cuantificación mediante PCRctr. Un total de 4 diluciones al 0.1%, 5 diluciones al 1% y 5 diluciones al 10% fueron analizadas por duplicado en 6 laboratorios. En todos se utilizaron los cebadores y sondas TaqMan diseñadas en el proyecto Europeo BIOMED. Para la cuantificación absoluta, cada laboratorio creó curvas estándar de *BCR-ABL* y *ABL* (gen control) utilizando plásmidos comerciales (Ipsogen), y los niveles de *BCR-ABL* se expresaron como una ratio entre el nº de copias de *BCR-ABL* y el nº de copias de *ABL*. Para la cuantificación relativa empleamos el método doble delta CT (2D CT), utilizando como calibrador de la reacción (valor 100%) el punto del plásmido de 20.000 copias/µl de *BCR-ABL* y *ABL*, y asumiendo una eficiencia de 2 para ambos genes.

Resultados: La media, rango y desviaciones estándar de los resultados obtenidos en los 6 laboratorios son descritos en la siguiente tabla:

	Media	Rango	Desviación estándar
0.1% Absoluta	0.19%	0.03%-0.52%	± 0.09
0.1% Relativa	0.12%	0.02%-0.45%	± 0.08
1% Absoluta	1.50%	0.45%-3.20%	± 0.68
1% Relativa	1.10%	0.38%-2.94%	± 0.69
10% Absoluta	14.98%	5.80%-36.78%	± 7.00
10% Relativa	12.62%	2.66%-36.61%	± 8.03

Conclusiones: Cuando empleamos el método de cuantificación relativa (2D CT), los niveles de *BCR-ABL* son más cercanos al valor real de la dilución celular estudiada que cuando cuantificamos de forma absoluta. Ambos métodos presentan unas desviaciones estándar similares. Debido a su mayor simplicidad y a la exactitud de sus resultados, pensamos que la cuantificación relativa frente a la absoluta debería ser el método de elección para normalizar los valores de *BCR-ABL* a nivel nacional.

Este trabajo ha sido financiado mediante una ayuda de NOVARTIS.