

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Ю.Л. Горбич

«26»

05

2025 г.

Регистрационный № 114-1124

МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ОСТРОГО ЛИМФОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА С УЧЕТОМ РЕАРАНЖИРОВКИ ГЕНОВ ТИРОЗИНКИНАЗ И РЕЦЕПТОРОВ ЦИТОКИНОВ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: государственное учреждение
«Республиканский научно-практический центр детской онкологии,
гематологии и иммунологии»

АВТОРЫ: Волочник Е.В., к.б.н. Вшивкова О.С., Капуза Д.Р.,
Адамонис А.З.

Минск, 2024

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В-ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз из В-клеток-предшественников

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

КМ – костный мозг

ПК – периферическая кровь

ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз

BCR::ABL1-подобный – острый лимфобластный лейкоз из В-клеток-предшественников, характеризующийся крайне неблагоприятным прогнозом, отсутствием транслокации и присутствием реаранжировок одного или нескольких генов, определяемы в соответствии с данным методом

FISH – флуоресцентная гибридизация *in situ*

CRLF2 – ген рецептора цитокинов (англ. cytokine receptor-like factor 2)

JAK2 – ген киназы (англ. janus kinase 2)

NTRK3 – ген рецептора цитокинов (англ. neurotrophic receptor tyrosine kinase)

PDGFRB – ген рецептора фактора роста тромбоцитов бета (англ. platelet derived growth factor receptor beta)

ABL1 – ген киназы (англ. ABL proto-oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase)

ABL2 – ген киназы (англ. ABL proto-oncogene 2, non-receptor tyrosine kinase)

CSFR1 – ген рецептора колониестимулирующего фактора 1 (англ. colony stimulating factor 1 receptor)

EPOR – ген рецептора эритропоэтина (англ. erythropoietin receptor)

PAX5 – ген транскрипционного фактора (англ. paired box gene 5)

ZNF384 – ген белка цинкового пальца 384 (англ. zinc finger protein 384)

MEF2D – энхансерный фактор миоцитов 2D (англ. myocyte enhancer factor 2D)

CREBBP – ген CREB-связывающего белка, от англ. CREB-binding protein

A – обозначение голубого флуорохрома в формуле при анализе FISH (лат. - aqua)

F- слитный сигнал двух и более флуорохромов (англ. - fusion)

R – обозначение красного флуорохрома в формуле при анализе FISH (англ. - red)

G – обозначение зеленого флуорохрома в формуле при анализе FISH (англ. - green)

ITS – инсулин-трансферрин-селен

SSC – цитратно-солевой буфер (англ. saline-sodium citrate)

DAPI - раствор для окрашивания нуклеиновых кислот (англ. 4',6-diamidino-2-phenylindole)

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод диагностики острого лимфобластного лейкоза из В-клеток-предшественников (МКБ 10: C91.0) с учетом реаранжировок генов тирозинкиназ и рецепторов цитокинов. Метод может быть использован в рамках оказания медицинской помощи пациентам с острым лимфобластным лейкозом из В-клеток-предшественников.

Настоящая инструкция предназначена для врачей лабораторной диагностики, врачей-гематологов и иных врачей-специалистов, оказывающих медицинскую помощь пациентам с острыми лейкозами.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Впервые диагностированный острый лимфобластный лейкоз из В-клеток-предшественников.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Нет.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ, РЕАКТИВОВ И РАСХОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ

Нестерильные перчатки нитриловые или латексные неопудренные.

Емкость для утилизации отходов и дезсредства.

Штативы для пробирок.

Маркер перманентный.

Пробирки с консервантом (Na-гепарин).

Стерильные пробирки центрифужные полипропиленовые объемом 15 мл, градуированные, с крышкой.

Круглодонные пробирка 12 мл.

Стеклянные пробирки 10 мл с круглым дном.

Стерильные культуральные флаконы объемами 50 мл 25 см².
Стерильные серологические пипетки объемом 5 и 10 мл.
Стерильные пастеровские пипетки.
Дозатор для серологических пипеток.
Дозаторы с переменным объемом до 1000 мкл, до 200 мкл и до 10 мкл.
Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером объемом от 10 до 1000 мкл.
Камера Горяева и покровные стекла.
Предметные стекла 76×26 мм.
Покровные стекла 18×18 и 22×22 мм.
Емкости стеклянные для окраски микропрепаратов с вертикальной установкой (емкость Хеллендаля на 8 стекол и ёмкость Коплина на 5 стекол).
Микроцентрифуга-шейкер.
Водяная баня.
Гибридизатор.
рН-метр.
Аналитические весы.
Центрифуга без охлаждения с относительной центробежной силой 3000 g с адаптером под пробирки объема 15 мл.
Инкубатор с 5% CO₂.
Ламинарный шкаф.
Вытяжной шкаф.
Холодильник +4 °С... +8 °С с морозильной камерой минус 20 °С.
Световой бинокулярный микроскоп лабораторного/профессионального класса с объективами ×20/40/60.
Флуоресцентный микроскоп лабораторного/профессионального класса (общее увеличение минимум ×1000; объективы классом не ниже планахромат ×10/×40/×100 (масляная иммерсия).
Иммерсионное масло свободное от флуоресценции.
Дезинфицирующий раствор (антисептик).

Культуральная питательная среда (для культивирования монукулеарных клеток костного мозга или периферической крови).

Раствор фиколл-урографина с удельной плотностью $\rho = 1,077$ г/мл для дифференциального выделения монукулеарных клеток в градиенте плотности (Histopaque®-1077).

L-глутамин.

Инсулин-трансферрин-селен (100X).

Блокатор митозов – колцемид или колхицин 10 мг/мл в HBSS.

Ледяная уксусная кислота 100%.

Метанол (абсолютный или >99,99%).

Водные растворы этанола (концентрация 70%, 80%, 90%).

Хлорид калия (KCl).

Хлорид натрия (NaCl).

Дистиллированная вода.

Цитратно-солевой раствор (20X).

Раствор детергента NP40 (эфир полиоксиэтилена нонилфенола).

Раствор РНКазы (20 мг/мл).

ДНК-зонды для проведения FISH.

Буферный раствор для разведения ДНК-зондов.

Раствор красителя DAPI (0,1 мкг/мл).

Деионизированная вода.

Резиновый клей.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Суть метода заключается в выявлении реаранжировок генов тирозинкиназ и рецепторов цитокинов (*ABL1*, *ABL2*, *PDGFRB*, *JAK2*, *CRLF2*, *NTRK3*, *CSFR1*, *EPOR*, *CREBBP*), а также генов *PAX5*, *MEF2D* и *ZNF384* для диагностики *BCR::ABL1*-подобного В-ОЛЛ.

Метод анализа перестроек генов для диагностики В-ОЛЛ с использованием флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) включает несколько этапов:

1. Культивирование и фиксация клеток костного мозга (КМ) и/или периферической крови (ПК) (при наличии бластных клеток в ПК)
 - 1.1 Выделение моноклеарных клеток.
 - 1.2 Приготовление культуры клеток.
 - 1.3 Фиксация клеточной культуры.
 - 1.4 Приготовление препаратов клеток.
2. Проведение флуоресцентной *in situ* гибридизации.
 - 2.1 Приготовление растворов и реагентов.
 - 2.2 Пробоподготовка.
 - 2.3 Гибридизация и денатурация.
 - 2.4 Постгибридизационная отмывка.
3. Анализ препаратов и определение погрешности для используемых зондов.
 - 3.1 Установление погрешностей для используемых зондов.
 - 3.2 Анализ препаратов и интерпретация полученных результатов.

1. Культивирование и фиксация клеток костного мозга и/или периферической крови (при наличии бластных клеток)

1.1 Выделение моноклеарных клеток.

1) Стерильной пипеткой развести КМ/ПК средой для промывания до объема не более 8 мл.

2) В коническую пробирку для центрифугирования объемом 15 мл добавить 4 мл холодного Histopaque®-1077.

3) Медленно по стенке наслоить в коническую пробирку с Histopaque®-1077 8 мл образца КМ/ПК (соотношение КМ/ПК: Histopaque®-1077 = 2:1), чтобы не допустить смешивания.

4) Центрифугировать полученную пробу в течение 20 минут при 400g.

5) Стерильной пипеткой перенести кольцо из моноклеаров в пробирку объемом 12 мл и добавить 0,9% раствор NaCl с 3% эмбриональной телячьей сывороткой, чтобы в сумме получилось 10 мл. Аккуратно перемешать.

6) Центрифугировать полученную пробу в течение 10 минут при 400g.

7) Отобрать стерильной пипеткой надосадочную жидкость, оставив 1-1,5 мл, ресуспендировать оставшийся осадок с надосадочной жидкостью.

8) Отобрать 20 мкл полученной пробы и добавить в стеклянную пробирку с 400 мкл 3% уксусной кислотой, ресуспендировать, дать постоять 5–6 минут.

9) Подсчитать концентрацию клеток в камере Горяева (при общем увеличении микроскопа $\times 100$).

1.2 Приготовление культуры клеток.

В предварительно нагретую полную питательную среду добавить выделенные клетки в концентрации $1,5 \times 10^6$ на 1 мл среды (при наличии достаточного количества клеток ставится несколько проб препарата: только в полную питательную среду, с добавлением ITS, с дополнительно добавленным L-глутамином). Перемешать легким покачиванием и поместить в инкубатор с 5% CO² на 24 часа.

1.3 Фиксация клеточной культуры.

1) Во флакон с культурами клеток добавить колцемид, перемешать и поместить в CO²-инкубатор (37 °C) на 30 минут.

2) Содержимое флакона перенести в чистую пробирку и центрифугировать 10 минут при 400 g.

3) Осадок ресуспендировать, добавить 8 мл 0,55% KCl и поместить на водяную баню при 37°C на 12 минут.

4) Центрифугировать в течение 10 минут при 400 g, осадок ресуспендировать, развести фиксатором Карнуа (смесь метанол-уксусная кислота в соотношении 3:1) до 10 мл и поместить в морозильник (минус 20°C) на 20 минут.

5) Центрифугировать в течение 10 минут при 400 g, осадок ресуспендировать, залить свежим фиксатором Карнуа и поместить в холодильник (+4°C... +8°C) на хранение до раскапывания.

1.4 Приготовление препаратов клеток.

Клетки центрифугировать в течение 10 минут при 400 g, удалить супернатант. Для FISH-исследования поместить 30 мкл полученного осадка клеток на сухое, предварительно обезжиренное предметное стекло. Препараты высушить в течение 48–72 часов при комнатной температуре +20°C... +25°C для лучшей фиксации клеток на стекле. При необходимости срочного исследования, допустимо инкубировать препараты в течение 60–120 минут при температуре +56°C в термостате.

2. Проведение флуоресцентной *in situ* гибридизации.

Для выявления реаранжировок генов *ABL1*, *ABL2*, *PDGFRB*, *JAK2*, *CRLF2*, *NTRK3*, *CSFR1*, *EPOR*, *CREBBP*, *MEF2D*, *ZNF384* и *PAX5* использовались ДНК-пробы фирмы-производителя ZytoVision и Vysis Abbott, поэтому далее температура плавления ДНК и гибридизации ДНК-пробы с ДНК пациента указывается для данных фирм (при использовании проб других фирм необходимо использовать температурные режимы, указанные в рекомендациях фирм-производителей с дальнейшей корректировкой под условия лаборатории).

Метод состоит из нескольких этапов, включающих пробоподготовку, денатурацию, гибридизацию, постгибризационную отмывку и анализ препаратов.

2.1 Приготовление растворов и реагентов.

1) Рабочая концентрация РНКазы – 10 мг/мл. Для получения рабочей концентрации исходный раствор РНКазы развести с ФСБ в соотношении 1:1. Рабочий раствор РНКазы аликвотить по 200 мкл и хранить при минус 20°C.

2) Раствор 2×SSC: к 180 мл дистиллированной воды добавить 20 мл раствора 20×SSC. Хранить при комнатной температуре.

3) Раствор 2×SSC (1): к 50 мл 2×SSC добавить 200 мкл РНКазы, ресуспендировать.

4) Раствор 2×SSC (2): к 50 мл 2×SSC добавить 50 мкл 1% NP40, вспенить пастеровской пипеткой.

5) Раствор 0,4×SSC: к 49 мл дистиллированной воды добавить 1 мл 20×SSC и 150 мкл NP40, вспенить пастеровской пипеткой.

6) Подготовить 70, 80 и 96% растворы этанола в емкостях Коплина (объем растворов – 50 мл).

2.2 Пробоподготовка.

1) С помощью светового микроскопа оценить качество и количество клеток на цитогенетическом препарате, наличие или отсутствие белка. Обозначить зону с оптимальным количеством ядер.

2) Цитогенетические препараты поместить в прогретый на водяной бане до 37°C раствор 2×SSC (1) на 30 минут.

3) Провести дегидратацию в серии спиртовых растворов 70, 80, 96 % по 2 минуты при комнатной температуре.

2.3 Гибридизация и денатурация.

1) При необходимости приготовления ДНК-пробы нужно смешать 7 мкл гибридизационного буфера с 2 мкл деионизированной воды и 1 мкл ДНК-пробы.

2) Добавить 10 мкл ДНК-зонда на пробу, накрыть покровным стеклом и нанести по краям покровного стекла резиновый клей.

3) Поместить цитогенетический препарат в гибридизатор и выставить на приборе программу, соответствующую используемому зонду (таблица 1).

Таблица 1 – Режим цикла денатурация-гибридизация для используемых зондов

Фирма-производитель	Температура и длительность денатурации	Температура и длительность гибридизации
VYSIS	73°C – 5 мин	37°C – 20 часов
ZytoVision	72°C – 5 мин	37°C – 20 часов

Примечание: температура и длительность денатурации-гибридизации зависит от фирмы-производителя, на данном этапе необходимо четко придерживаться их рекомендаций.

2.4 Постгибридизационная отмывка.

1) По истечении времени гибридизации снять покровные стёкла и поместить препарат в заранее прогретый до необходимой температуры раствор 0,4xSSC с добавлением 0,3% NP40 на 2 минуты. Для зондов фирмы Vysis раствор прогревается до +70°C, для ZytoVision – до +73°C

2) Перенести стёкла в раствор 2xSSC (2) с добавлением 0,1% NP40 на 10 минут при комнатной температуре в полном затемнении.

3) Провести дегидратацию в серии спиртовых растворов 70, 80 и 96% по 2 минуты при комнатной температуре.

4) Сушить препараты в вертикальном положении при комнатной температуре +20°C... +25°C в темноте.

Нанести 10 мкл рабочего раствора DAPI, накрывать покровным стеклом и анализировать полученный результат под флуоресцентным микроскопом с соответствующими фильтрами.

3. Анализ препаратов и определение погрешности для используемых зондов.

3.1 Установление погрешностей для используемых зондов.

Для контроля качества препаратов, окрашенных методом FISH, проводится отрицательный контроль для каждой ДНК-пробы. Для этого выбирается образец КМ/ПК, в котором подтверждено отсутствие хромосомных aberrаций. Проводится окрашивание препаратов данной пробы и дальнейший анализ ≥ 4000 ядер. По результатам анализа считаются значение погрешностей (cut-off) (таблица 2).

Таблица 2 – Значения погрешностей (cut-off) для наиболее частых вариантов расположения сигналов в двухцветных зондах «на разрыв»

ген \ cut-off	FRG (1-2O), %	FRG (3-4 O), %	FRG (>4O), %	FFF, %	F, %	Среднее значение, %
<i>CRLF2</i>	8,6	1,6	1,6	2,1	3,4	3,46
<i>JAK2</i>	4,2	1,6	0	3	3,8	2,52
<i>NTRK3</i>	8	2,5	2,1	2,1	3	3,54
<i>PDGFRB</i>	1,6	0	1,6	2	2	1,44
<i>CSFR1</i>	5,4	1,6	0	2,2	2,5	2,34
<i>EPOR</i>	3,8	1,6	0	3	3,4	2,36
<i>CREBBP</i>	5	1,6	1,6	1,6	4,2	2,8
<i>ABL1</i>	7	2	1,6	2	3	3,12
<i>ABL2</i>	3,8	0	0	2,1	5	2,18
<i>PAX5</i>	7,9	2,1	2,1	2,1	4,2	3,68
<i>ZNF384</i>	4,2	1,6	0	2,5	3,4	2,34

Примечание: F – слитный сигнал (fusion), G – зеленый сигнал (green), R – красный сигнал флуорохрома (red)

Зонд на наличие перестроек с вовлечением гена *MEF2D* является трехцветным и позволяет выявить не только перестройку гена *MEF2D*,

но и инверсию с образованием слитного транскрипта *MEF2D::BCL9*. Для данной ДНК-пробы cut-off ядер с aberrантным расположением сигналов составил: FRG (1-2Ø) AA – 6,3%, FRG (3-4Ø) AA – 2,3%, FRG (>4Ø) AA – 0%, FF (R,G,A) – 13,4%, FFA – 9%, FAA – 2,3% и FFAAA – 2,3%. Средний процент дисбаланса составил 5,09% (А – голубой флуорохром, от лат. aqua).

3.2 Анализ цитогенетических препаратов и интерпретация полученных результатов

Интерпретация результатов проводится с учетом конструкции используемого зонда. Для выявления перестроек генов используют ДНК-пробы на разрыв гена. В пробах 5' конец и 3' конец гена метятся разными флуорохромами, что позволяет визуально определить наличие/отсутствие перестройки. В клетках с нормальным кариотипом, которые не содержат перестроек исследуемых генов, видны два слитных сигнала. В клетках с aberrантным кариотипом – один слитный сигнал и по одному сигналу, соответствующему каждой из частей ДНК. Отсутствие одного из сигналов или наличие дополнительного сигнала бывает при несбалансированных транслокациях или дополнительных дериватных хромосомах в кариотипе. Чтобы избежать ложноположительного результата исследования, для каждого зонда определяются cut-off на препаратах крови здорового человека (пункт 3.1).

Для исследования лейкозных клеток анализируют 200 интерфазных ядер. Исследуемые ядра должны иметь четкие границы, быть равномерно окрашенными и лежать изолированно. Сигналы также должны быть достаточно яркими, четкими (не диффузными). Позитивным считают расположение сигналов более чем на три диаметра сигнала (в слитных сигналах возможен небольшой разрыв между сигналами от разных

флуорохромов за счет неокрашенного участка между 5' и 3' окрашенными концами). Как правило, отдельные сигналы лежат в различных сегментах.

Запись и интерпретация результатов производится согласно Международной цитогеномной номенклатуре человека (ISCN, от англ. An International System for Human Cytogenomic Nomenclature).

В соответствии с действующей классификацией ВОЗ (2022 г.) случаи В-ОЛЛ с перестройками перечисленных генов относятся к цитогенетической подгруппе *BCR::ABL1*-подобного В-ОЛЛ с частотой развития рецидивов 75–80%, лечение в данном случае должно быть направлено на предотвращение рецидива заболевания.

- При выявлении одной или нескольких перестроек генов *ABL1*, *ABL2*, *PDGFRB* и/или *CSFR1* лечение пациента с В-ОЛЛ проводится в соответствии с главой 4, пунктами 22.2–23.15 клинического протокола «Диагностика и лечение детей с онкологическими и гематологическими заболеваниями» (утвержден постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 05.12.2022 г. № 113, далее – клинический протокол) группы высокого риска (HRG).

- При выявлении одной или нескольких перестроек генов *PAX5*, *MEF2D*, *CREBBP*, *EPOR*, *CRLF2*, *JAK2*, *ZNF384* и/или *NTRK3* лечение пациента с В-ОЛЛ проводится в соответствии с главой 4, пунктами 22.2–23.15 клинического протокола группы промежуточного риска (ImRG).

4. Возможные ошибки и осложнения выполнения метода

1. Использование реагентов, условия хранения которых не соблюдались.

Устранение: соблюдать условия хранения.

2. Неточное дозирование реагентов.

Устранение: ежегодно поверять автоматические дозаторы переменного объема.

3. Отсутствие сигналов/очень слабые сигналы в нуклеусах клеток.

Устранение: соблюдать технологию фиксации, использовать свежеприготовленные растворы для пре- и постгибридизационной обработки, изменение концентрации отмывочных растворов, правильные температурные режимы.

4. Диффузные сигналы.

Устранение: корректировка температуры денатурации и гибридизации. Увеличение времени гибридизации.

5. Ложноположительный ответ.

Устранение: использовать определение погрешностей для каждого нового зонда, постановка контролей для новых партий ДНК-проб, анализ двумя опытными цитогенетиками с опытом работы в онкогематологии не менее двух лет.