

Interlaboratory comparability – an important criterion for selection of a method for relative quantification of BCR-ABL

Beránek M.¹, Hegerová J.¹, Voglová J.², Bělohávková P.²

¹Institute of Clinical Biochemistry and Diagnostics, Faculty of Medicine, Charles University and University Hospital, Hradec Králové

²Department of Clinical Hematology, Faculty of Medicine, Charles University and University Hospital, Hradec Králové

SUMMARY

Objective: A BCR-ABL fusion transcript found in peripheral blood or bone marrow is a specific molecular marker of chronic myeloid leukemia and Philadelphia chromosome – positive acute lymphoblastic leukemia. Modern quantitative analyses in molecular biology are based on real-time PCR technology and fluorescent probes targeted to a complementary part of DNA/cDNA templates. A current trend in laboratory medicine and applied molecular biology is to support proficiency testing and transferability of results of quantitative PCR analyses. The goal of the study is to compare the diagnostic impact of two used systems for BCR-ABL quantification with respect to recommendations of the Europe Against Cancer Program (EAC) unifying the used BCR-ABL methodology.

Material and Methods: A total of 143 peripheral blood specimens and 5 bone marrow aspirates from 80 adult subjects were analysed. Two quantitative procedures were simultaneously examined. Procedure I was based on Superscript III reverse transcription (Invitrogen) and M-bcr FusionQuant Kit (Ipsogen) for relative quantification of BCR-ABL. In procedure II we used LightCycler t(9;22) Quantification Kit (Roche).

Results: The calibration curve for BCR-ABL gene (FusionQuant) was: $CT = -3.54 \cdot \log(\text{conc BCR-ABL}) + 42.33$; automatic threshold = 0.06, correlation coefficient (r) = -1.00, reaction efficiency = 92%. The Roche kit does not use any calibration process for BCR-ABL. The calibration curve for ABL gene (FusionQuant) was $CT = -3.53 \cdot \log(\text{conc ABL}) + 40.91$, ABL threshold = 0.08, $r = -1.00$, reaction efficiency = 91%. The calibration curve for G6PDH control gene (Roche) was $CT = -3.2 \cdot \log(\text{conc G6PDH}) + 30.9$, $r = -1.00$, reaction efficiency = 100%. The limit of quantification for BCR-ABL (FusionQuant) was 10 copies in 5 μl of the used cDNA. The lowest relative concentration of BCR-ABL detectable by the Roche assay was 0.001 %. The experimental data showed a close linear association in relative quantity of BCR-ABL received by the examined assays with $r = 0.77$, $P < 0.001$.

Conclusions: The principal difference between the tested procedures is the house-keeping gene used for normalization of BCR-ABL quantity. In agreement with the Europe Against Cancer strategy we have selected ABL gene as a normalization gene for our lab.

Key words: BCR-ABL, quantification, real-time PCR, house-keeping gene, ABL gene, EQA.

SOUHRN

Beránek M., Hegerová J., Voglová J., Bělohávková P.: Mezilaboratorní porovnatelnost – důležité kritérium pro výběr metody pro relativní kvantifikaci BCR-ABL

Úvod: Fúzní transkript BCR-ABL, prokazatelný v periferní krvi nebo vzorku kostní dřeně, je specifickým molekulárním markerem chronické myeloidní leukémie a akutní lymfoblastické leukémie s nálezem Filadelfského chromozomu. Moderní kvantitativní molekulárně biologická vyšetření jsou založená na technologii real-time PCR a fluorescenčních sondách komplementárních vůči vyšetřovanému DNA/cDNA templátu. Současný trend v laboratorní medicíně a aplikované molekulární biologii podporuje snahu o externí hodnocení kvality a přenositelnost výsledků kvantitativních PCR analýz. Cílem studie je porovnat diagnostický význam dvou analytických systémů určených pro kvantifikaci BCR-ABL s ohledem na současná doporučení programu Europe Against Cancer Program (EAC).

Materiál a metody: Celkem bylo analyzováno 148 vzorků (143 vzorky periferní krve a 5 aspirátů kostní dřeně) získaných od 80 dospělých jedinců. Vzorky byly vyšetřeny paralelně dvěma kvantitativními postupy s normalizací na příslušný house-keeping gen. První postup byl založen na reverzní transkripci RNA pomocí enzymu Superscript III (Invitrogen) a kvantifikaci BCR-ABL soupravou M-bcr FusionQuant Kit (Ipsogen). Druhý postup používal soupravu LightCycler t(9;22) Quantification Kit (Roche).

Výsledky: Kalibrační rovnice pro BCR-ABL gen (FusionQuant) byla: $CT = -3,54 \cdot \log(\text{conc BCR-ABL}) + 42,33$; automatický threshold = 0,06, korelační koeficient $r = -1,00$, reakční účinnost = 92 %. Souprava firmy Roche nepoužívá pro kvantifikaci BCR-ABL genu kalibrační proces. Kalibrační rovnice pro ABL gen (FusionQuant) byla $CT = -3,53 \cdot \log(\text{conc ABL}) + 40,91$, threshold pro ABL = 0,08, $r = -1,00$, reakční účinnost = 91 %. Kalibrační rovnice pro G6PDH gen (Roche) byla $CT = -3,2 \cdot \log(\text{conc G6PDH}) + 30,9$, $r = -1,00$, reakční účinnost = 100 %. Minimální koncentrace BCR-ABL stanovitelná soupravou FusionQuant byla 10 kopií v 5 μl použité cDNA. Nejnižší relativní koncentrace BCR-ABL stanovitelná soupravou Roche byla 0,001 %. Experimentální data ukázala lineární závislost mezi hodnotami relativní koncentrace BCR-ABL dosaženými oběma metodami s korelačním koeficientem $r = 0,77$, $p < 0,001$.

Závěr: Mezi principiální rozdíly obou testovaných souprav patří výběr house-keeping genu použitého pro normalizaci koncentrace BCR-ABL. V souladu s doporučeními programu Europe Against Cancer jsme pro rutinní vyšetření v naší laboratoři zvolili soupravu FusionQuant s normalizací na ABL gen.

Klíčová slova: BCR-ABL, kvantifikace, real-time PCR, house-keeping gen, ABL gen, EQA.