

Leucemia mínima residual: nuevo concepto de remisión completa

P. Bastida Vilá^a, C. Palacio García^b, M. Solsona Riera^b,
J.J. Ortega Aramburu^a y J. Sánchez de Toledo Codina

^aServicio de Oncohematología Infantil. Hospital Universitario Materno-Infantil Vall d'Hebron.

^bServicio de Hematología. Hospital Universitario Vall d'Hebron. Barcelona. España.

Introducción

La respuesta precoz al tratamiento de inducción es uno de los factores pronósticos más importantes en niños afectados de leucemia linfoblástica aguda (LLA). Actualmente se consigue la remisión citológica en el 95-98% de estos pacientes; sin embargo, un porcentaje importante recaerá posteriormente. Es preciso utilizar técnicas más sensibles para medir la leucemia residual y establecer un nuevo concepto de remisión completa.

Objetivo

Identificar por técnicas inmunológicas la enfermedad mínima residual (EMR) y conocer su impacto pronóstico en niños afectados de LLA.

Métodos

Estudiamos la EMR por citometría de flujo en 53 niños diagnosticados en nuestro servicio desde junio de 1999 hasta abril de 2003 y tratados según protocolos del grupo Pethema. Todos habían conseguido la remisión citológica (< 5%) con el tratamiento de inducción y tenían al menos un fenotipo útil para seguimiento. El 11% eran de fenotipo T, 1 bifenotípica y el resto eran leucemias tipo B. Se analizaron muestras de médula ósea postinducción, posconsolidación, a 6 y 11 meses de mantenimiento, al final del tratamiento y 3 meses después. Se colocó el umbral de positividad en 0,01%, siendo la sensibilidad de la técnica de 1×10^{-4} - 1×10^{-5} .

Resultados

Se analizaron un total de 199 muestras. El 37% de las muestras analizadas postinducción y el 20% posconsolidación eran EMR+. La eliminación fue más lenta en los pacientes de fenotipo T y en los de alto riesgo según la clasificación tradicional. Con una mediana de seguimiento de 26 meses, la supervivencia libre de enfermedad (SLE) del grupo completo fue del 92%. Los pacientes con una EMR+ postinducción tuvieron una tasa de SLE del 79%. Ningún paciente con EMR-postinducción ha presentado recidiva.

Conclusión

El estudio de la EMR es imprescindible y debe estar incluida en todos los protocolos de tratamiento actuales para niños con LLA. Su utilidad radica en el impacto pronóstico de la respuesta al tratamiento de inducción. La monitorización secuencial posterior puede predecir recaídas antes de que aparezcan manifestaciones clínicas o hematológicas.

Palabras clave:

Leucemia linfoblástica aguda. Enfermedad mínima residual. Citometría de flujo. Remisión completa.

MINIMAL RESIDUAL DISEASE IN ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA: A NEW CONCEPT OF COMPLETE REMISSION

Introduction

Early response to induction treatment is one of the most important prognostic factors in children with acute lymphoblastic leukemia (ALL). Cytological remission is currently achieved in 95-98% of these patients, although a significant proportion will later relapse. More sensitive techniques are required to measure residual leukemia and establish a new definition of complete remission.

Objective

To identify minimal residual disease (MRD) by immunological techniques and define its prognostic impact in children with ALL.

Methods

MRD was studied by flow cytometry in 53 children diagnosed in our department between June 1999 and April 2003 and treated using the Pethema protocols. All the children achieved complete cytological remission (< 5%) with the induction treatment and had at least one useful phenotype for follow-up: 11% were T phenotype, one was biphenotypic and the remainder were B cell leukemias. Bone marrow samples were analyzed post-induction,

Correspondencia: Dra. P. Bastida Vilá.

Servicio de Hematología. Hospital Universitario Materno-Infantil Vall d'Hebron.
Pº Vall d'Hebron, 119-129. 08035 Barcelona. España.
Correo electrónico: pbastida@vhebron.net

Recibido en marzo de 2005.

Aceptado para su publicación en marzo de 2005.

post-consolidación, after 6 and 11 months of maintenance treatment, at the end of treatment, and 3 months later. The positivity threshold was set at 0.01% and the sensitivity of the technique was 1×10^{-4} - 1×10^{-5} .

Results

A total of 199 samples were analyzed. Thirty-seven percent of the post-induction and 20% of the post-consolidation samples analyzed were MRD-positive. Elimination was slower in patients with a T phenotype and in high-risk patients according to the traditional classification. After a median follow-up of 26 months, event free survival (EFS) in the group as a whole was 92%. The EFS rate in the patients who were MRD-positive post-induction was 79%. None of the patients who were MRD-negative post-induction has developed recurrence.

Conclusion

Study of MRD is essential and should be included in all current treatment protocols for children with ALL. Its usefulness derives from the prognostic impact of the response to induction treatment. Continued sequential monitoring may predict recurrence before the onset of clinical or hematologic manifestations.

Key words:

Acute lymphoblastic leukemia. Minimal residual disease. Flow cytometry. Complete remission.

INTRODUCCIÓN

Las tasas de curación en niños afectados de leucemia linfoblástica aguda (LLA) han aumentado en los últimos años hasta el 80%, aproximadamente. Ha sido posible gracias a la mejoría en el diagnóstico, a la identificación de factores pronósticos y a la utilización de tratamientos adaptados al grupo de riesgo de cada paciente. Todos los protocolos de tratamiento constan de inducción a la remisión, consolidación, profilaxis sobre el sistema nervioso central (SNC) y mantenimiento¹⁻⁵. La respuesta al tratamiento de inducción es uno de los factores pronósticos más importantes. Actualmente se consigue la remisión citológica en más del 95% de los niños afectados de LLA. Se considera como tal la presencia de menos del 5% de células blásticas en médula ósea después del tratamiento de inducción. Un porcentaje aún importante de estos niños recaerá posteriormente. Esto quiere decir que algunas células leucémicas han sido resistentes al tratamiento administrado, persisten en pequeñas cantidades en la médula ósea y no son identificables a microscopía óptica. A estas células se las llama enfermedad mínima residual (EMR) o leucemia mínima residual. Hay varios métodos para reconocerlas en función de las anomalías moleculares, cromosómicas, reordenamientos genéticos o características inmunológicas. Las translocaciones cromosómicas se identifican habitualmente sólo en una pequeña proporción de pacientes; por lo tanto, son poco útiles para estudio de EMR. El estudio de reordenamientos de los genes que codifican la síntesis de

inmunoglobulinas o los receptores de las células T por técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha sido muy utilizada, tiene una elevada sensibilidad, detectando una célula entre 10^4 - 10^5 , pero es demasiado laboriosa. La citometría de flujo ofrece una detección de la leucemia mínima residual fácilmente aplicable a la práctica clínica por su rapidez y fácil metodología. Se basa en estudios multiparamétricos con el uso de tres o cuatro fluorocromos a la vez que permiten la detección en el momento del diagnóstico de diferentes "inmunofenotipos leucémicos" (IL); esto es, infidelidades de línea, asincronismos madurativos, marcadores ectópicos o fenotipos infrecuentes en la población linfocitaria normal. Con esta aproximación se pueden detectar marcadores "diana" de EMR en el 90% de los enfermos.

La detección precoz de la EMR identifica a los pacientes en riesgo de recaída que pueden beneficiarse de una intensificación precoz del tratamiento y, por otro lado, puede evitar efectos secundarios en niños de bajo riesgo que no necesitan tratamientos tan agresivos.

El objetivo de nuestro estudio es identificar la EMR por citometría de flujo en nuestros pacientes afectados de LLA, establecer un nuevo concepto de remisión completa y conocer su significado pronóstico.

PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS

Se incluyeron en el estudio 53 pacientes diagnosticados y tratados en nuestro servicio desde junio de 1999 hasta abril de 2003. El grupo estaba constituido por 28 varones y 25 niñas con una edad que oscilaba entre 1 y 15 años (media: 7 años). El diagnóstico se estableció por microscopía óptica en función de las características morfológicas de las muestras de médula ósea según la clasificación FAB. Todos eran diagnósticos iniciales salvo tres, que habían presentado recidiva medular y se hallaban en segunda remisión al tiempo de su inclusión en el estudio. Estos últimos fueron excluidos del análisis estadístico. La clasificación inmunológica siguió los criterios ya establecidos por el grupo EGIL⁶. Seis pacientes presentaban leucemias de fenotipo T, uno bifenotípica y el resto, 46, eran LLA de precursores B. El estudio citogenético se pudo realizar en 26 pacientes (49%). Quince presentaban alteraciones citogenéticas de buen pronóstico (hiperdiploidías, t[12;21] o reordenamientos *ETV6/RUNX1*) y cuatro de mal pronóstico (alteraciones 11q23, reordenamientos MLL, translocaciones [4;11], [9;22] o reordenamiento *BCR/ABL*)⁷. Según las características clinicobiológicas iniciales (edad, número de leucocitos, fenotipo inmunológico, alteraciones citogenéticas, infiltración extramedular y respuesta al tratamiento), se consideró que 17 (34%) niños estaban en bajo riesgo de recaída, 25 (50%) en riesgo intermedio y 8 (16%) presentaban alto riesgo⁸. Todos los pacientes estaban en remisión citológica (< 5% células blásticas en médula ósea) al tiempo de su inclusión en el estudio y tenían al menos un fenotipo útil para seguimiento. Recibie-

ron tratamiento según protocolos del grupo Pethema adaptados al grupo de riesgo. El protocolo para niños de alto riesgo contemplaba la posibilidad de trasplante de precursores hematopoyéticos (TPH) en primera remisión después de quimioterapia intensiva. Los pacientes en segunda remisión recibieron tratamientos intensivos y fueron sometidos a TPH, así como otro paciente afectado de LLA bifenotípica. Los resultados del estudio de EMR no debían modificar el protocolo terapéutico.

Se diseñó el estudio con 6 puntos de análisis y se fijó como umbral de positividad 0,01% o, lo que es lo mismo, el hallazgo de 1 célula entre 10000. Los puntos de estudio fueron postinducción (EMR1), posconsolidación (EMR2), a 6 y 12 meses de mantenimiento (EMR3 y EMR4), antes de la retirada de quimioterapia (EMR5) y 3 meses postsupresión de la misma (EMR6). En el momento del diagnóstico se utilizó en todos los casos un panel de anticuerpos unidos a fluorocromos de tres colores para el diagnóstico de la LLA (EGIL-1995) y para la determinación de los IL que servirían para el seguimiento posterior de la EMR.

Las muestras de médula ósea se obtuvieron mediante punción aspirativa de 1 cm³ de sangre medular con aguja de 0,8 mm de diámetro, mediante técnica aséptica en cresta ilíaca posterosuperior o en esternón. Se recogieron en tubos con EDTA K₃ y se procesaron dentro de las siguientes 24 h. Se prepararon 2 × 10⁶ células para el marcaje con cada combinación de anticuerpos. En un primer tiempo se tomaron 2 × 10⁴ células totales, se dibujó una región sobre las células CD19+ o CD7+ y se determinó el porcentaje de las mismas sobre las totales. En un segun-

do tiempo se activó una ventana sólo con los eventos CD19+ o CD7+ y se analizaron las células con IL. Con un cálculo sencillo se obtuvo el porcentaje de las mismas sobre el total.

RESULTADOS

Se analizaron un total de 199 muestras (tabla 1), 51 postinducción (EMR1), de las cuales 37% eran positivas (> 0,01%) con un 14% de éstas superiores a 0,1%. Cuarenta y nueve se habían extraído posconsolidación (EMR2) con un 20% de las mismas positivas, 35 a 6 meses de mantenimiento (EMR3), siendo el 91% de las mismas negativas, 28 a los 12 meses (EMR4), 21 presupresión de quimioterapia (EMR5) y 15 a 3 meses de haberla suprimido (EMR6). En los últimos controles el 90% de las muestras se mantenían negativas.

Para saber qué pacientes presentaban persistencia de EMR se realizó el análisis por grupos de riesgo según las características clinicobiológicas al diagnóstico y se vio que los niños de alto riesgo, según la clasificación tradicional, tenían niveles altos postinducción con un 57% de muestras positivas frente a un 26 y 45% en los otros dos grupos. Si el umbral lo poníamos en 0,1% había un 28% de muestras positivas frente a 14 y 4% en los otros dos grupos. Además, un 43% de las muestras de los niños de alto riesgo se mantenían positivas posconsolidación. La eliminación de la EMR era más rápida en el grupo de riesgo intermedio donde prácticamente todas las muestras, el 96%, eran negativas después del tratamiento de consolidación y además la reducción postinducción había sido mejor que en el grupo de bajo riesgo. Posiblemente intervinieron en este último punto las diferencias en el tratamiento administrado.

Se analizaron también los resultados según el fenotipo inmunológico en el momento del diagnóstico (tabla 2) y se vio que, aunque postinducción no había ninguna diferencia, una proporción más alta de pacientes con leucemias de fenotipo T mantenía concentraciones elevadas de EMR posconsolidación.

Si se analiza la evolución posterior de los 18 pacientes que presentaron valores de EMR > 0,01 después del tratamiento de inducción, se observa que 12 se negativizaron posconsolidación, 4 a los 6 meses de mantenimiento, 2 con valores postinducción superiores al 0,1% recayeron a 4 y 11 meses de diagnóstico y uno con una leucemia bifenotípica mantuvo niveles altos hasta recibir tratamiento de rescate.

Analizando las recidivas que han presentado este grupo de enfermos vemos que con una mediana de seguimiento de 26 meses (ext. 4-55) han presentado recaída 4 (8%) enfermos. Dos eran pacientes de alto riesgo por edad y mala respuesta citológica inicial, presentaban valores de EMR > 0,1% en los dos primeros puntos de análisis, lo cual representa resistencia al tratamiento de administrado y recayeron a los 4 y 11 meses del diagnóstico.

TABLA 1. Enfermedad mínima residual (EMR) en leucemia linfoblástica aguda (grupo completo)

Puntos	EMR1 (%)	EMR2 (%)	EMR3 (%)	EMR4 (%)	EMR5 (%)	EMR6 (%)
< 0,01%	32 (63)	39 (80)	32 (91)	25 (90)	19 (90)	14 (93)
0,01-0,1	12 (23)	7 (14)	1 (3)	3 (10)	2 (9)	1 (7)
0,1-1	5 (10)	2 (4)	1 (3)	-	-	-
> 1	2 (4)	2 (2)	1 (3)	-	-	-
Total muestras	51	49	35	28	21	15

Nota: EMR + postinducción: 37% (14% > 0,1%); EMR + posconsolidación: 20%.

TABLA 2. Estudio de enfermedad mínima residual (EMR) en leucemia linfoblástica aguda (LLA) (según fenotipo inmunológico)

	EMR1 (postinducción)		EMR2 (posconsolidación)	
	< 0,01%	≥ 0,01%	< 0,01%	≥ 0,01%
LLAB	30 (68%)	15 (32%)	38 (84%)	7 (16%)
LLAT	4 (66%)	2 (34%)	4 (66%)	2 (34%)

Otro paciente con recidiva medular precoz no tenía características de mal pronóstico iniciales, aunque sí mantuvo valores de EMR entre 0,01 y 0,1%. El cuarto paciente era un adolescente con recidiva testicular aislada de forma precoz.

En el grupo de pacientes con EMR negativa después del tratamiento de inducción no se ha observado ninguna recaída.

Se realizó un análisis estadístico para ver la diferencia evolutiva según la eliminación de la EMR postinducción y vimos que no habían diferencias significativas en cuanto a la supervivencia libre de enfermedad (SLE), pero sí en

la supervivencia global (SG) con una $p < 0,0001$ (fig. 1). Además, utilizando el programa CART (fig. 2) vimos que a un umbral de EMR de 0,02 postinducción las diferencias eran muy importantes tanto en la SLE como en la supervivencia global.

DISCUSIÓN

El estudio de la EMR en niños afectados de LLA tiene dos objetivos. El primero y más importante es conocer la velocidad de destrucción de la masa leucémica y utilizar este parámetro como factor pronóstico fundamental que permita tomar decisiones terapéuticas. Lo conseguimos

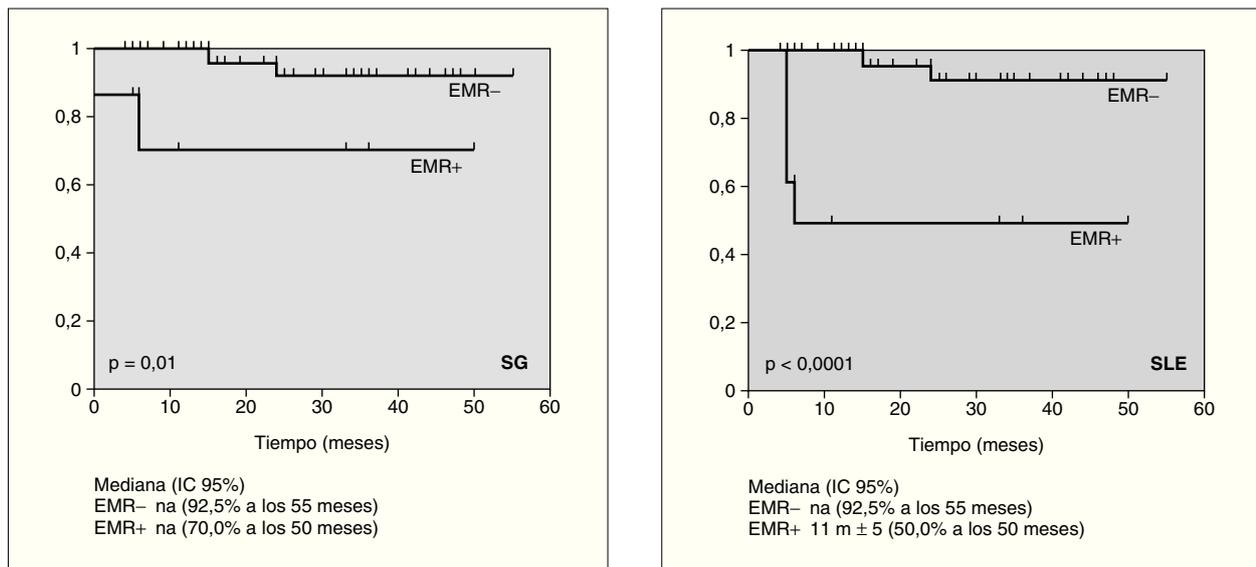


Figura 1. Evolución según enfermedad mínima residual (EMR) postinducción. SG: supervivencia global; SLE: supervivencia libre de enfermedad.

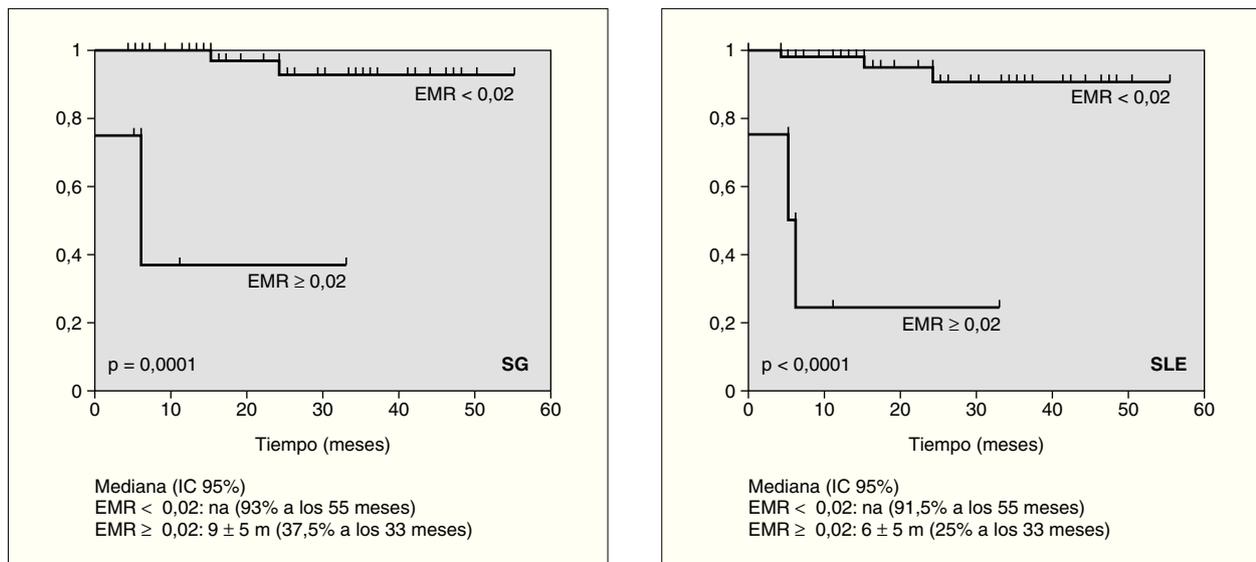


Figura 2. Evolución según enfermedad mínima residual (EMR) postinducción (umbral a 0,02 en EMR1; CART program).

con las primeras determinaciones, postinducción (EMR1) y posconsolidación (EMR2). El segundo objetivo es predecir cualquier recaída antes de la aparición de manifestaciones clínicas o hematológicas. Para ello se utiliza la monitorización secuencial^{9,10}.

La importancia clínica del estudio de la EMR queda avalada por los múltiples estudios aparecidos en la literatura médica durante los últimos años.

El grupo BFM en 1998 proponía el estudio secuencial con nueve puntos de análisis. Utilizaba técnicas de biología molecular. Refería valor pronóstico en todos los puntos, pero de forma especial en los dos primeros, lo cual les llevó a establecer tres grupos pronósticos independientes. Observaban que los niños con EMR < 0,01% en los dos primeros puntos de estudio tenían una SLE del 98% frente al 76 y 16% en los otros grupos¹¹. Más tarde publicaron otro artículo haciendo referencia a la mayor lentitud en la eliminación de la EMR en los pacientes de fenotipo T¹².

Si nos centramos en los estudios realizados con técnicas inmunológicas de citometría de flujo cabe destacar los del Hospital de Sant Jude en Memphis (EE.UU.). Coustan-Smith et al^{13,14} publicaron sus resultados por primera vez en 1998, obtenidos sobre 158 niños tratados con un protocolo uniforme, y concluyeron que la detección de EMR postinducción se asociaba a alteraciones genéticas de mal pronóstico, que la incidencia de recaídas era del 32% frente al 7% si la EMR era mayor o menor de 0,1% y que la persistencia de EMR en la semana 14 era un factor de muy mal pronóstico. Poco después, Pui y Campana¹⁵ proponían un nuevo concepto de remisión completa para estos niños, basándose en el estudio inmunológico de la EMR¹⁵.

Dworzak et al¹⁶, en Austria, estudiaron a 108 niños con cuatro puntos de análisis y referían como de gran importancia la información obtenida en el día +33 y en la semana 12. Casi al mismo tiempo otro estudio europeo de Björklund et al¹⁷ en Suecia establecía que los niveles de MR > 0,01% durante y después de la inducción implicaban peor SLE. El estudio más amplio publicado es el del Children's Oncology Group¹⁸, en 2003, sobre 1.016 niños afectados de LLA de fenotipo B. Describían la relación de la EMR postinducción con otros factores pronósticos ya conocidos y concluían que los niños de alto riesgo, según la clasificación tradicional, tenían una eliminación más lenta, hallazgo similar al observado en nuestro grupo de enfermos.

Marshall et al^{19,20} investigaron la importancia de la monitorización secuencial y observaron que el análisis combinado del estudio de la EMR en los meses 1 y 24 pueden predecir con seguridad la aparición posterior de recaídas en estos niños. Finalmente comentar el estudio de Neale et al²¹ que compara la citometría de flujo identificando IL, con la técnica de PCR por amplificación de genes que codifican receptores de antígenos, y concluye que los re-

sultados son concordantes en la mayoría de casos y que la utilización de los dos métodos a la vez aseguraría la identificación de la EMR en todos los enfermos.

Nuestros resultados están tomados sobre un grupo homogéneo de pacientes, tratados en un único centro con protocolos basados en la experiencia del grupo PetHEMA. En todos los casos ha habido al menos un IL "diana" para el seguimiento la cual ha demostrado la utilidad de la técnica. Es importante que las muestras de médula ósea tengan una buena celularidad mononucleada y poca contaminación con sangre periférica. La preparación técnica de la muestra y la adquisición de las células debe realizarse en menos de 24 h para impedir que aumente la población en apoptosis que interfiera los resultados. De 199 muestras analizadas 51 lo fueron postinducción, con un 37% de las mismas positivas y 49 posconsolidación con un 20% de muestras superiores al 0,01%. Se ha podido identificar a un grupo de pacientes de muy buen pronóstico con valores de EMR < 0,01% en los dos primeros puntos de estudio. En este grupo no hemos observado ninguna recaída. Por otro lado, el hallazgo de EMR+ en esos dos puntos ha significado resistencia al tratamiento y por tanto un factor de mal pronóstico que se debe tener en cuenta en el tratamiento posterior. En todas las recidivas observadas en el grupo completo había una positividad en esos dos puntos.

Como conclusiones finales decimos que el estudio de la EMR puede identificar a un grupo de pacientes de muy buen pronóstico, con valores negativos (< 0,01%) en EMR1 y EMR2 y que el hallazgo de EMR positiva en los dos primeros puntos significa resistencia al tratamiento y un factor de mal pronóstico que se debe tener en cuenta en todos los protocolos actuales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Conter V, Aricó M, Valsecchi MG, Basso G, Biondi A, Madon E, et al. Long term results of the Italian Association of Pediatric Hematology and Oncology (AIEOP) acute lymphoblastic leukaemia studies, 1982-1995. *Leukemia*. 2000;14:2196-204.
2. Gaynon PS, Trigg ME, Heerema NA, Sensel MG, Sather HN, Hammond GD, et al. Children's Cancer Group trials in childhood acute lymphoblastic leukaemia: 1983-1995. *Leukemia*. 2000;14:2223-33.
3. Schappe M, Reiter A, Zimmermann M, Harbott J, Ludwig WD, Heur G, et al. Long-term results of four consecutive trials in childhood ALL performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 1995. *Leukemia*. 2000;14: 2205-22.
4. Vilmer E, Suci S, Ferster A, Bertrand Y, Cavé H, Thyss A, et al. Long term results of three randomized trials (58831, 58832, 58881) in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a CLCG-EORTC report. Children Leukemia Cooperative Group. *Leukemia*. 2000;14:2257-66.
5. Ortega JJ, Ribera JM, Oriol A, Bastida P, González ME, Calvo C, et al. on behalf of PETHEMA Group. Early and delayed consolidation chemotherapy significantly improves the outcome of children with intermediate risk acute lymphoblastic leukemia. Final results of the prospective randomized PETHEMA ALL-89 TRIAL. *Haematologica*. 2001;86:586-95.

6. Béné MC, Castoldi GL, Knapp W on behalf of EGIL. Proposals for the immunological classification of leukaemias. *Leukemia*. 1995;9:1783-6.
7. Ross ME, Xiaodong Z, Song G, Shurtleff SA, Gurlman K, Williams WK, et al. Classification of pediatric acute lymphoblastic leukaemia by gene expression profiling. *Blood*. 2003;102:2951-9.
8. Ortega JJ. Leucemias agudas en niños. En: Sans Sabrafen, editor. *Hematología Clínica*. 2000;366-78.
9. Tomás JF, Román A, Subirá D, Vizcarra E, Llamas P, Fernández de Velasco J. Enfermedad mínima residual. Significado de la remisión en enfermedades oncohematológicas. *Haematologica* (ed. esp.). 2004;89:50-6.
10. Vidriales MB, Pérez JJ, López-Berges MC, Gutiérrez N, Ciudad J, Lucio P, et al. Minimal residual disease in adolescent (older than 14 years) and adult acute lymphoblastic leukemias: early immunophenotypic evaluation has high clinical value. *Blood*. 2003;101:4695-700.
11. Van Dongen JJM, Seriu T, Panzer-Grümayer ER, Biondi A, Pongers-Willemsse MJ, Corral L, et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet* 1998;352:1731-8.
12. Willemse MJ, Seriu T, Hettinger K, D'Aniello E, Hop WC, Panzer-Grümayer ER, et al. Detection of minimal residual disease identifies differences in treatment response between T-ALL and precursor B-ALL. *Blood*. 2002;99:4386-93.
13. Coustan-Smith E, Behm FG, Sánchez J, Boyett JM, Hancock ML, Raimondi SC, et al. Immunological detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 1998;351:550-4.
14. Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, Boyett JM, Behm SC, Raimondi SC, et al. Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2000;96:2691-6.
15. Pui CH, Campana D. New definition of remission in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2000;14:783-5.
16. Dworzak MN, Fröschi G, Printz D, Mann G, Pötschger U, Mühllegger N, et al. Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2002;99:1952-8.
17. Björklund E, Mazur J, Söderhall S, Porwit-MacDonald. Flow cytometric follow-up of minimal residual disease in bone marrow gives prognostic information in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2003;17:138-48.
18. Borowitz MJ, Pullen DJ, Shuster JJ, Viswanatha D, Montgomery K, William CL, et al. Minimal residual disease detection in childhood precursor-B-cell acute lymphoblastic leukemia: relation to other risk factors. A Children's Oncology Group Study. *Leukemia*. 2003;17:1566-72.
19. Marshall GM, Haber M, Kwan E, Zhu L, Ferrara D, Xue C, et al. Importance of minimal residual disease testing during the second year of therapy for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 2003;21:704-9.
20. Aricó M, Conter V, Valsecchi MG, Masera G. Importance of minimal residual disease testing during the second year of disease: Still no answer? *J Clin Oncol*. 2003;21:4463-8.
21. Neale GAM, Coustan-Smith E, Stow P, Pan Q, Chen X, Pui CH, et al. Comparative analysis of flow cytometry and polymerase chain reaction for the detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2004;18:934-8.