

## **GQR – LMC**

*GRUPE QUÉBÉCOIS DE RECHERCHE SUR LA LEUCÉMIE MYÉLOÏDE CHRONIQUE  
EN COLLABORATION AVEC L'AMHOQ*

### Les aspects techniques de la détection et de la quantification relative de l'ARNm BCR-ABL par PCR

Eric Winstall Ph.D.  
Centre hospitalier universitaire affilié  
en collaboration avec  
Bruno Lamontagne Ph.D.  
Laboratoire de biologie moléculaire diagnostique  
Hôpital Maisonneuve-Rosemont

### **Plan de la présentation**

- ▣ Prélèvements et préparation du matériel analytique
- ▣ L'identification de nouveaux cas par PCR multiplexe et détermination des points de cassure
- ▣ Quantification relative par rétro-transcription et PCR en temps réel
  - Utilisation d'une trousse commerciale
  - Développement et utilisation d'un essai maison
- ▣ Conclusions

---

**GQR – LMC**  
GRUPE QUÉBÉCOIS DE RECHERCHE SUR LA LEUCÉMIE MYÉLOÏDE CHRONIQUE  
EN COLLABORATION AVEC L'AMHOQ

## Prélèvements

- ☐ Quantité:
  - 12 ml de sang ( 2-3 x 4 ml)
  - 1-3 ml de moelle
- ☐ Type de tubes:
  - EDTA
  - Citrate
  - Tubes PAXgene® (nécessitent une méthode d'extraction particulière)
- ☐ Délais de traitement:
  - Idéalement 24 hrs
- ☐ Transport:
  - Température: idéalement 20°C
  - Conditions malheureusement très variables



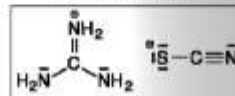
**GQR - LMC**

Groupes d'activités de recherche sur la leucémie myéloïde chronique  
En collaboration avec l'AMBO

## Préparation du matériel analytique

- ☐ Cellules du sang utilisées:
  - Leucocytes totaux
    1. Hémolyse et centrifugation des leucocytes
    2. Lyse des cellules dans un tampon inactivant les RNases
  - Cellules mononucléées
    1. Fractionnement par gradient de densité (Ficoll)
    2. Récupération des mononucléées à l'interphase et décompte des cellules
    3. Lyse des cellules dans un tampon inactivant les RNases

Guandine thiocyanate



**GQR - LMC**

Groupes d'activités de recherche sur la leucémie myéloïde chronique  
En collaboration avec l'AMBO

## Préparation du matériel analytique

### ☐ Purification de l'ARN total:

- Réactif Trizol et précipitation
- Colonnes d'affinités



### ☐ Dosage de l'ARN

- Spectrophotométrie UV ( $A_{260}$ ) et ratio  $A_{260}/A_{280}$
- Fluorométrie (Qubit)

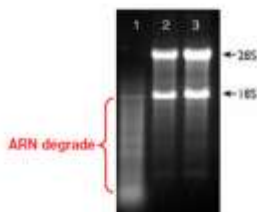


**GQR-LMC**

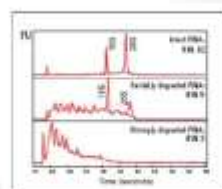
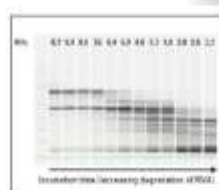
Groupe québécois de recherche sur la leucémie myéloïde chronique  
En collaboration avec l'AMQO

## Contrôle de la qualité de l'ARN isolé

### ☐ Analyse qualitative sur gel d'agarose:

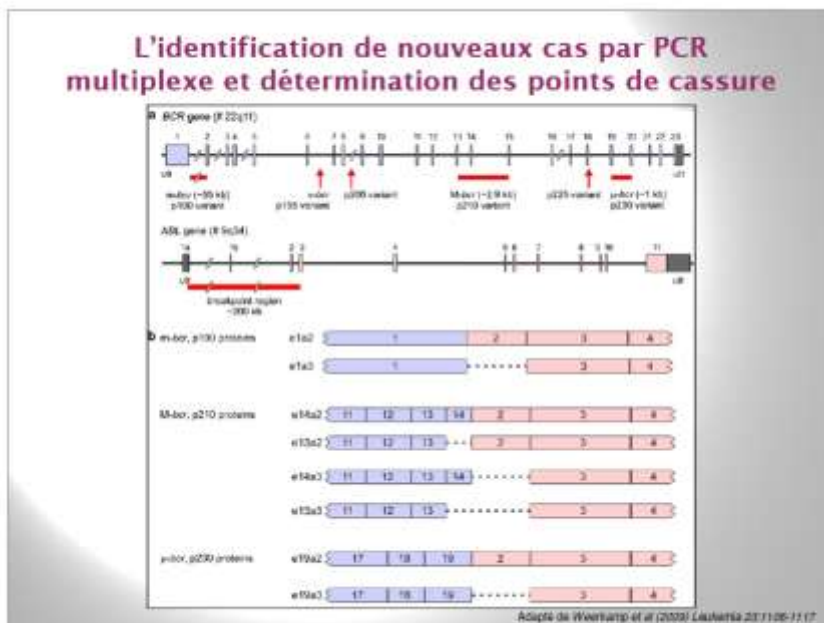
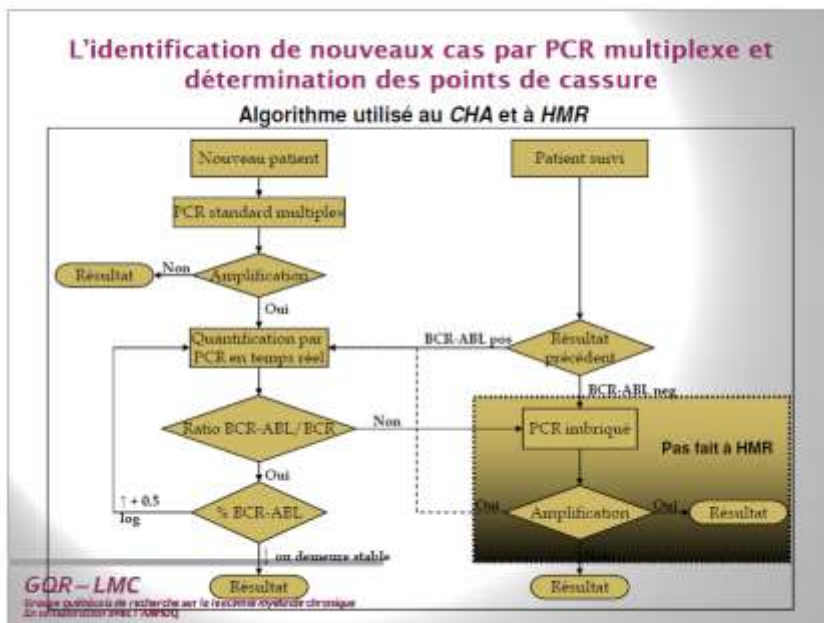


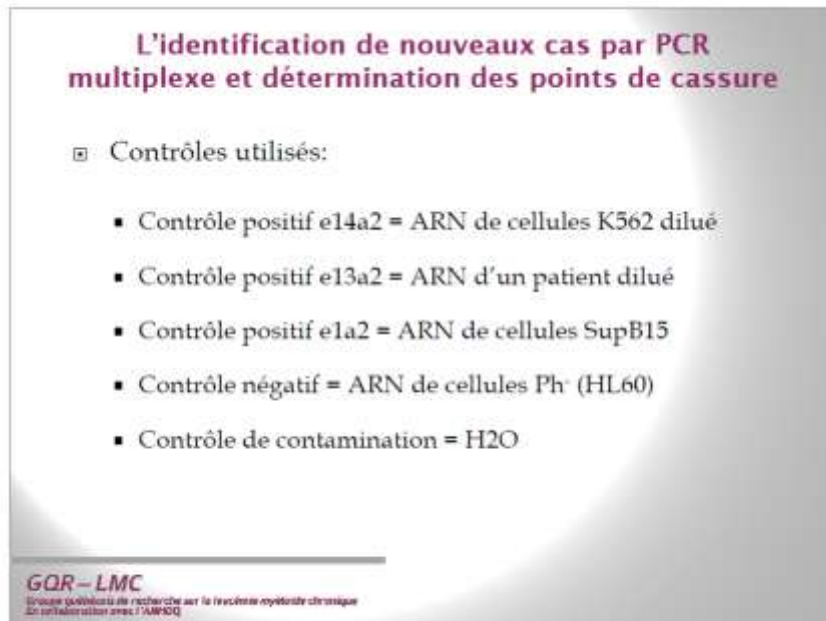
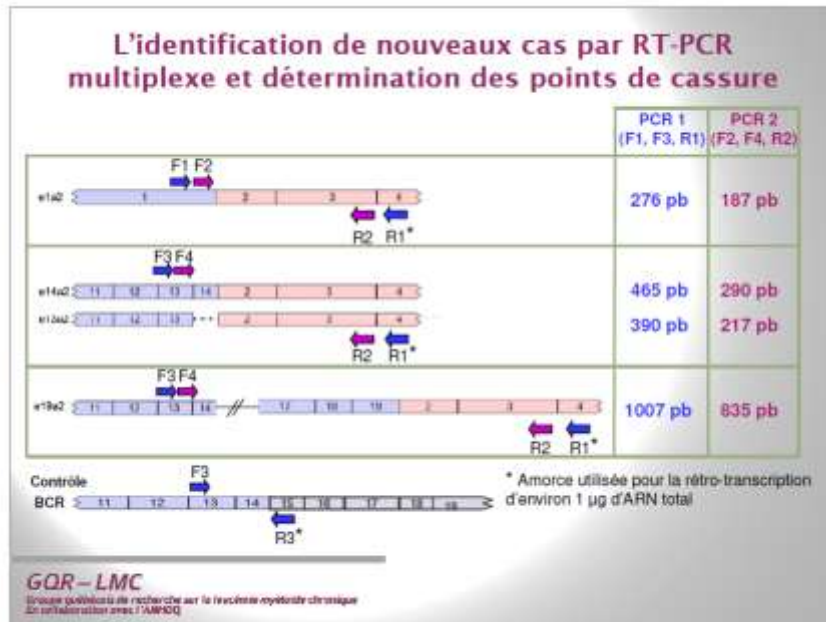
### ☐ Analyse quantitative sur Bioanalyzer® ou Qiaexel®:

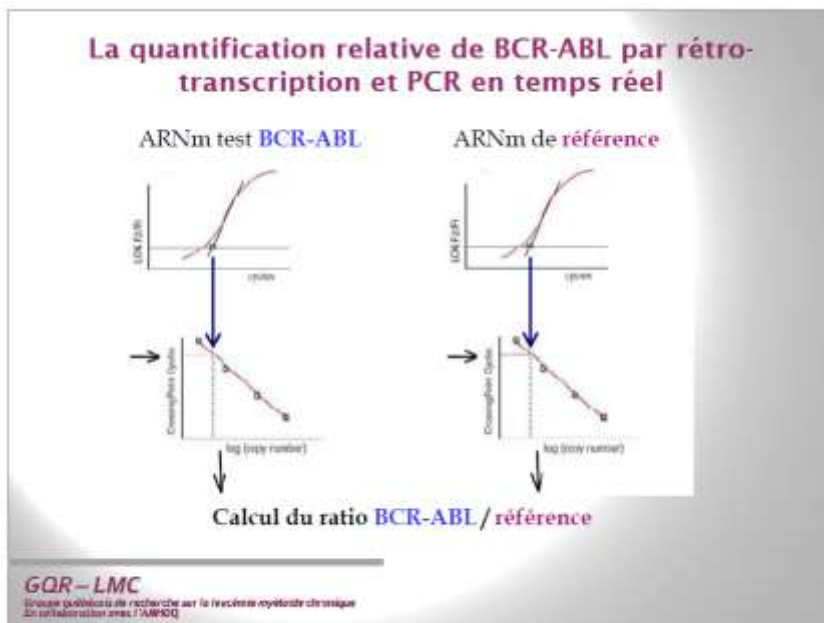
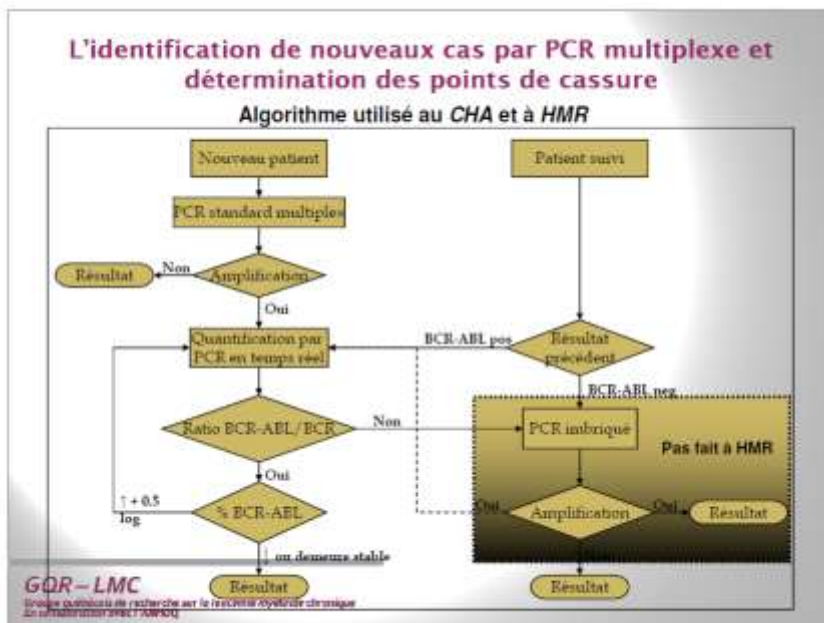


**GQR-LMC**

Groupe québécois de recherche sur la leucémie myéloïde chronique  
En collaboration avec l'AMQO







## Quantification relative par RT-PCR: le choix du gène référence est important

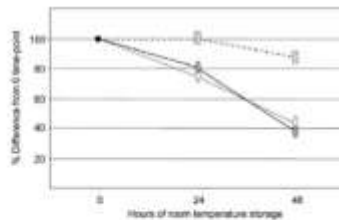
- Un gène de référence bien choisi:
  - Identifie les échantillons d'ARN de qualité inacceptable.
  - Compense les variations liées à l'intégrité de l'ARN dans l'échantillon.
  - Ajuste la quantification du gène cible en fonction de l'efficacité de la rétro-transcription.
- Un gène de référence mal choisi:
  - Peut faussement donner l'impression que le test est robuste et que les échantillons sont acceptables.
  - Accroît le risque d'obtenir des résultats faussement négatifs.

**GQR-LMC**

Groupes d'activités de recherche sur la leucémie myéloïde chronique  
En collaboration avec l'AMPQD

## Quantification relative par RT-PCR: le choix du gène référence est important

- Critères de sélection:
  - Absence de pseudogène
  - Niveau d'expression similaire à celui de BCR-ABL
  - Stabilité de l'ARNm similaire à celui de l'ARNm de BCR-ABL



BCR-ABL: transcript mean percentage difference from zero time point  
 0 hour vs 24 hour P=0.0007  
 24 hour vs 48 hour P=0.0002  
 BCR: transcript mean percentage difference from zero time point  
 0 hour vs 24 hour P=0.0001  
 24 hour versus 48 hour P=0.0002  
 GAPDH: transcript mean percentage difference from zero time point  
 0 hour vs 24 hour P=0.0001  
 24 hour versus 48 hour P=0.0001

Adapted by Hughes and Emswiler in Myeloproliferative Disorders chapter 2, Springer Verlag, 2004

**GQR-LMC**

Groupes d'activités de recherche sur la leucémie myéloïde chronique  
En collaboration avec l'AMPQD

## Quantification relative par RT-PCR: les gènes de référence les plus utilisés

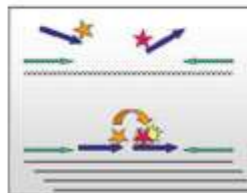
- ▣ ABL
  - recommandé pour les tests standardisés du programme Europe Against Cancer (EAC)
- ▣ BCR
  - Gène de référence utilisé dans l'étude IRIS (International Randomized Study of Interferon versus ST57)
- ▣ B-glucuronidase (GUSB)
- ▣ Glucose 6-phosphate deshydrogénase (G6PDH)
  - trousse t9;22 de la compagnie Roche

**GQR – LMC**

Groupes québécois de recherche sur la leucémie myéloïde chronique  
En collaboration avec l'AMPO

## Utilisation de la trousse de Roche Diagnostics (LightCycler® t(9;22) Quantification Kit)

- ▣ La technologie FRET (Fluorescence resonance energy transfert)



- ▣ Un avantage: très sensible aux modifications de bases
- ▣ Un inconvénient: Taille de l'amplicon supérieure à celle du TaqMan.

**GQR – LMC**

Groupes québécois de recherche sur la leucémie myéloïde chronique  
En collaboration avec l'AMPO



## L'utilisation de la trousse commerciale requière un appareil de chez Roche Diagnostics

- Le LightCycler® 1.5 ou 2.0

Capillaires pour LightCycler®



LightCycler®



**GQR-LMC**

Groupe québécois de recherche sur la leucémie myéloïde chronique  
En collaboration avec l'AMPOQ

## La spécificité du LightCycler t(9;22) Quantification kit

Détection BCR-ABL:

Points de cassure



▬▬▬ Sondes HybProbe

▬▬▬ Amorces

G6PDH: Gène de normalisation



**GQR-LMC**

Groupe québécois de recherche sur la leucémie myéloïde chronique  
En collaboration avec l'AMPOQ

## L'application de la trousse

- ❑ Cet essai permet de déterminer le niveau relatif de transcrits BCR-ABL par rapport à un gène de normalisation (G6PDH).
- ❑ La spécificité de l'essai est dirigée vers les régions des points de cassure majeurs (M-bcr) et mineurs (m-bcr). L'essai permet également de détecter la forme e19a2 ( $\mu$ -bcr).
- ❑ Il s'agit d'une RT-PCR en 2 étapes: production d'ADNc, puis la quantification.

**GQR-LMC**  
 Groupe québécois de recherche sur la leucémie myéloïde chronique  
 En collaboration avec l'AMQO

## Ce que l'on retrouve dans la trousse

- ❑ Tous les réactifs pour la synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc).
- ❑ 2 mélanges réactionnels contenant les amorces et sondes HybProbe (une pour BCR-ABL et une pour G6PDH).
- ❑ Les standards pré-dilués pour le gène de normalisation G6PDH.
- ❑ Un contrôle positif d'ARN pour BCR-ABL et un pour G6PDH.

**GQR-LMC**  
 Groupe québécois de recherche sur la leucémie myéloïde chronique  
 En collaboration avec l'AMQO

### La méthodologie employée

- ▣ Synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc) sur :
  1. Tous les échantillons patients
  2. Les 3 standard d'ARN de G6PDH en duplicata
  3. Un contrôle positif (t(9;22))
  4. Un contrôle négatif (H<sub>2</sub>O)
- ▣ Amplification par PCR de l'ADNc sur le LightCycler®
- ▣ Analyse des résultats en utilisant le logiciel de l'appareil.

**GQR-LMC**

Service spécialisé de recherche sur la leucémie myéloïde chronique  
En collaboration avec l'AMPQD

### Ce que doit contenir chacune des expériences

- ▣ 3 points de courbe standard G6PDH en duplicata
- ▣ Un contrôle positif BCR-ABL
- ▣ Un contrôle positif G6PDH
- ▣ Un contrôle négatif (H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub>) pour BCR-ABL et un pour G6PDH
- ▣ Un maximum de 10 patients peuvent être analysés simultanément (au *CHA*: 6 patients en duplicata).

**GQR-LMC**

Service spécialisé de recherche sur la leucémie myéloïde chronique  
En collaboration avec l'AMPQD

### Une expérience typique

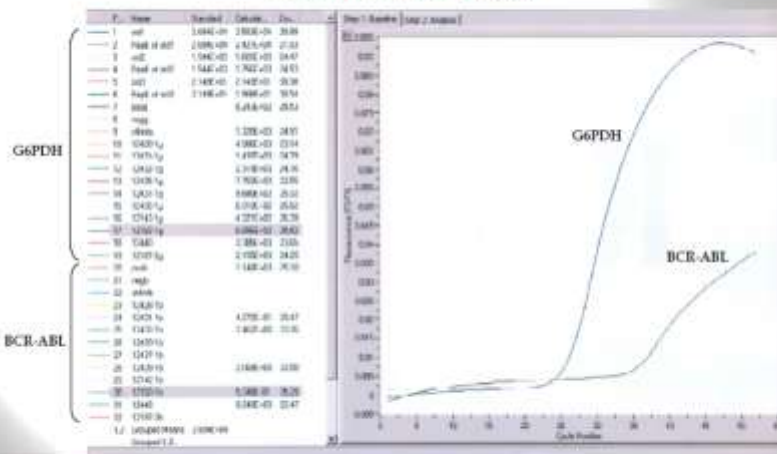
Capillaire	Réaction	Mélange maître G6PDH	Mélange maître BCR-ABL
1	ARN G6PDH Std I	1 rxn	-
2	ARN G6PDH Std I	1 rxn	-
3	ARN G6PDH Std II	1 rxn	-
4	ARN G6PDH Std II	1 rxn	-
5	ARN G6PDH Std III	1 rxn	-
6	ARN G6PDH Std III	1 rxn	-
7	Contrôle Pos	1 rxn	-
8	Contrôle Pos	-	1 rxn
9	Contrôle Neg	1 rxn	-
10	Contrôle Neg	-	1 rxn
11-32	n échantillons	n rxn	n rxn
	Nbr de réactions	8 + n	2 + n

Au CMA, seulement ce point de courbe dans chaque essai

#### GQR-LMC

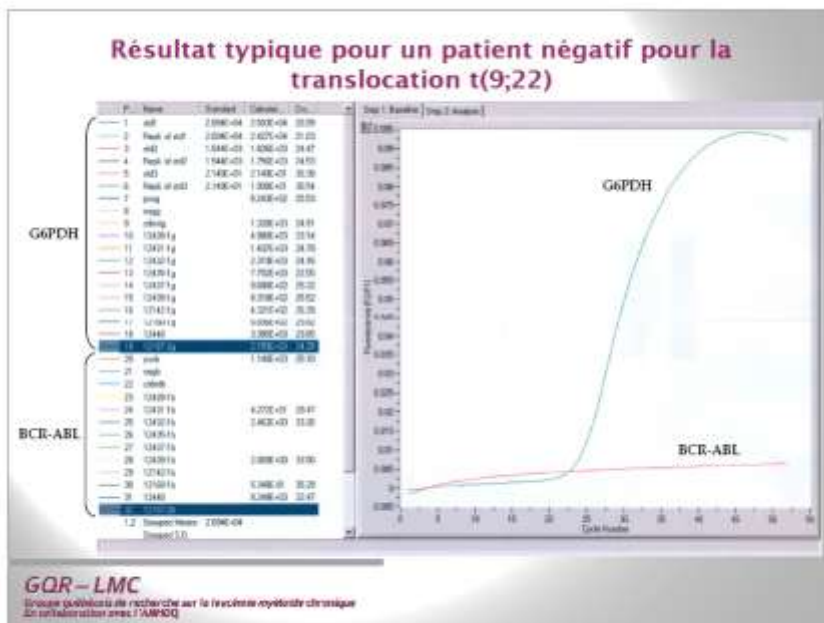
Service spécialisé de recherche sur la leucémie myéloïde chronique  
En collaboration avec l'AMPQ

### Résultat typique pour un patient positif pour la translocation t(9;22)



#### GQR-LMC

Service spécialisé de recherche sur la leucémie myéloïde chronique  
En collaboration avec l'AMPQ



### Divergence de résultats pour certains patients entre la trousse commerciale (Roche) et l'essai TaqMan de HMR

Patient	Réduction en Log (Roche)	Réduction en Log (HMR)	Réduction en Log (EXT)
1	1,9	2,8	2,8
2	2,9	4,1	3,9
3	2,1	3,5	3,5
4	1,9	3,3	3
5	2,3	3,8	4
6	1,9	2,5	2,2
7	1,6	2,1	2
8	2,3	3,4	3

TaqMan

**GOR-LMC**  
Groupe québécois de recherche sur la leucémie myéloïde chronique  
En collaboration avec l'AMPOQ

## Les forces et faiblesses de la trousse commerciale de Roche Diagnostics

### Forces

- ▣ Le FRET est sensible à la présence de mutations (spécificité).
- ▣ Plusieurs points de cassure analysés simultanément.

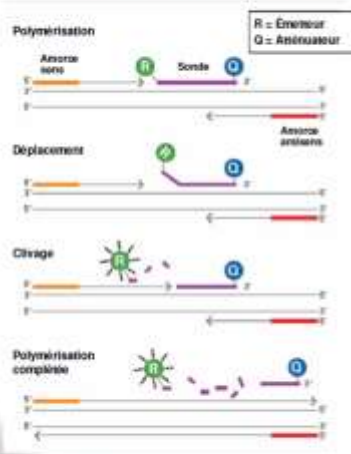
### Faiblesses

- ▣ Les échantillons-patient sont analysés en simplicité.
- ▣ Pas de courbe standard pour le transcrit BCR-ABL.
- ▣ Sensibilité limitée de l'essai (-Log 3,5).
- ▣ Coût important de la trousse (~ 100\$/patient)
- ▣ Taille de l'amplicon

### GQR-LMC

Groupe québécois de recherche sur la leucémie myéloïde chronique  
En collaboration avec l'AMQO

## Développement d'un test maison basé sur la détection à l'aide d'une sonde d'hydrolyse



- ▣ Également appelées sondes TaqMan®
- ▣ Avantages :
  - Nécessite des amplicons plus courts
  - Détection réputée plus sensible
  - Sondes moins coûteuses
- ▣ Inconvénients:
  - Sonde détruite à chaque cycle
  - Ne permet pas d'analyse de Tm en fin d'amplification

### GQR-LMC

Groupe québécois de recherche sur la leucémie myéloïde chronique  
En collaboration avec l'AMQO

## Développement d'un test maison basé sur la détection à l'aide d'une sonde d'hydrolyse

- ▣ Technologie et appareils:



**GQR-LMC**

Groupe québécois de recherche sur la leucémie myéloïde chronique  
En collaboration avec l'AMQO

## Développement d'un test maison de quantification de BCR-ABL par PCR en temps réel

- ▣ Rétro-transcription:
  - Séparée ou combinée à l'amplification ?
  - Enzyme: M-MLV, SuperScript<sup>®</sup>, Transcriptor<sup>®</sup> ?
  - Amorces:
    - Utilisation de pentadécamères aléatoires d(N)<sub>15</sub>

*Ross et al (2008) Clinical Chemistry 54:1568-1571*



**GQR-LMC**

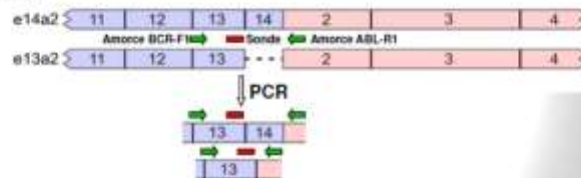
Groupe québécois de recherche sur la leucémie myéloïde chronique  
En collaboration avec l'AMQO

## Développement d'un test maison de quantification de BCR-ABL par PCR en temps réel

### Choix des sondes et amorces:

- Essai TaqMan fonctionne mieux avec des amplicons de 150pb ou moins

#### BCR-ABL



#### BCR



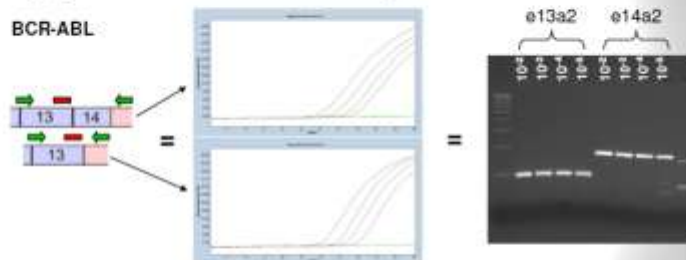
**GQR-LMC**

Service spécialisé de recherche sur la leucémie myéloïde chronique  
En collaboration avec l'AMPQD

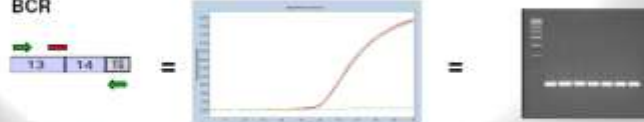
## Développement d'un test maison de quantification de BCR-ABL par PCR en temps réel

### Optimisation des conditions:

#### BCR-ABL



#### BCR



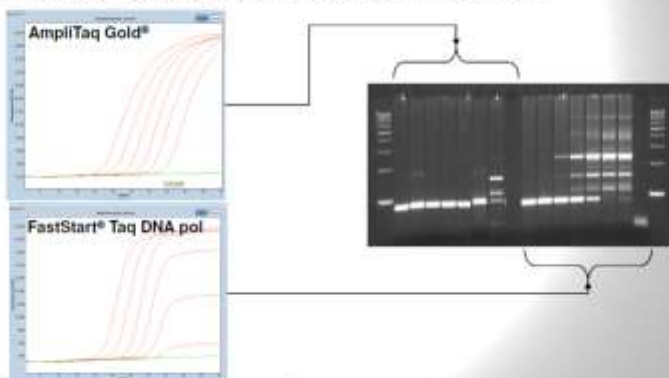
**GQR-LMC**

Service spécialisé de recherche sur la leucémie myéloïde chronique  
En collaboration avec l'AMPQD



## Développement d'un test maison de quantification de BCR-ABL par PCR en temps réel

- Optimisation des conditions:
  - Essai de quelques polymérases thermostables:



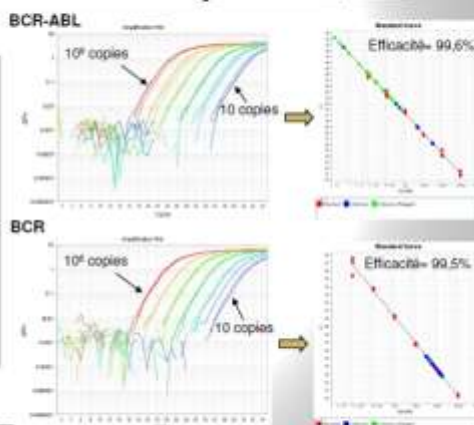
**GQR-LMC**  
 Groupe québécois de recherche sur la leucémie myéloïde chronique  
 En collaboration avec l'AMQO

## Développement d'un test maison de quantification de BCR-ABL par PCR en temps réel

### Courbes standards et efficacité d'amplification (HMR)

#### Courbe standard

- Plasmide purifié et dosé contenant le fragment BCR-ABL
- Dilutions dans le mélange réactionnel de la PCR en temps réel
- Amplification simultanée avec les différents patients
- Triplicata des points de dilution 1:10



**GQR-LMC**  
 Groupe québécois de recherche sur la leucémie myéloïde chronique  
 En collaboration avec l'AMQO

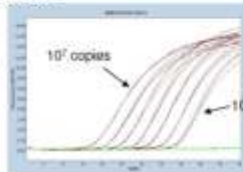
## Développement d'un test maison de quantification de BCR-ABL par PCR en temps réel

### Courbes standards et efficacité d'amplification (CHA)

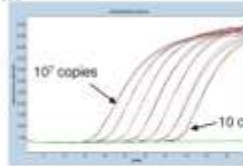
#### Courbe standard

- Produits d'amplification PCR d'environ 1kb purifiés et dosés
- Dilutions dans un mélange réactionnel mimant les conditions de retro-transcription. (tampon, amorces, nucléotides, ARN)
- Triplicata de points de dilution 1:10
- Refaite avec chaque nouveau lot de sonde
- Ajustée à chaque test avec un standard à  $10^5$  copies

#### BCR-ABL



#### BCR

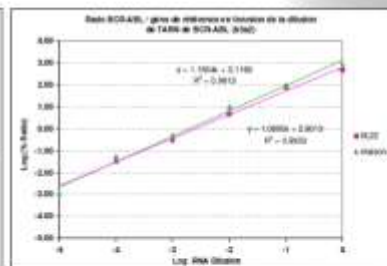
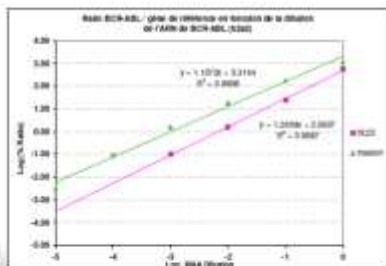


#### GQR-LMC

Service publicitaire de recherche sur la leucémie myéloïde chronique  
En collaboration avec l'AMPQJ

## Développement d'un test maison de quantification de BCR-ABL par PCR en temps réel

### Comparaison de la linéarité de réponse: test développé vs trousse commerciale



#### GQR-LMC

Service publicitaire de recherche sur la leucémie myéloïde chronique  
En collaboration avec l'AMPQJ

## Implantation d'un test maison de quantification de BCR-ABL par PCR en temps réel

- ▣ Détermination du niveau de base pour le calcul de la réduction logarithmique

1. Analyse du ratio BCR-ABL/BCR sur l'ARN de 50 patients au diagnostic d'une LMC ( $e13a2 \approx e14a2$ )
2. Calcul de la médiane des valeurs obtenues ( $\approx 1$ )

Valeur correspondant à 100% BCR-ABL et valeur à partir de laquelle la réduction logarithmique est calculée



### GQR-LMC

Groupe québécois de recherche sur la leucémie myéloïde chronique  
En collaboration avec l'AMPOQ

## Implantation d'un test maison de quantification de BCR-ABL: contrôles et indicateurs de qualité

### CHA

- ▣ Chaque test comprend systématiquement 4 contrôles analysés en duplicata:
  - ▣ contrôle HIGH
    - ARN cellules K562 + ARN cellules HL60
    - BCR-ABL/BCR = 1
  - ▣ contrôle MMR
    - ARN cellules HL60 + ARN cellules K562
    - BCR-ABL/BCR = 0.00025
  - ▣ contrôle NEG
    - ARN cellules HL60 (Ph-)
    - BCR-ABL/BCR = 0
  - ▣ contrôle NIC
    - H<sub>2</sub>O

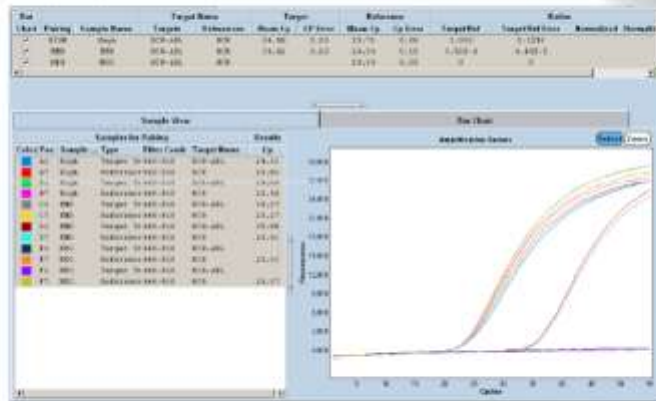
### HMR

- ▣ Chaque test comprend :
  - ▣ Une courbe standard pour BCR-ABL
    - Courbe variant entre  $10^6$ - $10^4$  copies (triplicata)
  - ▣ Une courbe standard pour BCR
    - Courbe variant entre  $10^6$ - $10^4$  copies (triplicata)
  - ▣ contrôle NEG
    - ARN cellules Ph-
    - BCR-ABL/BCR = 0 (duplicata)
  - ▣ contrôle NIC
    - H<sub>2</sub>O (duplicata)

### GQR-LMC

Groupe québécois de recherche sur la leucémie myéloïde chronique  
En collaboration avec l'AMPOQ

## Implantation d'un test maison de quantification de BCR-ABL: contrôles et indicateurs de qualité

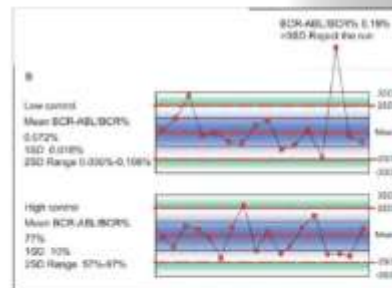
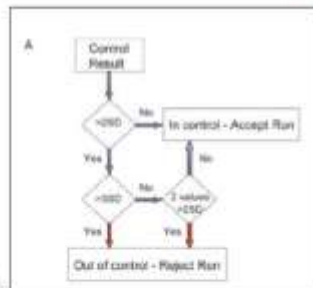


### GQR-LMC

Groupe québécois de recherche sur la leucémie myéloïde chronique  
En collaboration avec l'AMPOQ

## Implantation d'un test maison de quantification de BCR-ABL: contrôles et indicateurs de qualité

- ❑ Contrôles préparés en grande quantité et congelés en aliquotes à usage unique.
- ❑ Résultats des contrôles mis en graphique Levey-Jennings et utilisés pour l'application de règles de Westgard.



Adapté de Hughes and Bradford in Myeloproliferative Disorders chapitre 3 Springer Verlag 2008

### GQR-LMC

Groupe québécois de recherche sur la leucémie myéloïde chronique  
En collaboration avec l'AMPOQ

## Implantation d'un test maison de quantification de BCR-ABL dans la routine du laboratoire

Sommaire du test en vigueur au *CHA*:

- ▣ Rétro-transcription
  - Rétro-transcription en duplicata d'environ 1 µg d'ARN total (rxn 20 µl)
    - = Préparation 30 min., incubation 75 min.
- ▣ PCR en temps réel
  - Préparation des mélanges maitres à PCR pour l'amplification de BCR-ABL et BCR
  - Mélange en plaque 96 puits de 5µl d'ADNc avec 20µl de mélange d'amplification
  - Amplification
    - = Préparation 30 min., amplification 120 minutes
- ▣ Analyse des résultats et sortie des rapports
  - = 90 minutes pour 12 patients

**GQR-LMC**

Service spécialisé de recherche sur la leucémie myéloïde chronique  
En collaboration avec l'AMBO

## Implantation d'un test maison de quantification de BCR-ABL dans la routine du laboratoire (HMR)

	BCR-ABL						BCR					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std 10 <sup>6</sup>	Std 10 <sup>6</sup>	Std 10 <sup>6</sup>	Pat1	Pat1	Pat9	Std 10 <sup>6</sup>	Std 10 <sup>6</sup>	Std 10 <sup>6</sup>	Pat1	Pat1	Pat9
B	Std 10 <sup>7</sup>	Std 10 <sup>7</sup>	Std 10 <sup>8</sup>	Pat2	Pat2	Pat9	Std 10 <sup>5</sup>	Std 10 <sup>7</sup>	Std 10 <sup>8</sup>	Pat2	Pat2	Pat9
C	Std 10 <sup>4</sup>	Std 10 <sup>4</sup>	Std 10 <sup>4</sup>	Pat3	Pat3	Pat10	Std 10 <sup>4</sup>	Std 10 <sup>4</sup>	Std 10 <sup>4</sup>	Pat3	Pat3	Pat10
D	Std 10 <sup>5</sup>	Std 10 <sup>5</sup>	Std 10 <sup>5</sup>	Pat4	Pat4	Pat10	Std 10 <sup>5</sup>	Std 10 <sup>5</sup>	Std 10 <sup>5</sup>	Pat4	Pat4	Pat10
E	Std 10 <sup>5</sup>	Std 10 <sup>5</sup>	Std 10 <sup>5</sup>	Pat5	Pat5	Pat11	Std 10 <sup>5</sup>	Std 10 <sup>5</sup>	Std 10 <sup>5</sup>	Pat5	Pat5	Pat11
F	Std 10 <sup>5</sup>	Std 10 <sup>5</sup>	Std 10 <sup>5</sup>	Pat6	Pat6	Pat11	Std 10 <sup>5</sup>	Std 10 <sup>5</sup>	Std 10 <sup>5</sup>	Pat6	Pat6	Pat11
G	Ctl+ 10 <sup>-5</sup>	Ctl+ 10 <sup>-5</sup>	H <sub>2</sub> O RT	Pat7	Pat7	H <sub>2</sub> O	Ctl+ 10 <sup>-5</sup>	Ctl+ 10 <sup>-5</sup>	H <sub>2</sub> O RT	Pat7	Pat7	H <sub>2</sub> O
H	Ctl-	Ctl-	H <sub>2</sub> O RT	Pat8	Pat8	H <sub>2</sub> O	Ctl-	Ctl-	H <sub>2</sub> O RT	Pat8	Pat8	H <sub>2</sub> O

**GQR-LMC**

Service spécialisé de recherche sur la leucémie myéloïde chronique  
En collaboration avec l'AMBO

## Implantation d'un test maison de quantification de BCR-ABL dans la routine du laboratoire (CHA)

Liste de travail pour la quantification relative de l'ARNm de BCR-ABL

Analyse XYZ

Date: 2012-06-07

Fait par: EW

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	WGA ADN 1	Patients ADN 1	Patients ADN 17	Patients ADN 23			WGA ADN 1	Patients ADN 1	Patients ADN 17	Patients ADN 23		
<b>B</b>	WGA ADN 2	Patients ADN 19	Patients ADN 26	Patients ADN 26			WGA ADN 2	Patients ADN 19	Patients ADN 26	Patients ADN 26		
<b>C</b>	WGA ADN 3	Patients ADN 11	Patients ADN 14	Patients ADN 27			WGA ADN 3	Patients ADN 11	Patients ADN 14	Patients ADN 27		
<b>D</b>	WGA ADN 4	Patients ADN 12	Patients ADN 20	Patients ADN 29			WGA ADN 4	Patients ADN 12	Patients ADN 20	Patients ADN 29		
<b>E</b>	WGA ADN 5	Patients ADN 13	Patients ADN 21	Patients ADN 24			WGA ADN 5	Patients ADN 13	Patients ADN 21	Patients ADN 24		
<b>F</b>	WGA ADN 6	Patients ADN 14	Patients ADN 22	Patients ADN 25			WGA ADN 6	Patients ADN 14	Patients ADN 22	Patients ADN 25		
<b>G</b>	WGA ADN 7	Patients ADN 15	Patients ADN 23	Patients ADN 30		LABOR- [à confirmer]	WGA ADN 7	Patients ADN 15	Patients ADN 23	Patients ADN 30		LABOR- [à confirmer]
<b>H</b>	WGA ADN 8	Patients ADN 16	Patients ADN 24	Patients ADN 32		LABOR- [à confirmer]	WGA ADN 8	Patients ADN 16	Patients ADN 24	Patients ADN 32		LABOR- [à confirmer]

Rangées 1-6: Mélange BCR-ABL  
Rangées 7-12: Mélange BCR

Date de préparation des contrôles High, MMR et NEG: \_\_\_\_\_  
Date de préparation des calibrateurs: \_\_\_\_\_

### GQR-LMC

Groupe québécois de recherche sur la leucémie myéloïde chronique  
En collaboration avec l'AMPOQ

## Implantation d'un test maison de quantification de BCR-ABL dans la routine du laboratoire

### Sommaire du test en vigueur par TaqMan®:

- ☐ Sensibilité:
  - 4.5 log de réduction p/r au niveau de BCR-ABL au diagnostic d'une LMC (5 log dans plusieurs cas)
  - Encore un peu moins sensible qu'une PCR imbriquée
- ☐ Variabilité inter-essai:
  - Moindre qu'avec la trousse commerciale
  - Variabilité des contrôles (CHA):
    - Contrôle HIGH:  $\%_{(BCR-ABL/BCR)} = 88\%$  ( $IC_{95\%} = 135\%-55\%$ )
    - Contrôle MMR:  $\%_{(BCR-ABL/BCR)} = 0.033\%$  ( $IC_{95\%} = 0.04\%-0.027\%$ )
- ☐ Coûts:
  - Diminution du temps technique
  - Diminution des coûts de réactifs
  - Par patient testé (RT-PCR seulement):
    - Essai maison = 19,50\$
    - Essai commercial = 88,00\$

### GQR-LMC

Groupe québécois de recherche sur la leucémie myéloïde chronique  
En collaboration avec l'AMPOQ

## Implantation d'un test maison de quantification de BCR-ABL dans la routine du laboratoire

### Avantages

- ☐ Sensibilité accrue ( $\sim 4.5$  log)
- ☐ Économie en réactifs
  - 30 000\$/année au CHA
  - 90 000\$/ année à HMR
- ☐ Possibilité d'analyser plus de patients par test
- ☐ Moins de variations inter-lot
- ☐ Possibilité d'optimisation continue
- ☐ Adaptabilité aux changements d'équipement du laboratoire

### Inconvénients

- ☐ Gestion de stock de plusieurs réactifs
- ☐ Traçabilité des réactifs plus lourde à gérer
- ☐ Préparation et suivi des contrôles
- ☐ Préparation des points de courbes standards

**GQR – LMC**

Groupe québécois de recherche sur la leucémie myéloïde chronique  
En collaboration avec l'AMPO

## Conclusions

- ☐ Nous avons mis en place un algorithme de travail efficace pour la quantification des transcrits BCR-ABL, tant au diagnostic qu'au suivi des patients atteints de LMC.
- ☐ La PCR multiplexe permet de diagnostiquer de nouveaux patients et d'identifier les différents points de cassure alors que la PCR en temps réel permet la quantification des transcrits.
- ☐ Le développement d'un essai maison comporte plusieurs avantages sur une trousse commerciale (coût et adaptabilité)
- ☐ L'uniformisation de la méthodologie entre les différents laboratoires diagnostiques est souhaitable.
- ☐ À surveiller: l'utilisation des nouvelles approches de PCR digitale pour le suivi de BCR-ABL et autres suivis de maladie résiduelle minimale.

**GQR – LMC**

Groupe québécois de recherche sur la leucémie myéloïde chronique  
En collaboration avec l'AMPO