

# 转换国际标准的BCR-ABL(P210)转录本水平的转换系数多中心再确认研究

秦亚溱 马道新 王云贵 王丽丽 王玥 刘生伟 陆小军 李小青  
岑建农 肖敏 林振兴 耿素霞 梁超 程辉 韩聪 韩薇 黄晓军

**【摘要】** 目的 再确认已获得的用于转换慢性髓性白血病国际标准的BCR-ABL(P210)转录本水平(BCR-ABL<sup>IS</sup>)的转换系数(CF)的有效性。方法 北京大学人民医院(简称PKUPH)统一制备用于再确认15家单位9或18个月之前已获得的CF的比对样品,即用BCR-ABL阴性患者骨髓或外周血有核细胞稀释BCR-ABL(P210)阳性细胞制备出相同16套、每套24种不同BCR-ABL水平的样本,加入TRIzol中。15家单位分别检测1套,采用GraphPad Prism 5.0软件对其与PKUPH的BCR-ABL<sup>IS</sup>检测值分别进行Bland-Altman一致性分析。对于未达到再确认标准的单位,去除结果明显偏离的样本直至其检测值与PKUPH的BCR-ABL<sup>IS</sup>之间的回归方程相关系数>0.98,来计算新的CF。结果 10家单位达到标准(偏倚介于±1.4倍,且95%可信区间介于±6.0倍),说明原有的CF依然准确,可以继续有效转换BCR-ABL<sup>IS</sup>。5家未达到标准的单位通过重新计算得出新的CF,分别是原有CF的1.8~6.3倍。结论 通过室间样本比对的CF再确认过程既检验了原有CF是否依然有效,又使CF不再有效的单位获得新的适用于当前的CF,保持了BCR-ABL<sup>IS</sup>应用的准确性和连续性。

**【关键词】** 融合蛋白质类, bcr-abl; 实时聚合酶链反应; 转换系数; 再确认

**A multicenter study on the revalidation of validated conversion factor for the conversion of BCR-ABL (P210) transcript levels to the international scale in chronic myeloid leukemia** Qin Yazhen\*, Ma Daoxin, Wang Yungui, Wang Lili, Wang Yue, Liu Shengwei, Lu Xiaojun, Li Xiaoqing, Cen Jiannong, Xiao Min, Lin Zhenxing, Geng Suxia, Liang Chao, Cheng Hui, Han Cong, Han Wei, Huang Xiaojun\*. \*Peking University People's Hospital, Peking University Institute of Hematology, Beijing 100044, China  
Corresponding author: Huang Xiaojun, Email: huangxiaojun@bjmu.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To revalidate the conversion factor (CF) for the conversion of BCR-ABL (P210) transcript levels to the international scale (BCR-ABL<sup>IS</sup>) in chronic myeloid leukemia (CML) which validated before. **Methods** Peking University People's Hospital (PKUPH) prepared the exchange samples for revalidation of CFs of 15 laboratories which validated nine or eighteen months ago. The fresh BCR-ABL (P210) (+) bone marrow or peripheral blood nucleated cells were diluted with BCR-ABL (P210) (-) cells to achieve different BCR-ABL levels, totally 16 sets and 24 samples per set were prepared. TRIzol reagent was added in each tube. Each laboratory tested BCR-ABL transcript levels of one set of samples. Agreement between BCR-ABL<sup>IS</sup> of each laboratory and PKUPH was assessed by the Bland-Altman method. For laboratories which did not meet the criteria of revalidation, linear regression equation was derived after the samples with maximum BCR-ABL deviation were removed until  $R^2 > 0.98$ , then new CF was calculated. **Results** 10 laboratories met the revalidation criteria with both bias within ±1.4 fold and 95% limits of agreement within ±6 folds, and their CFs still could be used for accurately conversion of BCR-ABL<sup>IS</sup>. New CFs were recalculated as of 1.8–6.3 folds of their previous CFs in 5 laboratories not met

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.10.002

基金项目:北京市科技计划(Z14110000214011)

作者单位:100044 北京大学人民医院、北京大学血液病研究所(秦亚溱、黄晓军);山东大学齐鲁医院(马道新);浙江大学附属第一医院(王云贵);解放军总医院(王丽丽);中国医科大学附属第一医院(王玥);哈尔滨血液病肿瘤研究所(刘生伟);四川大学华西医院(陆小军);武汉康圣达医学检验所/武汉协和医院干细胞中心(李小青);苏州大学附属第一医院(岑建农);华中科技大学同济医学院附属同济医院(肖敏);福建医科大学附属协和医院(林振兴);广东省人民医院(耿素霞);北京海思特医学检验所(梁超);第二军医大学附属长海医院(程辉);中国医学科学院、北京协和医学院血液学研究所、血液病医院(韩聪);吉林大学第一医院(韩薇)

通信作者:黄晓军,Email:huangxiaojun@bjmu.edu.cn

the criteria. **Conclusion** Revalidation of CF by sample exchange among laboratories was necessary for accurate and continuous application of BCR-ABL<sup>IS</sup>, which not only tested the validity of CF acquired before but also calculated new available CFs for those with invalid CFs.

**【Key words】** Fusion proteins, bcr-abl; Real-time polymerase chain reaction; Conversion factor; Revalidation

伊马替尼等酪氨酸激酶抑制剂(TKI)当前已用于一线治疗慢性髓性白血病(CML)<sup>[1-2]</sup>。实时定量PCR技术(RQ-PCR)检测的BCR-ABL(P210)转录本水平能准确而敏感地反映肿瘤负荷,成为疗效评估的重要指标。通过转换系数(CF)换算的国际标准化的BCR-ABL(BCR-ABL<sup>IS</sup>)实现了不同实验室检测值可比和意义明确<sup>[3]</sup>。有效CF通过与参比实验室两步交换样品比对得出<sup>[4-5]</sup>,需要注意的是该CF仅仅能反映比对这段时间的检测情况,为了保证疗效评估准确,BCR-ABL转录本水平的检测必须持续稳定,这一点需要通过室内质控样品的持续监测以及室间样本比对进行CF再确认来实现。2014年12月,北京大学人民医院对国内15家已获得有效CF的单位进行了CF的再确认工作。

### 材料和方法

1. 参与单位:共15家,其中6家和9家单位分别在2013年6月及2014年3月获得有效CF,距离此次CF再确认分别为18和9个月<sup>[6-7]</sup>。

2. 用于CF再确认的样品制备及派发:由北京大学人民医院负责制备并派发样品。采用CF确认相同的方法<sup>[7]</sup>,即用新鲜的临床送检RQ-PCR剩余待废弃的BCR-ABL阴性骨髓或外周血有核细胞以不同倍数稀释BCR-ABL(P210)阳性细胞,先后制备出24种不同BCR-ABL转录本水平比对样本,每个样本各制备16份平行样本,每份样本细胞数为 $1 \times 10^7$ 。各加入1 ml TRIzol后彻底吹吸,冻存于 $-70^\circ\text{C}$ 。北京大学人民医院检测其中1套,另15套各24个样本干冰冷冻快递至各家单位。

3. 提取RNA、逆转录及检测BCR-ABL(P210)转录本:各家单位分别采用当前临床检测实际应用的实验方法进行RNA提取、逆转录及BCR-ABL(P210)转录本水平的检测。为减少偶然性,真实反映BCR-ABL检测水平,建议24份样本分散于3个月中检测,并且做平行管或重复检测。

4. CF再确认的结果分析及统计学分析:首先将每家单位24份样品检测结果 $\times$ 各自已经获得的有效CF转换为BCR-ABL<sup>IS</sup>。然后采用GraphPad Prism

5.0软件对其与北京大学人民医院的BCR-ABL<sup>IS</sup>检测值分别进行Bland-Altman一致性分析,分析指标包括偏倚程度和95%可信区间<sup>[7]</sup>。

5. CF的再计算和再确认:对于未达到再确认标准的单位根据这些样本结果重新计算CF。将其与北京大学人民医院的BCR-ABL<sup>IS</sup>检测值通过以下回归方程进行相关性分析: $\lg y = (\text{斜率} \times \lg \text{MMR}^{\text{IS}}) + \text{纵截距}$ ,如果相关系数 $< 0.98$ ,去除这些单位的检测结果中偏离北京大学人民医院BCR-ABL<sup>IS</sup>最大的样本,直至方程的相关系数 $> 0.98$ 。根据剩余样本的检测值与北京大学人民医院BCR-ABL<sup>IS</sup>之间生成的回归方程计算CF,其中 $\text{MMR}^{\text{IS}} = 0.1$ , $\text{CF} = \text{MMR}^{\text{IS}} / y$ <sup>[6]</sup>。利用新的CF转换的检测值与北京大学人民医院的BCR-ABL<sup>IS</sup>检测值再次进行Bland-Altman一致性分析,从而进行新的CF的再确认。

### 结 果

1. 比对样本的BCR-ABL<sup>IS</sup>:此次比对的24份样本BCR-ABL<sup>IS</sup>值分布如下:为0的1份,0.1%~1.0% 13份(0.10%、0.10%、0.13%、0.14%、0.15%、0.22%、0.22%、0.25%、0.28%、0.29%、0.75%、0.77%和0.95%),1.0%~10.0% 6份(2.1%、3.6%、3.7%、5.2%、5.9%和8.4%), $> 10.0\%$  4份(12.1%、17.5%、18.4%和18.8%)。

2. 比对样本检测定性结果:比对样本中的1份BCR-ABL(-)样本,15家单位检测值均为0。其余23份BCR-ABL(+)样本,各家均能检测出BCR-ABL转录本。

3. 比对样本CF再确认的统计学分析:CF再确认的通过标准沿用CF确认的标准,即偏倚在 $\pm 1.4$ 倍以内并且95%可信区间介于 $\pm 6$ 倍。如表1所示,15家单位中10家(66.7%)达到以上标准,偏倚均介于 $\pm 1.3$ 倍,95%可信区间均介于 $-4.0 \sim 3.8$ 倍,说明这些单位之前获得的CF依然有效,可以继续用于临床有效转换BCR-ABL<sup>IS</sup>。另外5家单位未能达到以上标准(表2),偏倚均超过1.4倍,其中3家的95%可信区间亦在 $\pm 6$ 倍之外,因此,原有CF不能继续用

于转换BCR-ABL<sup>IS</sup>。为了满足相关系数>0.98的条件,这5家单位分别去除了3~9份偏离BCR-ABL<sup>IS</sup>最大的样本,然后根据剩余标本与北京大学人民医院BCR-ABL<sup>IS</sup>之间的回归曲线重新计算CF,如表2所示,新CF是各自原有CF的1.8~6.3倍。随后使用新的CF再一次对这5家单位该批样本进行Bland-Altman一致性分析,其中3家单位使用新计算的CF再确认符合标准,但仍有1家结果偏倚过大(C15)、1家95%可信区间过大(C12)。

表1 达到转换系数(CF)再确认标准的10家单位统计学分析结果

单位编号	原有CF	偏倚(倍)	95%可信区间(倍)
C1	0.38	-1.0	-2.6~2.6
C2	0.36	-1.1	-1.9~1.7
C3	0.62	1.1	-2.4~2.6
C4	0.68	-1.1	-3.2~3.0
C5	0.50	-1.1	-4.0~3.8
C6	0.61	-1.2	-2.4~2.1
C7	0.52	-1.2	-2.0~1.6
C8	0.17	-1.3	-2.1~1.5
C9	0.86	-1.2	-2.3~1.9
C10	0.86	-1.3	-2.4~1.8

## 讨 论

伊马替尼等TKI的应用使CML从致死性疾病转变为慢性病甚至获得无治疗缓解<sup>[1-2,8]</sup>,因此CML患者需要从治疗开始后长期定期监测BCR-ABL(P210)转录本水平,以评估当前疗效、预测长期疗效并预示耐药和疾病进展,从而指导临床尽早采取措施。而该项指标正确发挥作用的前提是其持续准确而稳定。

各实验室的BCR-ABL检测值通过自身特异的CF转换成BCR-ABL<sup>IS</sup>从而具有明确的临床意

义<sup>[3]</sup>。有效CF通过计算和确认CF的两批样本比来获得<sup>[4-5]</sup>,而有效CF的获得仅仅表明这两批样本比对期间检测是稳定而准确的。随后,需要通过至少高拷贝和低拷贝两个室内质控样品持续自身监测检测的稳定性,同时还需要通过室间样本比对进行CF的再确认。本次再确认只有三分之二的单位达到确认标准,Müller等<sup>[9]</sup>对欧洲实验室的CF进行再确认时的合格率仅为40%,因此CF获得后并不是一直准确有效,之后定期再确认是必要的。

CF的再确认与确认通过标准相同,均包括偏倚和95%的可信区间两项指标。主要试剂和仪器等的改变会导致偏倚过高,CF值发生漂移。操作及试剂配制等方面的问题会导致95%可信区间过大<sup>[4]</sup>。本次通过再确认的单位不仅偏倚合格,而且95%可信区间均很小,达到了Branford等<sup>[4]</sup>报道的确认通过标准(±5倍之间),说明这些单位目前无论是检测过程的主要因素还是操作本身都具有了很好的稳定性。而未通过的单位有的是检测主要影响因素发生了变化,如用于制作标准曲线的质粒标准品更换或者仪器维修等,有的没有觉察到检测方案的明显变化但CF依然发生较大偏倚。Branford等<sup>[4]</sup>及Müller等<sup>[5]</sup>均报道CF确认未通过的实验室往往是检测程序的主要组成发生了改变,但是也有的实验室未发生重要变化但是CF发生较大的偏离。这些事实均说明CF需要常规定期确认以保证其持续准确。

关于检测程序未发生明显变化的实验室CF再确认的频率尚不明确,Müller等<sup>[5]</sup>的建议是每2年1次。实际上这个频率确实较难确定,因为理论上检测程序所有方面不变,CF不应该变化,偏倚还是说明有因素变化了只是没有明确感觉到,另外,RQ-PCR整个实验程序涉及的因素较多,试剂不可能一成不变,仪器会有老化的问题。因此,室内质控品的持续监测和室间定期比对进行CF的再确认

表2 未达到转换系数(CF)再确认标准的5家单位统计学结果及新计算CF分析结果

单位编号	原有CF	原有CF偏倚(倍)	原有CF的95%可信区间(倍)	新计算CF	新计算CF偏倚(倍)	新计算CF的95%可信区间(倍)
C11	0.95	-2.4	-3.1~0.35	2.10	-1.1	-1.8~1.7
C12	0.74	-2.2	-10.2~7.7	1.30	-1.3	-9.2~8.7
C13	0.41	-2.3	-3.0~0.47	0.96	1.0	-1.7~1.8
C14	0.55	-3.1	-5.5~1.4	2.10	1.2	-3.3~3.7
C15	0.19	-3.9	-7.7~1.8	1.20	1.6	-4.4~5.1



都是必要的。

国际上还没有关于如何处理未通过再确认的单位 CF 的报道及建议。我们则利用这批样本为这些单位重新计算了 CF。为了使 CF 准确,我们采用了欧洲计算 CF 时对回归曲线的要求的原则,即这些使用的样本检测值与北京大学人民医院 BCR-ABL<sup>IS</sup> 之间相关系数 >0.98<sup>[5]</sup>,为此去除那些明显偏离的样本。结果显示,新计算出的 CF 与原有 CF 明显不同。我们进一步对新计算的 CF 用这批样本来确认,发现 3 家均符合标准,另外 2 家依然不满意,说明这 2 家的这批样本内部存在较大偏差,为了使他们的相关系数符合要求,需要去除最多 9 份 (39%) 的样本就是一个体现,因此最终再确认结果不满意是可以理解的。按照首次 CF 的获得程序,重新计算的 CF 还需要用新的一批样本做再确认后才能使用,尤其是未通过说明检测存在不稳定性,因此随后的再确认还需要进行。不过为了保证 BCR-ABL<sup>IS</sup> 临床应用的连续性,符合同时再确认标准的 3 家单位当前可以使用新计算的 CF。对于未达到标准的 2 家单位,可以认为计算 CF 这一步没有通过,即当前没有 CF 可用,他们需从内部寻找原因,自身 BCR-ABL 的检测程序还需要优化,然后再开始计算 CF 的过程。

我们依照国际上的报道,获得及再确认 CF 的样本均为接近主要分子学反应水平以及高于该水平的样本。随着伊马替尼的长期应用以及新一代 TKI 的研发,CML 患者获得深层次的分子学反应成为普遍现象,相应地对 BCR-ABL 检测敏感性及准确性提出更高要求,这成为国内 BCR-ABL 定量检测标准化的新目标。

志谢:感谢北京诺华制药有限公司的大力协助

## 参考文献

- [1] 中华医学会血液学分会.中国慢性髓性白血病诊断与治疗指南(2013年版)[J].中华血液学杂志,2013,34(5):464-470.
- [2] Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013[J].Blood, 2013,122(6):872-884.
- [3] Hughes T, Deininger M, Hochhaus A, et al. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results [J]. Blood, 2006, 108(1): 28-37.
- [4] Branford S, Fletcher L, Cross NC, et al. Desirable performance characteristics for BCR-ABL measurement on an international reporting scale to allow consistent interpretation of individual patient response and comparison of response rates between clinical trials[J]. Blood, 2008, 112(8): 3330-3338.
- [5] Müller MC, Cross NC, Erben P, et al. Harmonization of molecular monitoring of CML therapy in Europe[J]. Leukemia, 2009, 23(11): 1957-1963.
- [6] 秦亚涛,程辉,岑建农,等.定量检测 bcr-abl(P210)转录本水平多中心比对研究[J].中华血液学杂志,2013,34(2):104-108.
- [7] 秦亚涛,林振兴,岑建农,等.用于转换国际标准的BCR-ABL(P210)转录本水平的转换系数多中心确认研究[J].中华血液学杂志,2014,35(2):134-137.
- [8] Mauro MJ. Goals for chronic myeloid leukemia TK inhibitor treatment: how little disease is too much? [J]. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2014, 2014(1):234-239.
- [9] Müller MC, Munjal U, Erben P, et al. Stability of conversion factors for BCR-ABL monitoring-implications for the frequency of validation rounds [J]. Blood (ASH Annual Meeting Abstracts), 2010, 116: Abstract 893.

(收稿日期:2015-05-03)

(本文编辑:王叶青)

·读者·作者·编者·

## 关于非法网站冒用《中华血液学杂志》名义进行征稿的特别提醒

近期我们发现一些网站冒用《中华血液学杂志》名义征稿,并承诺“职称论文权威快速代发”。为此,本刊特别提醒各位作者,向《中华血液学杂志》投稿,一定要登录中华医学会官方网站首页(<http://www.cma.org.cn/>),进入“业务中心”,在“杂志社远程稿件管理系统”中投稿,或通过本刊官方网站(<http://www.hematoline.com>)进行投稿,以免造成不必要的损失。本刊编辑部联系电话:022-27304167。

本刊编辑部