

Comparaison du kit QuantideX® qPCR BCR-ABL^{IS} (Asuragen) avec une technique "maison" pour la quantification des transcrits majeurs BCR::ABL1



Emilie KLEIN¹, Claudine CHOLLET¹, Remi DEVOS¹, Lisa BOUREAU¹, Stéphanie DULUCQ^{1,2}

¹ CHU de Bordeaux, Laboratoire d'Hématologie, Pessac, France

² University of Bordeaux, Inserm, UMR1312, BRIC, BoRdeaux Institute of oncology, Bordeaux*



Introduction

La quantification du transcrite BCR::ABL1 par reverse transcriptase PCR quantitative (RT-qPCR) est la technique de référence pour suivre la maladie résiduelle des patients atteints de leucémie myéloïde chronique (LMC). Le règlement européen IVDR (In-vitro Diagnostics Regulation) impose aux établissements de santé de travailler avec des matériels et réactifs marqués CE-IVD s'ils existent sur le marché.

Le Kit QuantideX qPCR BCR::ABL1^{IS} (Asuragen) est un des kits CE-IVD actuellement disponible. Ce kit permet l'analyse de 49 patients par plaque de 96 puits (vs 16 patients en technique maison). Ses performances techniques ont été validées¹ mais aucune donnée de comparaison avec une technique maison alignée sur l'échelle internationale n'a été réalisée jusqu'à présent en France.

Méthodes

Nous avons comparé les résultats %BCR::ABL1^{IS} et réponses moléculaires (RM) obtenus chez 42 patients et 10 lignées cellulaires avec des ratios allant de 0% à 60%. La RT-qPCR maison standardisée a suivi le protocole de l'European Against Cancer (EAC)². Un microgramme (µg) d'ARN a été extrait sur l'automate Maxwell puis 1µg d'ARN a été rétrotranscrit par la RT SuperScript Vilo4. Cent ng/puit d'ADNc ont été quantifiés sur le LC480 (Roche) en duplicat pour ABL1 et en triplicat pour BCR::ABL1 et les ratios ont été calculés et alignés sur l'échelle internationale après application d'un facteur de conversion validé selon les recommandations EUTOS. La RT du kit Quantidex a été réalisée à partir de 1 à 5µg d'ARN et les ADNc ont été quantifiés dans un seul puits par PCR multiplex sur le Cobas Z480 (Roche) selon les recommandations du fournisseur. Les ratios ont été alignés sur l'échelle internationale grâce à la présence de calibrateurs internes fournis dans le kit.

Résultats

Le nombre moyen de copies ABL1 amplifiées/puit avec la RT-qPCR maison était de 103 251 contre 145 125 avec le kit Quantidex.

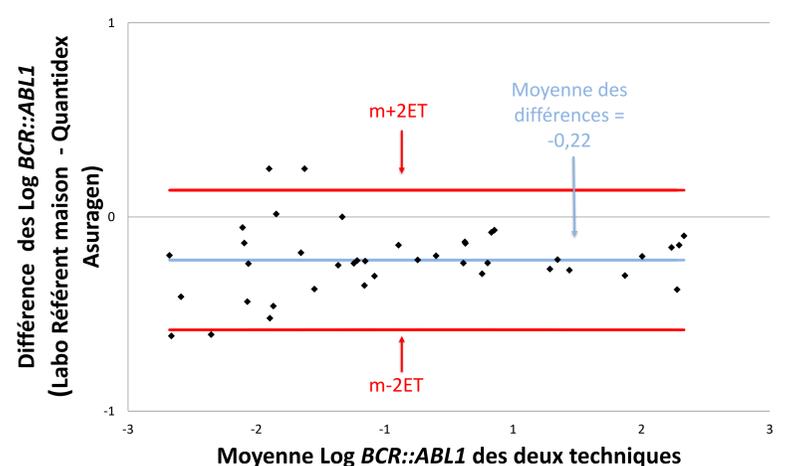
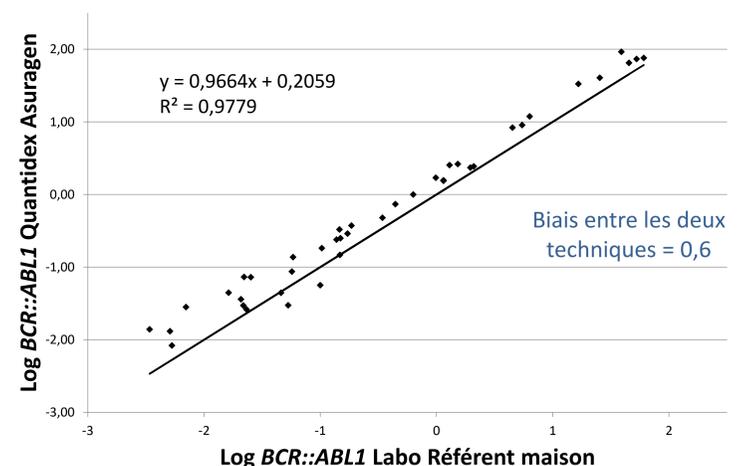
Parmi les 41 échantillons avec des transcrits détectables > 0,0032% IS avec la RT-qPCR maison, les ratios BCR::ABL1 sont concordants entre les 2 techniques pour :

- 78% des échantillons à +/-2 fold change
- 93% des échantillons à +/-3 fold change
- 100% des échantillons à +/-5 fold change

On observe un biais des %BCR::ABL1^{IS} estimé à 0,6 avec des ratios généralement plus élevés avec le kit et les niveaux de réponse moléculaire sont identiques dans 85% des cas.

Parmi les patients au niveau de réponse moléculaire différent (6 patients/41), 3 patients en RM4 en RT-qPCR ont été retrouvés en RM3 (RMM) avec le kit, 1 patient en RM3 (RMM) en RT-qPCR maison a été retrouvé en RM2 avec le kit, 1 patient en RM2 en RT-qPCR maison a été retrouvé en RM1 avec le kit, et finalement 1 patient en RM1 en RT-qPCR maison a été retrouvé en RM2 avec le kit.

Echantillon	Ratio BCR::ABL1 Quantidex Asuragen IS %	Ratio BCR::ABL1 Labo Réfèrent maison IS %	Niveau de RM Quantidex Asuragen	Niveau de RM Labo Réfèrent maison	Log Quantidex Asuragen	Log Labo référent maison	Différences des log
1	76,06	60,77	RM0	RM0	1,88	1,78	-0,10
2	73,59	52,69	RM0	RM0	1,87	1,72	-0,15
3	8,35	4,51	RM1	RM1	0,92	0,65	-0,27
4	1,54	1,15	RM1	RM1	0,19	0,06	-0,13
5	0,33	0,15	RM2	RM2	-0,48	-0,83	-0,35
6	0,37	0,19	RM2	RM2	-0,43	-0,73	-0,30
7	0,14	0,06	RM2	RM3	-0,86	-1,23	-0,37
8	0,045	0,016	RM3	RM3	-1,35	-1,79	-0,44
9	0,073	0,022	RM3	RM3	-1,13	-1,66	-0,52
10	0,028	0,0070	RM3	RM4	-1,55	-2,15	-0,61
11	0,014	0,0034	RM3	RM4	-1,86	-2,47	-0,61
12	0,013	0,0051	RM3	RM4	-1,88	-2,29	-0,41
13	0,030	0,022	RM3	RM3	-1,53	-1,66	-0,13
14	0,18	0,11	RM2	RM2	-0,74	-0,99	-0,25
15	65,12	45,35	RM0	RM0	1,81	1,66	-0,16
16	33,38	16,66	RM0	RM0	1,52	1,22	-0,30
17	2,35	1,96	RM1	RM1	0,37	0,29	-0,08
18	1,57	1,15	RM1	RM1	0,20	0,06	-0,14
19	0,29	0,17	RM2	RM2	-0,54	-0,76	-0,23
20	0,24	0,14	RM2	RM2	-0,62	-0,86	-0,24
21	0,15	0,15	RM2	RM2	-0,83	-0,83	0,00
22	2,54	1,30	RM1	RM1	0,41	0,11	-0,29
23	40,55	25,41	RM0	RM0	1,61	1,41	-0,20
24	0,74	0,44	RM2	RM2	-0,13	-0,35	-0,22
25	1,00	0,63	RM2	RM2	0,00	-0,20	-0,20
26	2,45	2,09	RM1	RM1	0,39	0,32	-0,07
27	0,026	0,023	RM3	RM3	-1,58	-1,63	-0,05
28	0,030	0,053	RM3	RM3	-1,52	-1,28	0,25
29	0,044	0,046	RM3	RM3	-1,35	-1,34	0,02
30	0,056	0,10	RM3	RM3	-1,25	-1,00	0,25
31	11,92	6,34	RM0	RM1	1,08	0,80	-0,27
32	0,09	0,06	RM3	RM3	-1,06	-1,24	-0,18
33	92,37	39,04	RM0	RM0	1,97	1,59	-0,37
34	0,036	0,021	RM3	RM3	-1,44	-1,68	-0,24
35	0,48	0,34	RM2	RM2	-0,32	-0,46	-0,15
36	0,0084	0,0053	RM4	RM4	-2,08	-2,28	-0,20
37	0,073	0,025	RM3	RM3	-1,14	-1,60	-0,46
38	9,06	5,46	RM1	RM1	0,96	0,74	-0,22
39	2,64	1,53	RM1	RM1	0,42	0,18	-0,24
40	1,70	0,99	RM1	RM2	0,23	-0,01	-0,24
41	0,25	0,15	RM2	RM2	-0,60	-0,83	-0,22



Critères d'acceptabilité	Intervalle des différences en log	Critères de Muller ³	Nombre et % de patients
+/- 2 fold change	[-0,3-0,3]	≥ 50% des échantillons	9/41 - 78%
+/- 3 fold change	[-0,48-0,48]	≥ 75% des échantillons	39/41 - 93%
+/- 5 fold change	[-0,7-0,7]	≥ 90% des échantillons	41/41 - 100%

Conclusion

Les deux méthodes sont comparables selon les critères de Muller³. Il existe un biais de quantification entre les deux techniques mais les niveaux de réponses moléculaires sont identiques dans 85% des cas.

Les quelques discordances observées peuvent être expliquées par le biais et la variabilité intra-laboratoire de chacune des techniques et n'auraient probablement pas d'impact clinique dans la mesure où les décisions thérapeutiques sont appréciées sur une cinétique et non sur la quantification isolée d'un seul point.

Références bibliographiques

1-Analytical Validation of a Highly Sensitive, Multiplexed Chronic Myeloid Leukemia Monitoring System Targeting BCR-ABL1 RNA, JT Brown et al, J Mol Diagn, 2019 Jul;21(4):718-733.

2-Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - A Europe Against Cancer Program, J Gabert et al. Leukemia (2003) 17, 2318-2357

3-Harmonization of molecular monitoring of CML therapy in Europe MC Müller et al., Leukemia (2009) 23, 1957-1963