

**Пермикин Ж.В., Вержбицкая Т.Ю., Попов А.М., Ригер Т.О., Цаур
Г.А., Фечина Л.Г., Савельев Л.И., Цвиренко С.В.**

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ ПРОТОЧНОЙ
ЦИТОМЕТРИИ И ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ
РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИНИМАЛЬНОЙ
ИЗМЕРИМОЙ БОЛЕЗНИ ПРИ ОСТРОМ ЛИМФОБЛАСТНОМ
ЛЕЙКОЗЕ У ДЕТЕЙ ПЕРВОГО ГОДА ЖИЗНИ**

Кафедра клинической лабораторной диагностики и бактериологии
Уральский государственный медицинский университет
Екатеринбург, Российская федерация

**Permikin Zh. V., Verzhbitskaya T.Yu., Popov A.M., Riger T.O., Tsaur
G.A., Fechina L.G., Saveliev L.I., Tsvirenko S.V.**

**COMPERETIVE ANALYSIS OF MINIMAL MEARSURABLE
DISEASE MONITORING BY FLOW CYTOMETRY AND REAL-TIME
QUANTITATIVE PCR RESULTS IN INFANTS WITH ACUTE
LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA**

Department of clinical laboratory diagnostics and bacteriology
Ural state medical university
Yekaterinburg, Russian Federation
Email: permikin.z@yandex.ru

Аннотация. В статье приведена оценка качественной и количественной зависимости между результатами определения МОБ методами ПЦ и ОТ-ПЦР-РВ у детей первого года жизни с острым лимфобластным лейкозом из В-линейных предшественников.

Annotation. The article contains qualitative and quantitative assessment of relation of monitoring MRD results in infants with B-cell acute lymphoblastic leukemia by FCM and quantitative RT-PCR.

Ключевые слова: острый лимфобластный лейкоз, минимальная остаточная болезнь.

Key words: acute lymphoblastic leukemia, minimal residual disease.

Введение

К одним из наиболее значимых факторов риска неблагоприятного исхода острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) относится минимальная остаточная болезнь (МОБ), отражающая чувствительность опухолевых клеток к проводимой терапии[1,2]. В России Л.Г. Фечиной создан протокол MLL-Baby-2006 для лечения младенческого ОЛЛ с перестройками КМТ2А[1]. Обязательным условием данного протокола является мониторинг МОБ перед началом основных элементов лечения и после завершения терапии. Наиболее широко для измерения МОБ используются методы многоцветной проточной

цитометрии (МПЦ) и полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ)[1,2,3].

Цель исследования — оценить взаимосвязь между результатами определения МОБ методами ПЦР-РВ и МПЦ.

Материалы и методы исследования

Исследование проведено на базе Центра детской онкологии и гематологии Областной детской клинической больницы г. Екатеринбурга. Дизайн исследования – описание серии случаев. В исследуемую группу вошли образцы пунктата костного мозга (n=944), полученные в период с января 2007 по декабрь 2020 года, от пациентов (n=123) в возрасте младше 12 месяцев с диагностированным острым лимфобластным лейкозом из В-линейны предшественников. У всех пациентов были выявлены следующие химерные транскрипты с вовлеченным геном *KMT2A*: *KMT2A-AFF1* (n=77; 62,6%), *KMT2A-MLLT1* (n=19; 15,4%), *KMT2A-MLLT3* (n=17; 13,8%), *KMT2A-MLLT10* (n=6; 4,8%); *MLL-EPS15* (n=3; 2,4%). Все пациенты получали терапию по протоколу MLL-Baby-2006. МОБ определяли в образцах костного мозга, взятых на 8-й (n=13), 15-й (n=83), 36-й (n=100), 43-й (n=75) дни индукционной терапии. Дальнейший мониторинг осуществлялся на 85-й (n=26) день терапии, после консолидации 2 (n=14), консолидации 3 (n=11) и поддерживающей терапии (n=29) для пациентов стандартной группы риска. Для пациентов группы высокого риска мониторинг МОБ осуществлялся после проведения блоков интенсификации HR1 (n=58), HR2 (n=42), HR3 (n=36), HR4 (n=23), HR5 (n=25), HR6 (n=17), после протокола II (n=10), после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) (n=73), после проведения анти-CD19, анти-CD22 направленной терапии (n=46). Оценка МОБ также проводилась у пациентов с рецидивом ОЛЛ (n=143). В исследование также вошли образцы костного мозга от пациентов, получавших непрограммное лечение (n=120). Каждый образец костного мозга, доставленный в лабораторию на исследование МОБ, подвергался параллельному исследованию методами проточной цитометрии и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Иммунофенотипирование опухолевых клеток проводилось методом 4-10-цветной проточной цитометрии на приборах “FACS Canto”, “FACS Canto II”, “FACS Aria IIu” (Becton & Dickinson (BD), США). Панель первично-меченных моноклональных антител, используемых для мониторинга МОБ включала в себя: NG2, CD10, CD11a, CD11b, CD15, CD19, CD20, CD22, CD34, CD38, CD45, CD58, CD65, CD133. Список флуорохромов включал в себя FITC, PE, PE-Cy7, PerCP, APC, APC-Cy7, APC-H7, BV421, BV510. Окрашивание мембранных антигенов моноклональными антителами производилось согласно инструкции производителя. При мониторинге МОБ анализировали не менее 100000 клеток. Положительными считали образцы, в которых определялось 10 и более событий, имеющих лейкоз-ассоциированный иммунофенотип. Результат рассчитывали в виде процентного содержания опухолевых клеток среди всех ядродержащих клеток костного мозга. Поиск генетических aberrаций проводился с помощью

метода полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени по ранее описанной методике[4]. Для статистической обработки результатов применялась надстройка Analyse-it для программы Microsoft Excel. Качественное сравнение методов было проведено с помощью таблиц контингентности. Для количественного сравнения методов был произведен расчет коэффициента корреляции, рассчитаны уравнения регрессии по Пассинг-Баблоку. Для сравнения парных групп отношения экспрессии химерного транскрипта к количеству опухолевых клеток были построены графики «ящик с усами». Статистическая значимость различий для качественного сравнения определялась при помощи непараметрического критерия МакНемара. Для сравнения количественных показателей двух групп использовались непараметрический критерий χ^2 Пирсона и критерий Краскела-Уоллеса, для сравнения трёх групп использовался критерий Фридмана. Достоверными считались различия при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Качественная сопоставимость результатов определения МОБ методом иммунофенотипирования и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в составила 87,3%. Сопоставимость результатов по этапам терапии достоверно различалась во время индукции ремиссии ($n=271$; 77,8%; $p < 0,0001$), во время консолидации и интенсификации ($n=252$; 88,5%; $p < 0,0001$), на этапе терапии рецидива ($n=143$; 91,6%; $p=0,0386$), после применения иммунотерапии ($n=46$; 82,6%; $p=0,0078$), на этапе непрограммного лечения ($n=120$; 94,2%; $p=0,034$). Значимые различия в сопоставимости результатов выявлены на 36-й день ($n=100$; 71,0%; $p < 0,0001$), на 43 день терапии ($n=75$; 74,6%; $p=0,0007$) на 85-й день ($n=26$; 75,0%; $p=0,313$). Различия на 8-й и 15-й дни, после блоков высокого риска, консолидирующей терапии, после ТГСК статистически не значимы ($p > 0,05$).

Образцы пациентов с химерным транскриптом *KMT2A-MLLT3* имели достоверные различия в сопоставимости данных проточной цитометрии и ПЦР-РВ ($n=127$; 73,2%; $p < 0,0001$), как и образцы пациентов с *KMT2A-AFF1* ($n=566$; 90,4%; $p < 0,0001$) и *KMT2A-MLLT1* ($n=181$; 88,4%; $p=0,0002$). Значимых различий для *MLL-EPS15* и *KMT2A-MLLT10* не выявлено ($p > 0,05$). Мы также обнаружили значимую, прямую корреляционную зависимость средней силы между двумя методами при анализе всех положительных результатов ($n=469$; $r=0,598$; $p < 0,0001$). Различия в корреляции методов в зависимости от количества опухолевых клеток в образце: при количестве опухолевых клеток $< 1,0\%$, связь незначительна по силе, но достоверна ($n=262$; $r=0,215$; $p=0,0005$). При количестве опухолевых клеток $> 1,0\%$ сила и достоверность связи увеличиваются ($n=207$; $r=0,521$; $p < 0,0001$). Был проведен регрессионный анализ по методу Пассинга-Баблока для определения возможности прогнозирования результатов ПЦР-РВ на основании результатов МПЦ. Предсказанные значения МОБ и доверительные интервалы для них перечислены в таблице 1.

Таблица 1.

МОБ МПЦ	методом	МОБ ПЦР-РВ	методом	95% доверительный интервал
5,0%		9,02		6,93-13,73
10,0%		18,06		13,87-27,48
50,0%		90,40		69,44-137,00

Мы высказали предположение, что экспрессия химерного транскрипта в опухолевых клетках разных пациентов может отличаться. Мы рассчитали отношение экспрессии химерного гена к количеству опухолевых клеток у каждого пациента на различных этапах терапии (результат ПЦР-РВ/результат МПЦ). Мы поделили пациентов, в зависимости от исхода терапии, на группы: пациенты с рецидивом, пациенты без рецидива. Далее мы сравнили отличия между отношением экспрессии к количеству опухолевых клеток на этапах терапии индукции и интенсификации. Полученные результаты представлены на рисунке 1. Для удобства визуализации данные были логарифмированы.

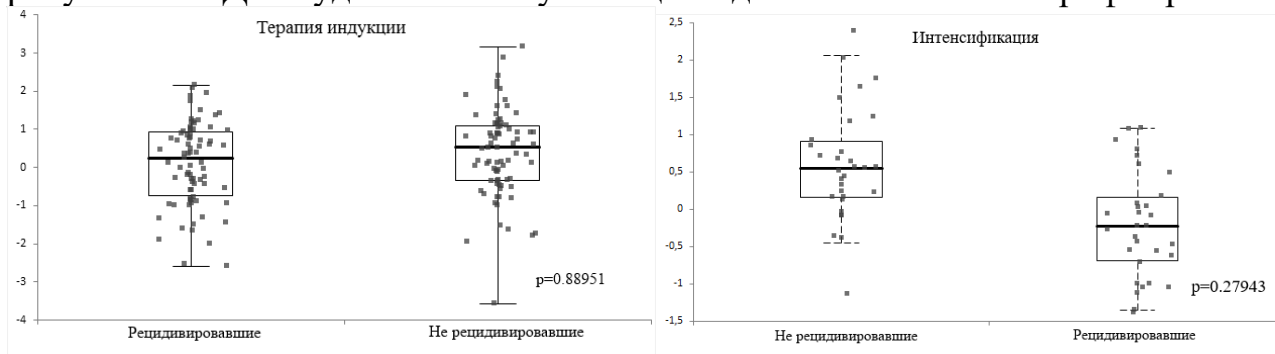


Рис. 1. Бокс-плоты, иллюстрирующие распределение значений отношений экспрессии химерного транскрипта к количеству опухолевых клеток в группах рецидивировавших и не рецидивировавших пациентов на этапах индукции и интенсификации терапии.

Ни в одной группе сравнения различия в отношении экспрессии химерного транскрипта к количеству опухолевых клеток не достигли статистической значимости.

Выводы:

1. Результаты определения МОБ у детей первого года жизни имеют высокую качественную сопоставимость (87,3%).
2. Между методами многоцветной проточной цитометрии и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени существует прямая слабая корреляционная связь ($r=0,598$; $p<0,0001$).
3. Сопоставимость методов зависит от типа химерного транскрипта, и наименьшая отмечается для транскрипта *KMT2A-MLLT3* (73,2%; $p<0,0001$).
4. С помощью метода линейной регрессии Пассинга-Баблока невозможно точно предсказывать значения МОБ, определенные методом ПЦР-РВ, на основании данных проточной цитометрии.

5. Соотношение между величиной экспрессии химерного транскрипта и количеством лейкоэмических клеток не показало различий в группах пациентов с рецидивами и пациентов без рецидивов.

Список литературы:

1. Цаур Г.А. Время достижения молекулярной ремиссии как фактор прогноза у детей первого года жизни с острым лимфобластным лейкозом / Г.А. Цаур, Т.В. Наседкина, А.М. Попов, Е.В. Шориков, Л.И. Савельев, Л.Г. Фечина // Онкогематология. — 2010. — Т.5. — №2. — С. 46-54.

2. Pieters R. Outcome of infants younger than 1 year with acute lymphoblastic leukemia treated with the interfant-06 protocol: Results from an international phase III randomized study / R. Pieters, P. De Lorenzo, P. Ancliffe // Journal of clinical oncology. — 2019. — Т.25. — №37. — С. 2246-2256.

3. Tsaur G. A. Methodological aspects of diagnostics and minimal residual disease monitoring in infant acute leukemias / G.A. Tsaur, A.M. Popov, L.G. Fechina, S.A. Romyantsev // Oncohematology. — 2016. — Т.11. — №1. — С. 62-74.

4. Gabert, J. Standardization and quality control studies of ‘real-time’ quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – A Europe Against Cancer Program / J. Gabert, E. Beillard, V. van der Velden // Leukemia. — 2003. — Т.17. — №1. — С.2318-2357.

УДК 616.9

**Прощенко Д.А., Зорников Д.Л., Копосова О.В., Ворошилина Е.С.
ОБНАРУЖЕНИЕ *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* И *CLOSTRIDIUM
DIFFICILE* В ОБРАЗЦАХ ФЕКАЛИЙ ДЕТЕЙ И ВЗРОСЛЫХ МЕТОДОМ
ПЦР-РВ**

Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии
Уральский государственный медицинский университет
Екатеринбург, Российская Федерация

**Proshchenko D.A., Zornikov D.L., Kopusova O.V., Voroshilina E.S.
THE REAL-TIME PCR DETECTION OF *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*
AND *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* IN INFANT, CHILD, AND ADULT FECES**
Department of Microbiology, Virology, and Immunology
Ural State Medical University
Yekaterinburg, Russia
E-mail: dproshchenko@yandex.ru

Аннотация. Токсигенные штаммы *C. perfringens* и *C. difficile* могут вызывать развитие пищевых инфекций и антибиотико-ассоциированных диарей, включая псевдомембранозный колит. Для лечения последнего используют специальные антибиотики: клиндамицин и метранидазол, активные в отношении *C. difficile*. *C. perfringens* и *C. difficile* являются облигатно анаэробными микроорганизмами, что затрудняет проведение культурального исследования.