

APPLICAZIONE DELLA DROPLET DIGITAL PCR PER LA QUANTIFICAZIONE DELLA MALATTIA RESIDUA MINIMA NELLA LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA PEDIATRICA

Mimma Campeggio¹, Luca Trentin¹, Sheila Camnasio¹, Emanuela Giarin¹, Simona Songia², Gianni Cazzaniga²,
Giuseppe Basso¹, Federica Lovisa¹

¹ Clinica di Oncoematologia Pediatrica, Dipartimento Salute Donna e Bambino, Università di Padova, Padova
² Centro Ricerca M. Tettamanti, Ospedale San Gerardo, Università di Milano-Bicocca, Monza

INTRODUZIONE

La real-time PCR quantitativa (RQ-PCR) viene attualmente utilizzata per la quantificazione relativa della Malattia Residua Minima (MRM) nei pazienti pediatrici affetti da Leucemia Linfoblastica Acuta (LLA).

Il recente sviluppo della Droplet Digital PCR (ddPCR) per la quantificazione assoluta (Fig.1) potrebbe consentire di caratterizzare meglio i pazienti attualmente definiti positivi non quantificabili (NQ) in RQ-PCR.

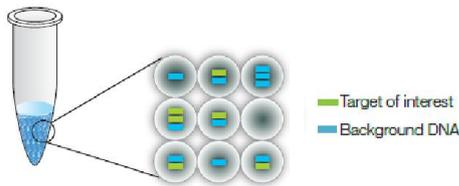


Fig.1 In ddPCR, un singolo campione di PCR viene frazionato in 20.000 droplets, consentendo una quantifica assoluta del target, senza la necessità di costruire una curva standard.

PAZIENTI E METODI

La MRM è stata analizzata mediante ddPCR in 25 pazienti pediatrici affetti da LLA sottoposti a Trapianto di Cellule Staminali Ematopoietiche (TCSE). Di questi, 2/25 erano risultati positivi quantificabili in RQ-PCR, mentre 23/25 erano positivi non quantificabili, 8/23 per la presenza di amplificazione aspecifica e 15/23 per non-riproducibilità tra i replicati.

Gli esperimenti di ddPCR sugli aspirati midollari raccolti al time-point del pre-trapianto sono stati condotti utilizzando le stesse sonde a marcatura FAM usate in RQ-PCR, oltre agli stessi primer paziente-specifici. In aggiunta, il gene di riferimento albumina è stato analizzato in parallelo nella stessa reazione, utilizzando una sonda con marcatura HEX (Fig.2).

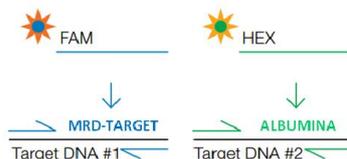


Fig.2 Saggio schematico per l'identificazione dei riarrangiamenti IG e TCR paziente-specifici, attraverso due saggi indipendenti, non competitivi.

RISULTATI

Le due metodiche sono risultate concordi tra loro per entrambi gli aspirati midollari pre-trapianto quantificabili in RQ-PCR, sia in termini di sensibilità che di riproducibilità (Fig.3).

Dei 23 pazienti positivi NQ in RQ-PCR, 7 sono risultati negativi in ddPCR, 13/23 positivi quantificabili, con valori compresi tra 1.1×10^{-6} e 7×10^{-5} blasti/100.000 cellule.

Viceversa, solo 3/23 sono risultati positivi NQ anche in ddPCR, in 2 casi per amplificazione aspecifica e in un caso per non riproducibilità.

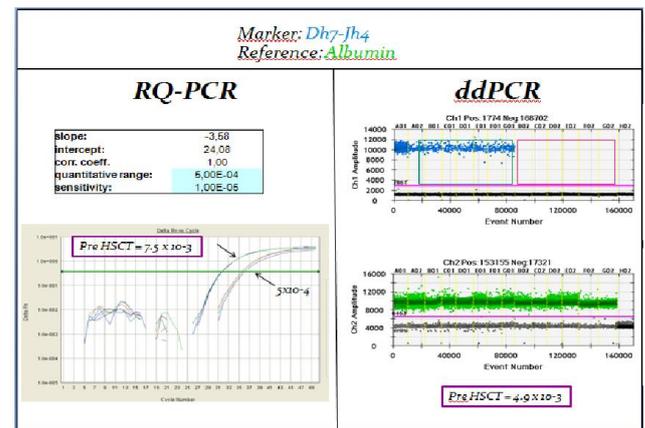


Fig.3 Confronto dei risultati ottenuti in ddPCR con quelli ottenuti in RQ-PCR secondo le linee guida del gruppo di studio EuroMRD.

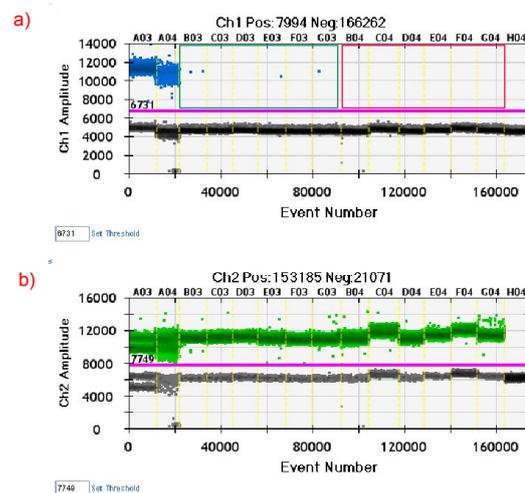


Fig.4 I dati di amplificazione di ciascun esperimento ddPCR sono espressi in 1-D plot come intensità di fluorescenza in relazione al numero di droplets di gene target (a) e del gene housekeeping albumina (b).

Il campione in esempio risulta positivo quantificabile in ddPCR con un numero di droplets positive >3 nel BM pre-trapianto (riquadro verde) e numero di droplets pari a zero nel controllo negativo (riquadro rosso).

CONCLUSIONI

I risultati preliminari ottenuti suggeriscono la buona correlazione tra le due metodiche per la quantificazione dei livelli di MRM nelle LLA pediatriche e l'applicabilità del saggio ddPCR, con un particolare vantaggio per i casi definiti positivi NQ in RQ-PCR.