МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

_____Д.Л.Пиневич

«28» октября 2016 г.

Регистрационный № 067-1016

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИНИМАЛЬНОЙ ОСТАТОЧНОЙ БОЛЕЗНИ У ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии».

АВТОРЫ:

Столярова Е.А., к.м.н. Мигаль Н.В., к.б.н. Мовчан Л.В., к.б.н. Мелешко А.Н., Доронина С.Н., Стеганцева М.В., к.б.н., доцент Белевцев М.В., д.м.н, профессор, член-корреспондент НАН РБ Алейникова О.В.

Минск, 2016

В настоящей инструкции по применению (далее - инструкции) изложены методы оценки количества и сроки определения остаточных опухолевых клеток у пациентов с острым лимфобластным лейкозом. Определение минимальной остаточной болезни позволяет выявить пациентов с минимальным риском развития рецидива, а также пациентов с высоким риском развития рецидива заболевания на этапе первой линии лечения острого лимфобластного лейкоза.

Инструкция предназначена для врачей гематологом, врачей онкологов, врачей лабораторной диагностики организаций здравоохранения, оказывающих квалифицированную медицинскую помощь пациентам с острым лимфобластным лейкозом.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз

В-ОЛЛ- В-клеточный острый лимфобластный лейкоз из ранних предшественников В-клеток

Т-ОЛЛ- Т-клеточный острый лимфобластный лейкоз

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИФТ - иммунофенотипирование

ПЦФ – проточная цитофлуориметрия

РП - ранние предшественники

КМ – костный мозг

ПК- периферическая кровь

МОБ – минимальная остаточная болезнь

ПЦР – полимеразная цепная реакция

RQ-ПЦР-полимеразная цепная реакция в реальном времени

ЭДТА -этилендиаминтетрауксусная кислота

HR-группа высокого риска

CD – кластер дифференцировки

TCR – Т-клеточный рецептор

ПХТ-полихимиотерапия

Ig- иммуноглобулины

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Пациенты детского возраста с острым лимфобластным лейкозом различных групп риска.

1. Для пациентов с В-ОЛЛ при инициальном уровне лейкоцитов в ПК менее $50*10^9$/л и отсутствии химерных онкогенов в лейкозных клетках КМ, МОБ определяется методом ПЦФ на 15-й, 36-й дни индукционной терапии и перед поддерживающей терапией (пункция КМ осуществляется перед последней реиндукцией). В высокой группе риска рецидива исследование МОБ осуществляется описанным в пункте 1 методом исследования перед каждым блоком химиотерапии.

2. Для пациентов с В-ОЛЛ, с инициальным уровнем лейкоцитов в ПК менее $50*10^9$/л при выявлении химерных онкогенов (MLL-AF4, MLL-ENL, MLL-AF6, MLL-AF9, MLL-AF10, TEL-AML1, E2A-PBX1, BCR-ABL1) в лейкозных клетках КМ, МОБ определяется методами ПЦФ, молекулярно-

генетическим методом исследования по уровню экспрессии химерного онкогена на15-й, 36-й дни индукционной терапии, перед поддерживающей терапией (пункция КМ осуществляется перед последней реиндукцией), уровень экспрессии химерного онкогена определяется также после окончания лечения. В высокой группе риска развития рецидива, исследование МОБ осуществляется описанными в пункте 2 методами исследования МОБперед каждым блоком полихимиотерапии.

3. Для пациентов с В-ОЛЛ, с инициальным уровнем лейкоцитов более $50*10^9$/л при отсутствии химерных онкогенов в клетках КМ МОБ определяется методами ПЦФ и молекулярно-генетическим методом RQ-ПЦР по реарранжировкам генов иммуноглобулинов опухолевых клеток на 15-й, 36-й дни индукционной терапии и перед поддерживающей терапией («забор» КМ осуществляется перед последней реиндукцией). У данной группы пациентов МОБ определяется также после окончания лечения методом RQ-ПЦР по реарранжировкам генов иммуноглобулинов опухолевых клеток. В высокой группе риска развития рецидива исследование МОБ осуществляется описанными в пункте 3 методами исследования МОБ перед каждым блоком химиотерапии.

4. Для пациентов с В-ОЛЛ, с инициальным уровнем лейкоцитов более $50*10^9$/л, в клетках КМ которых выявлены химерные онкогены (MLL-AF4, MLL-ENL, MLL-AF6, MLL-AF9, MLL-AF10, TEL-AML1, E2A-PBX1, BCR-ABL1) МОБ определяется ПЦФ на 15-й, 36-й дни индукционной терапии, перед поддерживающей терапией; молекулярно-генетическими методами- RQ-ПЦР по

реарранжировкам генов иммуноглобулинов опухолевых клеток, а также по уровню экспрессии химерного онкогена на 15, 36 дни индукционной терапии, перед поддерживающей терапией (пункция КМ осуществляется перед последней реиндукцией), после окончания лечения. В высокой группе риска развития рецидива исследование МОБ осуществляется описанными в пункте 4 методами исследования МОБперед каждым блоком ПХТ.

5. Для пациентов с Т-ОЛЛ в случае отсутствия химерных онкогенов в клетках КММОБ определяется двумя методами исследования. Методом ПЦФ и RQ-ПЦР по реарранжировкам генов Т клеточного рецептораопухолевых клеток на 15-й, 36-й дни индукционной терапии, перед консолидацией 2; перед поддерживающей терапией. После окончания лечения методом RQ-PCR по реарранжировкам генов Т клеточного рецептораопухолевых клеток. В высокой группе риска рецидива для пациентов с Т-ОЛЛ МОБ определяется описанными в пункте 6 методами исследования перед каждым блоком химиотерапии.

6. Для пациентов с Т-ОЛЛ, в клетках КМ которых выявлены химерные онкогены МОБ определяется методами проточной цитофлуориметрии, RQ-ПЦР по реарранжировкам генов Т клеточного рецептора опухолевых клеток,по уровню экспрессии химерного онкогена на 15-й, 36-й дни индукционной терапии, перед консолидацией 2; перед поддерживающей терапией. Молекулярно-генетическими методами: RQ-ПЦР реарранжировки генов Т клеточного рецептора опухолевых клеток, уровень экспрессии химерного онкогена определяются также после окончания лечения. В высокой группе

риска рецидива Т-ОЛЛ исследование МОБ осуществляется описанными в пункте 6 методами исследования перед каждым блоком химиотерапии.

7. Всем пациентам, имеющим цитогенетические аномалии такие как:гиперплоидия (более 51 хромосомы в цитогенетическим исследовании КМ), гипоплоидия (менее 46 хромосом в цитогенетическим исследовании КМ), MLL-реарранжировки:t(4;11)(q21;q23)(MLL/AF4),t(9;11)(p22;q23)(MLL-MLLT3(AF9)), t(11;19)(q23;p13.3)(MLL-ENL),t(10;11)(p13-15;q14-21)(MLL-MLLT10(AF10)), t(17;19)(q22;p13) (TCF3-HLF), внутрихромосомная амплификация 21 хромосомы (iAMP21), мутации IKZF1, МОБ определяется RQ-ПЦР по реарранжировкам генов тяжелых цепей иммуноглобулинов / Т клеточного рецептора опухолевых клеток на 15-й, 36-й дни индукционной терапии, перед поддерживающей терапией («забор» КМ осуществляется перед последней реиндукцией), после окончания лечения.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Нет

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ, РЕАКТИВОВ И РАСХОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ

МЕДИЦИНСКИЕ ИЗДЕЛИЯ

Аппарат для горизонтального электрофореза в агарозном геле.

Мешалка - Вортекс.

Дозаторы для работы с объемами растворов в диапазоне от 0,1 до 1000 мкл.

Документирующая система для визуализации результатов электрофореза.

Микроскоп флуоресцентный с увеличением до 1000 х.

Морозильник –20^{0}С.

Проточный цитофлуориметр.

Спектрофотометр.

Термомиксер.

Термоциклер (ПЦР-амплификатор) для ПЦР в реальном времени.

Центрифуга с охлаждением на 14000 об/мин.

РЕАКТИВЫ

Taq ДНК полимераза.

Агароза.

Бромистый этидиум.

Вода деионизованная.

ДНК-зонды: 1p/1q, cen7/7q, 13q14/13q34, MYCBA.
Изопропанол.

2х мастер микс для проведения ПЦР в реальном времени с флуоресцентной пробой.

Моноклональные антитела.

Набор для выделения РНК.

Обратная транскриптаза.

Олигонуклеотиды.

Растворы дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (дНТФ).

Рэндом гексамеры.

Фенол-содержаший реагент для выделения РНК, pH 4,0.

Фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (25:24:1).

Фосфатно-солевого буфер (pH 7,2-7,4).

Хлороформ.

Этанол, 70%.

Этанол, 96%.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

«Забор» материала (костный мозг) проводится всем пациентам с острым лимфобластным лейкозом. Исследование включает определение процентного или абсолютного содержания остаточных опухолевых клеток по имеющимся молекулярно-генетическим или иммунологическим маркерам.

Исследование количества остаточных опухолевых клеток проводится следующими методами исследования:

- методом проточной цитофлуориметрии, где в качестве маркера для диагностики МОБ используется аберрантный иммунофенотип лейкозных клеток;
- молекулярно-генетическими методами исследования:

- в качестве маркера для диагностики МОБ используется реарранжировки генов иммуноглобулинов и/или Т-клеточного рецептора лейкозных клеток.

- в качестве молекулярно-генетических маркеров для мониторинга МОБ используются специфичные аберрантные генные перестройки(MLL-AF4,

MLL-ENL, MLL-AF6, MLL-AF9, MLL-AF10, TEL-AML1, SIL-TAL, E2A-PBX1, BCR-ABL1).

Алгоритм и тайминг использования различных методов определения МОБ с целью субмикроскопической оценки ответа на лечение у пациентов с ОЛЛ представлен получающих лечение по протоколу МБ представлен в приложении 1.

ОПИСАНИЕ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОБ

Определение минимальной остаточной болезни методом многопараметрической проточной цитофлуориметрии

Одним методов определения МОБ является метод многопараметрической проточной цитофлуориметрии (ПЦФ) с использованием моноклональных антител (МКА). Данный метод основан на идентификации лейкоз-ассоциированного иммунофенотипа опухолевых клеток на момент диагностики и затем отслеживании клеток с установленными характеристиками на этапах противоопухолевой терапии среди нормальных костномозговых предшественников. Анализ иммунофенотипических характеристик опухолевых клеток, полученных из костного мозга пациентов, выполняется методом многопараметрической ПЦФ. Для этого цельный костный мозг в ходе диагностической пункции набирается в пробирку, содержащую антикоагулянт (калий ЭДТА) в объеме от 2,5 до 5,0 мл. По 100-300 мкл цельного костного мозга (в зависимости от объема и клеточности образца) помещается в сухие пробирки и добавляется

МКА, согласно выбранной панели в количестве, указанном в инструкции по применению фирмы-производителя.

- при **Pro-B ОЛЛ** (CD10- ВП ОЛЛ) определена следующая комбинация МКА, конъюгированных с флуоресцентными метками FITC, PE, PE-Cy5 и PE-Cy7:

1. CD20+CD10 FITC/CD34 PE/CD45 PE-Cy5/CD19 PE-Cy7
2. CD20+CD10 FITC/CD38 PE/CD45 PE-Cy5/CD19 PE-Cy7
3. CD65 FITC/CD34 PE/CD45 PE-Cy5/CD19 PE-Cy7.

Данную комбинацию МКА использовали для оценки ООК при Common-B ОЛЛ и Pre-B ОЛЛ в случаях гетерогенной экспрессии маркера CD10.

- при **Common-B ОЛЛ и Pre-B ОЛЛ** (CD10+ ВП ОЛЛ) определена другая комбинация МКА конъюгированных с флуоресцентными метками FITC, PE, ECD, PE-Cy5 и PE-Cy7 [*Патент на изобретение № 18696*]:

1. Syto16 FITC/CD20 PE/CD45 ECD/CD10 PE-Cy5/CD19 PE-Cy7
2. Syto16 FITC/CD58 PE/CD45 ECD/CD10 PE-Cy5/CD19 PE-Cy7
3. Syto16 FITC/CD34 PE/CD45 ECD/CD10 PE-Cy5/CD19 PE-Cy7
4. Syto16 FITC/CD11a PE/CD45 ECD/CD10 PE-Cy5/CD19 PE-Cy7
5. Syto16 FITC/CD38 PE/CD45 ECD/CD10 PE-Cy5/CD19 PE-Cy7

Далее образцы тщательно перемешиваются и инкубируются в темноте при комнатной температуре в течение 20 минут (согласно инструкции по применению фирмы-производителя). После инкубации проводится лизирование эритроцитов на автоматической станцииBeckmanCoulterTQprep (USA) с использованием оригинальных растворов для лизирования и фиксации.

Учет и анализ результатов проводится на проточномцитофлуориметреNavios (BeckmanCoulter) в программе CXP. Для мониторинга минимальной остаточной болезни учитывается не менее 500 тысяч жизнеспособных, ядросодержащих клеток. Значение уровня МОБ выражается как процентное содержание остаточных опухолевых клеток среди всех жизнеспособных, ядросодержащих клеток. Положительным (МОБ+) считается результат при наличии лейкозных клеток в костном мозге в количестве ≥ 0,01%.

Определение минимальной остаточной болезни методом RQ-PCR по реаранжировкам генов иммуноглобулинов/ Т клеточного рецептора

В основе метода определения МОБ по реаранжировкам генов иммуноглобулинов и Т клеточного рецептора, лежит уникальность строения генов иммуглобулинов и Т-клеточного рецептора. Реаранжировки генов иммуноглобулинов и TCR обладают практически неограниченным разнообразием. Соединительное разнообразие перестроенных генов формируется за счет комбинаторного разнообразия в результате случайного выбора сегментов, участвующих в реаранжировке. Соединительный V-(D)-J-регион генов иммуноглобулинов и TCR обладает уникальной нуклеотидной последовательностью, образующейся за счет неточного воссоединения генных сегментов и добавления N-нуклеотидов. Клон, происходящий из одной первично-трансформированной лейкозной клетки, несет идентичные реарранжировки в этих генетических локусах. Поэтому реарранжировки, выявляемые в лейкозных клетках, являются специфическими молекулярными

опухолевыми маркерами для пациента. Анализ является длительным и разделен на несколько этапов с разными задачами:

Забор аспирата костного мозга (КМ) производится в стандартные гематологические вакутайнеры или стерильные пробирки в объеме не менее 5 мл. В качестве антикоагулянта может использоваться ЭДТА или гепарин.

Выделение фракции мононуклеарных клеток путем стандартной методики наслаивания КМ на гистопак и последующего центрифугирования. Кольцо мононуклеарных клеток, сконцентрированных поверх гистопака, отбирается дозатором или постеровской пипеткой в другую пробирку, отмывается один раз фосфатно-солевым буфером (PBS), после чего супернатант сливается, а осадок клеток ресуспензируется в остаточной жидкости (около 100 мкл), и аликвотируется по пробиркам.

Выделение ДНК. Отмытые в PBS клетки в виде концентрированной суспензии тщательно перемешиваются на вортексе (для разрушения осадка и комков клеток) распределяются в пробирки 2,0 мл в количестве 5-10 млн и объеме суспензии не более 100 мкл. Лизирующий буфер (DB) (100mM NaCl, 10mM TrisHCL, 25 mM EDTA, 0,5% SDS) – добавляется в объеме 100 мкл на 1 млн клеток, обычно 600-800 мкл. Сразу после добавления лизат перемешивается пипетированием (наконечник с широким носиком) и на вортексе. Лизис проводиться при 50-55ºС при перемешивании в течении 1- 12 часов. Центрифугируется 1 мин. при 5 000 оборотов. Большим наконечником отбирается верхняя, водная фаза. Водная фаза переноситься в новую пробирку.

Следующий этап - высаливание ДНК. При добавлении больших концентраций соли белок выпадает в осадок, а ДНК остается в растворе. К

лизату добавляется 8М ацетат аммония в объеме равном половине (можно больше 0,5-1 V) объема лизата. Смесь тщательно перемешивается на вортексе и охлаждают. Центрифугируют при максимальных оборотах минут 10-20 с охлаждением. Отбирается водная фаза с ДНК и переносится в новую пробирку. В дальнейшем осуществляется преципитация и отмывка ДНК. Преципитация (осаждение) ДНК осуществляется равным объемом изопропанола. Смест центрифугируется на 14 000 оборотов 20 мин с охлаждением. Отобрать супернатанттипсом, или вакуумным отсосником.

Растворение и измерение концентрации ДНК. ДНК растворяют в ТЕ буфере (pH = 7,4 – 8,0). Стандартное растворение в 150-200 мкл ТЕ-буфера. ДНК растворяют в термомиксере при 25-40ºС а течение 1 час. После инкубации раствор ДНК нужно хорошенько потрясти на вортексе, и осадить капли центрифугированием 5-10 сек. Измерение выполняется на спектрофотометре NanoDrop. Измерение проводится на трех независимых порциях ДНК, по 2 мкл, которые отбираются из пробирки с ДНК новым типсом, после 4-5 пипетирований для каждого забора. Для каждого измерения выписываться значение концентрации, соотношение A260/A280 и A260/A230. Чистая ДНК имеет значение A260/A280 в диапазоне 1,7-2,0 и A260/A230 в диапазоне 2,0-2,3. Рабочий раствор ДНК должен иметь концентрацию 100-150 нг/мкл.

Скрининг мишеней для МРБ. Представляет собой серию стандартных ПЦР-реакций, выполняемых с диагностической ДНК с установленной панелью праймеров. Полная панель включает в себя 24 отдельные ПЦР реакции. Визуализируются ПЦР-продукты в классическом агарозном геле.

Таблица 1. Реаранжировки генов Ig/TCR и пары праймеров

Ген	Mix	Реаранжировка	Праймеры	ПЦР продукт	Тип ОЛЛ	Протокол
TCRD	mixA	Vδ1-Jδ1	Vδ1-5' : Jδ1/2R_CE	320	Т-ОЛЛ	60°_35cls
	mixA2	Vδ2-Jδ1	Vδ2LF : Jδ1/2R_CE	310	Т-ОЛЛ	60°_35cls
	mixB	Vδ2-Dδ3	Vδ2LF : Dδ3LF	340-350	В- и Т-ОЛЛ	60°_35cls
	mixC	Dδ2-Dδ3	Dδ2s_CE : Dδ3s_CE	286	В- и Т-ОЛЛ	64°_35cls
	mixD	Dδ2-Jδ1	Dδ2s_CE : Jδ1/2R_CE	155-170	В- и Т-ОЛЛ	60°_35cls
	mixE	Vδ2-Jα9, Jα24	Vδ2-5' : Jα9+Jα24	400-450	В- и Т-ОЛЛ	60°_35cls
TCRG	mixF	VγI - Jγ1.1/2.1	VγI-5' : Jγ1.1/2.1-3'	330	В- и Т-ОЛЛ	60°_35cls
	mixF''	VγII,III,IV - Jγ1.1/2.1	VγII,III,IV-5' : Jγ1.1/2.1-3'	320-350	В- и Т-ОЛЛ	60°_35cls
	mixG	VγI - Jγ1.3/2.3	VγI-5' : Jγ1.3/2.3-5'	340	В- и Т-ОЛЛ	60°_35cls
	mixH	VγII - Jγ1.3/2.3	VγII-5' : Jγ1.3/2.3-5'	330	В- и Т-ОЛЛ	60°_35cls
	mixJ	VγIII,IV - Jγ1.3/2.3	VγIII-5' + VγIV-5' : Jγ1.3/2.3-5'	330-360	В- и Т-ОЛЛ	60°_35cls
IgH	VH1	VH1 - JH	VH1LF : JHLF	310-330	В- и Т-ОЛЛ	66°_30cls
	VH2	VH2 - JH	VH2LF : JHLF	310-332	В- и Т-ОЛЛ	66°_30cls
	VH3	VH3 - JH	VH3LF : JHLF	310-335	В- и Т-ОЛЛ	66°_30cls
	VH4	VH4 - JH	VH4LF : JHLF	310-337	В- и Т-ОЛЛ	66°_30cls
	VH5	VH5 - JH	VH5LF : JHLF	310-339	В- и Т-ОЛЛ	66°_30cls
	VH6	VH6 - JH	VH6LF : JHLF	310-342	В- и Т-ОЛЛ	66°_30cls
IgK	mixS	VkI - Jk	VkI-5' : Jk1-4R + Jk5_R	280-295	В-ОЛЛ	64°_35cls
	mixT	VkII - Jk	VkII-5' : Jk1-4R + Jk5_R	280-295	В-ОЛЛ	64°_35cls
	mixU	VkIII - Jk	VkIII-5' : Jk1-4R + Jk5_R	280-295	В-ОЛЛ	64°_35cls
	mixW	VkI - KDE	VkI-5' : KDE-3'	420-450	В-ОЛЛ	64°_35cls
	mixX	VkII - KDE	VkII-5' : KDE-3'	420-450	В-ОЛЛ	64°_35cls
	mixY	VkIII, IV - KDE	VkIII-5' + VkIV-5' : KDE-3'	420-450	В-ОЛЛ	64°_35cls
	mixZ	intron - KDE	intron-5' : KDE-3	570	В-ОЛЛ	64°_35cls

Праймеры для скрининга рекомендуется разводить до концентрации 2,5 пмоль/мкл и аликвотить по 10-20 мкл. При такой концентрации в реакцию вносится 5 мкл каждого праймера.

Условия ПЦР реакции:

60°_35cls	**66°_30cls**	**64°_35cls**
95°C – 30 сек., 60°C – 30 сек., 72°C – 1 мин., } 35 циклов	95°C – 30 сек., 66°C – 30 сек., 72°C – 1 мин., } 30 циклов	95°C – 30 сек., 64°C – 30 сек., 72°C – 1 мин., } 35 циклов
72°C – 5 мин.	72°C – 5 мин.	72°C – 5 мин.
4°C – пауза	4°C – пауза	4°C – пауза

Идентификация мишеней в полиакриламидном геле с использованием гетеродуплексного анализа для идентификации моно- и поликлональных продуктов реакции ПЦР. Электрофорез проводился в 8% - 10% полиакриламидном геле в 0,5% TBE на аппарате для вертикального электрофореза Hoefer (Amersham / GEHealthcare). В результате гетеродуплексного анализа моноклональные ПЦР-продукты сохраняются в виде фрагментов ДНК соответствующего размера (гомодуплексы), а фрагменты поликлонального происхождения образуют полосы более медленно движущихся в геле фрагментов ДНК, обычно образующих характерный мазок.

Секвенирование ПЦР- продуктов. ПЦР-продукты, элюированные из геля, подвергаются ДНК-секвенированию с той же парой праймеров, что использовалась для амплификации в данной конкретной реакции. После реамплификации ПЦР-продукты вновь подвергаются гетеродуплексному анализу в полиакриламидном геле, фрагменты ДНК вырезаются и элюируются.

Результаты секвенирования сохраняются аппаратом ABIPRISM 3130 на компьютере в виде *.ab1 файлов. Первичная обработка выполняется в программе SeqAnalysis 5x. При этом визуально просматриваются сырые данные электрофореза (пики), и оценивается качество сиквенса.

Дальнейшая обработка сиквенса осуществляется специальными программными средствами (http://www.imgt.org, http://www.imgt.org/IMGT_vquest/share/textes/) или вручную с целью: (1) идентифицировать реаранжировку, конкретные генные сегменты входящие в ее состав; (2) идентифицировать соединительный регион и нематричные (N) нуклеотиды. На основании этого затем подбирается пациент-специфическийпраймер.

Подбор и заказ аллель-специфичныхпраймеров. Аллель-специфическийолигонуклеотид подбирается к уникальному соединительному региону перестроенных генов Ig/TCR и используется впоследствии как пациент-специфическийпраймер в измерении МОБ методом RQ-ПЦР. Подбор праймера можно выполнять вручную или с помощью любых программ или он-лайн сервисов для этой задачи, такими как PRIMER3: http://primer3plus.com/web_3.0.0/primer3web_input.htm. Для стандартизации анализа для используемой панели реаранжировок была создана соответствующая панель праймеров и зондов.

Таблица 2 . Комбинации ACO-праймера, консенсусногопраймера ифлуоресцентного зонда для RQ-PCR анализа МОБ

Ген	**Mix**	**Реаранжировка**	**Прямой праймер**	**Обратный праймер**	**Зонд**
TCRD	mixA	Vδ1-Jδ1	ASO-F	Jd1R	Jd1TM
	mixA2	Vδ2-Jδ1	ASO-F	Jd1R	Jd1TM
	mixB	Vδ2-Dδ3	Vd2F	ASO-R	Vd2TM
			ASO-F	Dd3R	Dd3TM
	mixC	Dδ2-Dδ3	ASO-F	Dd3R	Dd3TM
	mixD	Dδ2-Jδ1	ASO-F	Jd1R	Jd1TM
	mixE	Vδ2-Jα9, Jα54	Vd2F	ASO-R	Vd2TM
TCRG	mixF	VγI - Jγ1.1/2.1	ASO-F	JPg1/2R	JPg1/2TM
	mixF’’	VγII,III,IV - Jγ1.1/2.1	ASO-F	JPg1/2R	JPg1/2TM
	mixG	VγI - Jγ1.3/2.3	ASO-F	Jg1/2R	Jg1/2TM
	mixH	VγII - Jγ1.3/2.3	ASO-F	Jg1/2R	Jg1/2TM
	mixJ	VγIII - Jγ1.3/2.3	ASO-F	Jg1/2R	Jg1/2TM
IgH	VH1	VH1 - JH	ASO-F	R-JH1-intron	T-JH1.2.4.5
	VH2	VH2 - JH	ASO-F	R-JH2-intron	T-JH1.2.4.5
	VH3	VH3 - JH	ASO-F	R-JH3-intron	T-JH3
	VH4	VH4 - JH	ASO-F	R-JH4-intron	T-JH1.2.4.5
	VH5	VH5 - JH	ASO-F	R-JH5-intron	T-JH1.2.4.5
	VH6	VH6 - JH	ASO-F	R-JH6-intron	T-JH6
IgK	mixS	VkI - Jk	ASO-F	IGKJ1,2,3,4,5_R	IGKJ1,2,3,4,5_TM
	mixT	VkII - Jk	ASO-F	IGKJ1,2,3,4,5_R	IGKJ1,2,3,4,5_TM
	mixU	VkIII - Jk	ASO-F	IGKJ1,2,3,4,5_R	IGKJ1,2,3,4,5_TM
	mixW	VkI - KDE	ASO-F	kdeR	kdeTM
	mixX	VkII - KDE	ASO-F	kdeR	kdeTM
	mixY	VkIII, IV - KDE	ASO-F	kdeR	kdeTM
	mixZ	intron - KDE	ASO-F	kdeR	kdeTM

Для каждого пациента анализируются все выявленные мишени, выполняется подбор АСО-праймеров, при возможности по 2 на каждую мишень. Праймеры немедленно заказываются для синтеза и доставки в лабораторию.

Проверка специфичности АСО-праймеров. Проводится тестовая реакция RQ-ПЦР, цель которой проверка правильности подбора АСО-праймера с консенсуснымпраймером и зондом, и оценка специфичности АСО-праймера.

Целесообразно использовать для анализа МРБ 2x TaqManUniversalPCRMasterMix (AppliedBiosystems, USA) или иной аналогичный, предназначенный для TaqMan флуоресцентных проб.

Каждая реакция проводится в объеме 20 мкл включая 500 нг каждого праймера, 150 нгTaqMan пробы и 500 нг геномной ДНК.

Для каждого АСО-праймера обязательно выполняется 5 отдельных реакций. Диагностическая (первичная) ДНК пациента амлифицируется в дуплете, поликлональная ДНК донора – в триплете. Параллельно целесообразно проводить еще две реакции с контрольным геном для обоих образцов ДНК. Реакции могут проводится или в плашке, или в оптических пробирках на любом аппарате для RQ-ПЦР. Условия процесса термоциклирования такие: количество циклов – 60, температура отжига – по умолчанию 60°С, но может меняться для каждого АСО-праймера при необходимости от 55°С до 68°С. Остальные условия согласно инструкции набора супермикса. На основании полученных результатов амплификации

принимается решение, какие из АСО-праймеров пригодны и наиболее специфичны для дальнейшего анализа МРБ.

Характеристика мишени и АСО-праймера для каждого пациента отдельно устанавливается по форме амлификационной кривой и значениям начала амплификации Ct для диагностической (D) и поликлональной (P) ДНК. Разница между Ct (P) и Ct (D) обозначается как ΔCt (дельта Ct).

Амплификация диагностической ДНК с АСО-праймером начинается на 18-22 цикле, так же, как и с контрольным геном, и иметь характерную логистическую форму кривой с большим углом восхождения и выходом на плато. А поликлональная ДНК с АСО-праймером не амплифицируется вообще. Такая ситуация называется полная специфичность и позволяет наиболее надежный анализ МРБ. На практике, около половины мишеней не имеют полной специфичности, что может и не быть препятствием для клинически приемлемого анализа. Принято, что критическим уровнем ΔCt является разница ΔCt> 20. АСО-праймеры, показавшие ΔCt< 20, которые не могут быть улучшены повышением температуры, бракуются. На основании полученных результатов амплификации принимается решение, какие из АСО-праймеров пригодны и наиболее специфичны для дальнейшего анализа МРБ. Для каждой мишени, если были заказаны несколько праймеров, выбирается один лучший.

Постановка количественного RQ-PCR анализа МРБ. После того, как идентифицированы мишени, получены и проверены АСО-праймеры, возможно количественное определение МРБ.

Расчет МРБ производится исходя из экспериментальной модели, воспроизводимой при каждом анализе. Модель включает серийные разведения диагностической ДНК и построение калибровочной кривой. При постановке анализа в одной плашке проводится две серии разведения:

1. Для мишени МРБ – диагностическая ДНК разводится в поликлональной ДНК (P-DNA).
2. Для контрольного гена – диагностическая ДНК разводится в воде.

Проводится 5 разведений с шагом в один порядок, от 10^{-1} до 10^{-5}. Рекомендуется выполнять каждое разведение в объеме 50 мкл, 45 мкл воды или P-DNA плюс 5 мкл диагностической ДНК. Постановка реакции RQ-PCR проводится также, как и при тестировании АСО-праймера Параллельно готовится два общих микса с праймерами и пробой – для МРБ мишени с АСО-праймером и для контрольного гена (например, альбумина). Микс раскапывается в заранее запланированную плашку по 15 мкл, и затем вносится ДНК матрица по 5 мкл. Диагностическая ДНК вносится в дуплетах, образцы МРБ – в триплетах, поликлональная ДНК для основного микса – в 6 повторах.

Для количественной оценки МРБ используется метод «стандартной кривой», описанной выше, которая позволяет на основании экспериментальной модели пересчитать уровень амплификации (Ct) измеряемого образца в значение стандартного количества (SQ), которое выражает количество мишени в логарифмическом виде относительно эталонного образца (диагностической ДНК) принятого за 1. После завершения ПЦР прибор автоматически строит стандартную кривую. Для каждого измерения строятся две калибровочные

кривые – одна для мишени МРБ, другая для контрольного гена. Каждая калибровка количественно характеризуется тремя параметрами:

- slope (наклон), или угловой коэффициент. Численно равен ΔCt/ΔSQ или тангенсу угла наклона стандартной кривой по отношению к оси абсцисс. В идеале для десятичной логарифмической шкалы SQ составляет 3,3
- коэффициент корреляции (R). Рассчитывается прибором автоматически как коэффициент Пирсона между разными разведениями. В идеале составляет 1.
- интерсепт (intercept) – точка пересечения стандартной прямой ось ординат, количественно выражается в значении Ct условно (или реально) нулевого уровня разведения (SQ=0), т.е. среднее Ct диагностической ДНК. Должно составлять 18-30.

При генерации отчета в программе запуска RQ-PCR автоматически расчитываются средние значения Ct и SQ для всех образцов.

Окончательно уровень МРБ рассчитывается по формулам:

$$\text{Поправочный коэффициент (K ref)} = \frac{\text{Стандартное количествоДНК (SQ) (followup)}}{\text{Стандартное количество ДНК (SQ) (D-DNA)}}$$

$$\text{Снижение мишени} = \frac{\text{Стандартное количество мишени (SQ) (followup)}}{\text{Стандартное количество мишени (SQ) (D-DNA)}}$$

$$\text{Нормализованное снижение мишени} = \frac{\text{K ref (followup)}}{\text{Снижениемишени (followup)}}$$

$$\text{Уровень МРБ} = \frac{1}{\text{Нормализованное снижение мишени (followup)}}$$

Стандартное количество ДНК и мишени МРБ для первичного образца (диагностической ДНК) автоматически будет принято за 1, если этот образец участвовал в калибровке.

Интерпретация результатов. Результат МРБ оценивается количественно, только если он попадает в количественный диапазон. Иначе уровень МРБ может указываться как интервальный, либо как качественный – «положительное МРБ», «отрицательное МРБ».

Интерпретация результатов анализа основана как на разведениях и стандартной кривой, так и амплификации P-DNA (background). Для правильной оценки МРБ необходимо оценивать два параметра: 1. Количественный диапазон – часть калибровочной кривой, внутри которой МРБ может измеряться количественно точно и воспроизводимо. 2. Чувствительность – минимальное значение МРБ, которое может быть количественно точно измерено.

Результат МРБ оценивается количественно, только если он попадает в количественный диапазон. Иначе уровень МРБ может указываться как интервальный, либо как качественный – «положительное МРБ», «отрицательное МРБ».

Определение минимальной остаточной болезни (МОБ) с использованием ПЦР реальном времени для *TEL-AML1, SIL-TAL, E2A-PBX1* химерных онкогенов

Таблица3. Характеристики праймеров для RQ-PCR

Ген	**EAC1 код**	**Последовательность**	**Место посадки (размер)**
(GUS) [1]	ENF1102	GAAAATATGTGGTTGGAGAGCTCATT	1759 (26)
	ENPr1142	FAM-CCAGCACTCTCGTCGGTGACTGTTCA-BHQ1	1833 (26)
	ENR1162	CCGAGTGAAGATCCCCTTTTTA	1859 (22)
E2A-PBX1 [2]	ENF101	CCAGCCTCATGCACAACCA	E2A, 1436–1454 (19)
	ENPr141	FAM-CCCTCCCTGACCTGTCTCGGCC-BHQ1	E2A, 1481–1502 (22)
	ENR161	GGGCTCCTCGGATACTCAAAA	PBX1, 409–389 (21)
TEL-AML1 [2]	ENF301	CTCTGTCTCCCCGCCTGAA	TEL, 984–1002 (19)
	ENPr341	FAM-TCCCAATGGGCATGGCGTGC-BHQ1	TEL, 1024–1005 (20)
	ENR361	CGGCTCGTGCTGGCAT	AML1, 557–542 (16)
SIL-TAL [2]	ENF601	CGCTCCTACCCTGCAAACA	SIL, 85–103 (19)
	ENPr641	FAM-ACCTCAGCTCCGCGGAAGTTGC-BHQ1	SIL, 105–126 (22)
	ENR664	CCGAGGAAGAGGATGCACA	TAL, 1 148–130 (19)

Протокол ПЦР:

5. Протокол RQ-PCR

50ºC – 2 мин.

95ºC – 10 мин.

95ºC – 15 сек.
60ºC – 1 мин. } 50 циклов

1. Синтез кДНК

2. Приготовление стока праймеров.

Последовательности праймеров заимствованы из статей, приведенных в конце инструкции.

Оригинальные праймеры и зонды, разведенные до концентрации 100 пмоль/мкл, а также заготовленные стоки праймеров для ПЦР в реальном времени должны храниться при -20°С. Технология приготовления стоков описана в таблице

Таблица 4. – Приготовление стока праймеров

	Исходная концентрация (пмоль/мкл)	Конечная концентрация (пмоль/мкл)	Объем (мкл)
Прямой праймер	100	6	6
Обратный праймер	100	6	6
Олигонуклеотидный зонд	100	4	4
Вода			до 100 мкл

3. Постановка RQ-PCR для*TEL-AML1*, *SIL-TAL*, *E2A-PBX1*

Собрать группу пациентов, которым требуется анализ МОБ согласно направлению и которые имеют доступные мишени (*TEL-AML1*, *SIL-TAL*, *E2A-PBX1*). При постановке каждой точки МОБ необходима постановка первичной точки.

Приготовить реакционную смесь (таблица 4). Объем реакционной смеси для каждой отдельной мишени должен включать: количество пациентов на данную мишень (Pn) + 2×отрицательный контроль (NAC+NTC) + стандарты (St) + 1 дополнительная реакция в счет погрешности пипетирования (Ad). NAC (от англ. noamplificationcontrol) представляет собой заведомо отрицательную матрицу, т.е. кДНК, которая не несет химерного транскрипта.NTC (от англ. notemplatecontrol) – это контроль контаминации реакционной смеси. Вместо кДНК в данном случае вносят деионизированную воду. Анализ проводится в дублях для контрольного гена и в триплетах для химерного онкогена.

Таблица 5 – Приготовление реакционной смеси

Реагенты	Объём на 1 реакцию (мкл)
TaqMan2xPCRMasterMix	12,5
Сток праймеров	1,25
Вода	6,25
кДНК (в микс не входит)	5

В качестве контрольного гена используется *GUS*. Для химерных генов *TEL-AML1, SIL-TAL, E2A-PBX1* и для контрольного гена *GUS* предусмотрены коммерческие стандарты для определения абсолютного количества копий генов. Для генов *TEL-AML1, SIL-TAL, E2A-PBX1* диапазон стандартов включает следующие концентрации: 10^1, 10^2, 10^3, 10^5, а для гена *GUS:* 10^3, 10^4, 10^5.

Создать схему раскапывания на специальном бланке. Раскапывать 96-луночную плашку или стрипы: сначала вносится реакционная смесь – 20 мкл, затем кДНК – 5 мкл, в последнюю очередь стандарты – 5 мкл.кДНК тщательно вортексируется и вносится в равном объеме в каждую лунку. Стандарты предварительно выставляют при комнатной температуре для разморозки. Стандарты раскапывают в специально отведенной комнате для предотвращения контаминации ПЦР-боксов и самого помещения диагностической лаборатории.

Когда все образцы и стандарты внесены, необходимо герметично закрыть плашку соответствующими оптическими крышками или пленкой. Осадить плашку центрифугированием в течение минуты. Загрузить плашку в ПЦР-блок CFX96. Открыть программу ПЦР в реальном времени под именем «Bio-RadCFXManager». В данной программе проводится заполнение протокола ПЦР, заполнение данных электронной схемы плашки.

Анализ результатов. Для сравнительного анализа общий**Threshold**выставляется на 0.1 (10^{-1}), а **Baseline**между 3-15 циклом. Сначала визуально оцениваются кривые флюоресценции.

Первым оценивается контрольный ген GUS. Разница показателей Ct образцов в дубле не должна превышать 0,5 (это правило действительно и для всех остальных генов). Показатели Ct контрольного гена должны быть в диапазоне 20-28.0 циклов [2]. При этом количество копий контрольного гена должно быть не менее 1000. Если показатель не укладывается в указанный диапазон, образец не может быть проанализирован. Если одна из лунок в дубле имеет положительное значение, а другая отрицательное – образец не может быть проанализирован.

Положительным считается образец с S-образной амплификацией (логарифмическая шкала) и значением Ct ниже значения CtY-intersept стандартной кривой + один Ct. Ложно отрицательным результат считается, если позитивнаякДНК имеет амплификацию менее чем в 50% лунок (0/2, 0/3, 1/3). Ложно положительным результат считается, если отрицательный образец проходит по крайней мере в 50% лунок (1/2, 2/3, 3/3).

Подсчет МОБ при наличии стандартов для транскриптовTEL-AML1, SIL-TAL, E2A-PBX1.

В данном случае определяющими параметрами являются SQ (StartingQuantity) andSQMean. Подсчет производится по следующей схеме:

SQMean (*TEL-AML1/ SIL-TAL/ E2A-PBX1*) / SQMean (*GUS*)=X

X первичной точки принимается за 100%, % МОБ в последующих точках вычисляется по пропорции:

X (новой точки)*100% / X (первичной точки) = У,

где У = % МОБ от диагноза искомой точки.

Процент МОБ каждой новой точки отсчитывается только от первичной точки или от рецидива. Результат исследования может записываться как в %, так и в логарифмах

Приложение 1

Варианты ОЛЛ	**15-й день индукционной терапии**	**36-й день индукционной терапии**	**Перед консолидацией II(SII), или 99 терапии**	**Перед поддерживающей терапией**	**После окончания лечения**
В-ОЛЛ с лейкоцитозом менее $50*10^9$/л, отсутствуют химерные онкогены *** Наличие указанных**	ПЦФ Реаранжировки генов Ig	ПЦФ Реаранжировки генов Ig	- -	ПЦФ Реаранжировки генов Ig	- Реаранжировки генов Ig

цитогенетическ иханомалий					
В-ОЛЛ с лейкоцитозом менее 50*10^9/л, наличие химерных онкогенов *** Наличие указанных цитогенетическ иханомалий**	ПЦФ химерные онкогены Реаранжиро вки генов Ig	ПЦФ химерные онкогены Реаранжиро вки генов Ig	-	ПЦФ химерные онкогены Реаранжировки генов Ig	химерные онкогены Реаранжиров ки генов Ig
В-ОЛЛ с лейкоцитозом более 50*10^9/л, отсутствуют химерные онкогены ***Наличие указанных цитогенетическ иханомалий**	ПЦФ Реаранжиро вки генов Ig	ПЦФ Реаранжиро вки генов Ig	-	ПЦФ Реаранжировки генов Ig	- Реаранжиров ки генов Ig
В-ОЛЛ, с лейкоцитозом более 50*10^9/л, наличие химерных онкогенов ***Наличие указанных цитогенетическ иханомалий**	ПЦФ химерные онкогены Реаранжиро вки генов Ig	ПЦФ химерные онкогены Реаранжиро вки генов Ig	-	ПЦФ химерные онкогены Реаранжировки генов Ig	химерные онкогены Реаранжиров ки генов Ig
Т-ОЛЛ, отсутствуют химерные онкогены	ПЦФ Реаранжиро вки генов TCR	ПЦФ Реаранжиро вки генов	ПЦФ Реаранжиро вки генов TCR	ПЦФ Реаранжировки генов TCR	- Реаранжиров ки генов TCR
Т-ОЛЛ, наличие химерных онкогенов	ПЦФ химерные онкогены Реаранжиро вки геновTCR	ПЦФ химерные онкогены Реаранжиро вки генов TCR	ПЦФ химерные онкогены Реаранжиро вки генов TCR	ПЦФ химерные онкогены Реаранжировки генов TCR	- химерные онкогены Реаранжиров ки генов TCR

*****Цитогенетические аномалии при которых проводится исследование МОБ методом RQ-PCR по реаранжировкам генов иммуноглобулинов / Т клеточного рецептораопухолевых клеток на гиперплоидия (более 51 хромосомы), гипоплоидия (менее 46 хромосом), MLL-реаранжировки: (4;11)(q21;q23)(MLL/AF4), t(9;11)(p22;q23)(MLL-MLLT3(AF9)), t(11;19)(q23;p13.3)(MLL-ENL), t(10;11)(p13-15;q14-21)(MLL-MLLT10(AF10)), t(17;19)(q22;p13) (TCF3-HLF), внутрихромосомная амплификация 21 хромосомы (iAMP21), мутацииIKZF1.

Возможные ошибки и осложнения: отсутствуют.