

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра



_____ Д.Л.Пиневиц

« 12 » _____ 2015 г.

Регистрационный № 136-1115

**КОМПЛЕКСНЫЙ МЕТОД ДИАГНОСТИКИ НЕХОДЖКИНСКИХ
ЛИМФОМ И ОЦЕНКИ МИНИМАЛЬНОЙ ДИССЕМНИРОВАННОЙ И
МИНИМАЛЬНОЙ ОСТАТОЧНОЙ БОЛЕЗНИ ПРИ
НЕХОДЖКИНСКИХ ЛИМФОМАХ У ДЕТЕЙ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

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

АВТОРЫ:

К.м.н. Фёдорова А.С., к.б.н. доцент Белевцев М.В., к.б.н. Мелешко А.Н.,
к.б.н. Кустанович А.М., Волочник Е.В., Лавриненко В.А.,
д.м.н., профессор, член-корр. НАН Беларуси Алейникова О.В.

Минск, 2015

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневич

11.12.2015

Регистрационный № 136-1115

**КОМПЛЕКСНЫЙ МЕТОД ДИАГНОСТИКИ НЕХОДЖКИНСКИХ
ЛИМФОМ И ОЦЕНКИ МИНИМАЛЬНОЙ ДИССЕМНИРОВАННОЙ
И МИНИМАЛЬНОЙ ОСТАТОЧНОЙ БОЛЕЗНИ
ПРИ НЕХОДЖКИНСКИХ ЛИМФОМАХ У ДЕТЕЙ**

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: канд. мед. наук А.С. Фёдорова, канд. биол. наук, доц. М.В. Белевцев,
канд. биол. наук А.Н. Мелешко, канд. биол. наук А.М. Кустанович,
Е.В. Волочник, В.А. Лавриненко, д-р мед. наук, проф., чл.-корр. НАН Беларуси
О.В. Алейникова

Минск 2015

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота

кДНК — комплементарная ДНК

КМ — костный мозг

МДБ — минимальная диссеминированная болезнь

МОБ — минимальная остаточная болезнь

НХЛ — неходжкинская лимфома

ПК — периферическая кровь

ПЦР — полимеразная цепная реакция

РНК — рибонуклеиновая кислота

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен комплексный метод иммунологической и генетической диагностики неходжкинских лимфом (НХЛ), а также оценки минимальной диссеминированной болезни (МДБ) и минимальной остаточной болезни (МОБ) при различных вариантах НХЛ у детей, который может быть использован при первичной диагностике и в процессе лечения этих пациентов. Иммунологическая и генетическая диагностика позволяет уточнить нозологическую форму НХЛ в соответствии с классификацией ВОЗ (2008) лимфоидных неоплазий, стадию заболевания, выявить прогностически неблагоприятные биологические маркёры, а также мишени для оценки МДБ и МОБ. Анализ МДБ и МОБ позволяет своевременно выявить пациентов с высоким риском развития рецидива и провести коррекцию терапии первой линии лечения.

Инструкция предназначена для врачей-гематологов, врачей-онкологов и врачей лабораторной диагностики организаций здравоохранения, оказывающих квалифицированную медицинскую помощь пациентам с НХЛ.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Медицинские изделия

Аппарат для горизонтального электрофореза в агарозном геле.

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 1000х.

Морозильник -20°C.

Проточный цитофлуориметр.

Спектрофотометр.

Термомиксер.

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

Центрифуга с охлаждением на 14000 об./мин.

Реактивы

Тақ ДНК полимеразы.

Агароза.

Бромистый этидиум.

Вода деионизованная.

ДНК-зонды: 1p/1q, cen7/7q, 13q14/13q34, МУС ВА.

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-содержащий реагент для выделения РНК, рН = 4,0.

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

Фосфатно-солевой буфер (рН 7,2–7,4).

Хлороформ.

Этанол, 70%.

Этанол, 96%.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Анапластическая крупноклеточная лимфома, лимфобластная лимфома, лимфома/лейкоз Беркитта, диффузная В-крупноклеточная лимфома, первичная медиастинальная В-крупноклеточная лимфома, периферическая Т-клеточная лимфома, неспецифицированная.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Для иммунофенотипической и генетической диагностики НХЛ необходимо доставить нативный материал, содержащий опухолевые клетки (ткань опухоли, лимфоузел, асцитическая, плевральная или перикардальная жидкость, костный мозг, периферическая кровь в лаборатории иммунологических, молекулярно-биологических и цитогенетических исследований).

Иммунофенотипическая диагностика НХЛ

Опухолевый иммунофенотип клеток НХЛ определяется методом многопараметрической проточной цитометрии. Объект исследования: мононуклеары, выделенные из ткани опухоли или биологических жидкостей, содержащих опухолевые клетки.

Рекомендуемая панель моноклональных антител для иммунофенотипирования методом проточной цитометрии: CD45/CD14, CD2, CD5, CD7, CD3, CD4/CD8, CD1a, CD19, CD20, CD22, CD10, CD79a, sIgM, kappa, lambda, HLA-DR, CD34, CD13, CD33, CD15, CD11c, CD30, CD52.

Перечень наиболее информативных моноклональных антител, необходимых для иммунофенотипической диагностики различных вариантов НХЛ:

Для В-линейных НХЛ: CD79a, CD10, CD19, CD20, CD22, sIgM, kappa, lambda, CD34, HLA-DR, TdT;

Иммунофенотип опухолевых клеток при В-зрелых НХЛ:

Лимфома/лейкоз Беркитта: CD19+, CD20+, CD22+, CD10-/+, sIgM+, CD34-, HLA-DR+, TdT-, CD79a+, cy IgM+/-, kappa/lambda+;

Диффузная В-крупноклеточная лимфома: CD19+, CD20+, CD22+, CD10-, sIgM-/+, CD34-, HLA-DR+, TdT-, CD79a+, CD19+ kappa/lambda-/+;

Первичная медиастинальная В-крупноклеточная лимфома: CD19+, CD20+, CD22+, CD10-, sIgM-, CD34-, HLA-DR+, TdT-, CD79a+, CD19+ kappa/lambda-.

Лимфобластная лимфома из предшественников В-клеток:

про-В-лимфобластов: CD19+, CD20-, CD22+/-, CD10-, sIgM-, CD34+, HLA-DR+, TdT+, CD79a+, cy IgM-;

common-B-лимфоцитов: CD19+, CD20+/-, CD22+, CD10+, sIgM-, CD34+/-, HLA-DR+, TdT+, CD79a+, cy IgM-;

пре-B-лимфоцитов: CD19+, CD20+/-, CD22+, CD10+, sIgM-, CD34+/-, HLA-DR+, TdT+, CD79a+, cy IgM+.

Для T-линейных НХЛ: CD45/CD14, CD1a, CD2, CD5, CD7, CD3, CD4/CD8, CD34, TdT, CD30, CD52;

Иммунофенотип опухолевых клеток при периферических T-зрелых лимфомах:

Анапластическая крупноклеточная лимфома: CD45+, CD2-/+ , CD3-/+ , CD5-/+ , CD7-/+ , CD8-/+ , CD30+, CD52+, CD34-;

Периферическая T-клеточная лимфома, неспецифицированная: CD1a-, CD2+, CD3+, CD5+, CD7+, CD4+/-, CD8+/-, TdT-.

Лимфобластная лимфома из предшественников T-клеток:

протимоцитов: CD34+, HLA-DR-, CD2+, CD5+, CD7+, CD3±, CD4-, CD8-;

незрелых тимоцитов: CD34-, HLA-DR-, CD2+, CD5+, CD4-, CD8-;

кортикальных тимоцитов: CD34-, HLA-DR-, CD1a+, CD2+, CD5+, CD4+CD8+.

Рекомендуемая панель моноклональных антител позволит определить опухолеспецифический иммунофенотип клеток лимфомы, что является необходимым для верификации диагноза и идентификации мишеней для анализа МДБ и МОБ.

Генетическая диагностика НХЛ

Объем и спектр рекомендуемых генетических исследований зависит от нозологической формы НХЛ.

При любом варианте НХЛ при наличии незафиксированного опухолевого материала проводится кариотипирование опухолевых клеток методом дифференциального окрашивания.

В зависимости от предполагаемого (после цитологического исследования и/или иммунофенотипирования) или уточненного морфологического варианта НХЛ выполняют следующие исследования:

При ALK-позитивной анапластической крупноклеточной лимфоме — определение химерного онкогена *NPM-ALK* в опухоли, КМ и ПК с использованием двухстадийной гнездовой полимеразной цепной реакции.

При положительном результате *NPM-ALK* является мишенью для оценки количества и кинетики диссеминированных в КМ/ПК опухолевых клеток на этапах химиотерапии.

При отрицательном результате *NPM-ALK* в опухоли — исследовать экспрессию более редкого химерного онкогена *TPM3-ALK* по аналогичной схеме.

При неуверительной трактовке морфологического диагноза наличие экспрессии *NPM-ALK* или *TPM3-ALK* в опухоли и/или КМ и/или ПК является достоверным критерием для постановки диагноза анапластической крупноклеточной лимфомы.

При лимфобластной лимфоме из предшественников B-клеток — определение экспрессии химерных онкогенов *BCR-ABL*, *MLL-AF4*, *MLL-AF6*, *MLL-AF9*, *MLL-AF10*, *MLL-ENL*, *MLL-ELL*, *TEL-AML1*, *E2A-PBX1* методом

двухстадийной гнездной ПЦР в опухоли, КМ и ПК по вышеописанной методике. При лимфобластной лимфоме из предшественников Т-клеток исследуется экспрессия *SIL-TAL*. При положительном результате выявленный химерный онкоген является достоверным критерием для постановки диагноза В- или Т-клеточной лимфобластной лимфомы и может быть использована как мишень для анализа МДБ и МОБ.

При лимфоме/лейкозе Беркитта–1. Определение перестройки *MYC-IgH* в опухоли, КМ и ПК методом ПЦР длинных фрагментов.

Выявление генетической перестройки *MYC-IgH* подтверждает наличие в опухолевых клетках транслокации $t(8;14)(q24;q32)$, что является достоверным критерием для постановки диагноза лимфома/лейкоз Беркитта и может быть использован как мишень для анализа МДБ и МОБ.

2. Определение реаранжировки гена *C-MYC* в опухоли и в КМ методом флуоресцентной *in situ* гибридизации.

Определение реаранжировки *C-MYC* осуществляется на интерфазных ядрах или метафазных пластинках при помощи двуцветного зонда на разрыв. Выявление отдельных сигналов 5' и 3' концов гена *C-MYC* подтверждает наличие в опухолевых клетках хромосомной перестройки с вовлечением гена *C-MYC*, который расположен в локусе 8q24 ($t(8;14)$, $t(2;8)$, $t(8;22)$), что является достоверным критерием для постановки диагноза лимфома/лейкоз Беркитта.

3. Определение статуса 1q, 7q, 13q методом флуоресцентной *in situ* гибридизации в опухоли.

Исследование проводится на интерфазных ядрах или метафазных пластинках с целью определения $dup1q25$, $dup7q31$, $del13q14$, $del13q34$. Выявление любой из перечисленных хромосомных аберраций является прогностически неблагоприятным в плане высокого риска рецидива.

Генетическая диагностика в ряде случаев позволяет уточнить нозологическую форму НХЛ, а также за счет селективного использования той или иной методики молекулярно-генетического анализа выявить прогностически неблагоприятные хромосомные нарушения и определить мишени для анализа МДБ и МОБ.

Оценка минимальной диссеминированной болезни

Определение диссеминированных в КМ/ПК клеток лимфомы на момент постановки диагноза, т. н. МДБ, осуществляется при наличии известной или предполагаемой мишени с использованием методов многопараметрической проточной цитометрии и ПЦР.

1. Определение минимальной диссеминированной болезни методом многопараметрической проточной цитометрии

При лимфобластных лимфомах с известным опухолеассоциированным фенотипом определяют МДБ в КМ/ПК до начала лечения методом многопараметрической проточной цитометрии. В образцах КМ и/или ПК выявляют количество лимфомных клеток в процентном отношении ко всем выделенным ядродержащим клеткам. Чувствительность метода составляет 10^{-4} .

Для лимфобластных лимфом из предшественников В-клеток рекомендована пятицветная панель антител.

Для common B и пре-B-лимфобластов:

syte16/CD20/CD10/CD19/CD45;

syte16/CD58/CD10/CD19/CD45;

syte16/CD34/CD10/CD19/CD45;

syte16/CD38/CD10/CD19/CD45.

Для про-B-лимфобластов:

CD20-CD10/CD34/CD45/CD19;

CD20-CD10/CD38/CD45/CD19.

Для лимфобластных лимфом из предшественников Т-клеток рекомендована четырехцветная панель антител:

для Т-зрелых лимфобластов: CD4/CD8/CD3/CD45;

для Т-кортикальны лимфобластов: CD2/CD1a/CD3/CD45.

При aberrантном фенотипе панель для оценки МДБ подбирается индивидуально с учетом экспрессии опухолеассоциированных маркеров.

2. Определение минимальной диссеминированной болезни с использованием ПЦР

2.1. Определение минимальной диссеминированной болезни при ALK-позитивной анапластической крупноклеточной лимфоме по экспрессии химерного гена *NPM/ALK* или *TPM3/ALK*

Оценку МДБ при анапластической крупноклеточной лимфоме проводят до начала лечения посредством определения химерного онкогена *NPM/ALK* или *TPM3/ALK* в КМ и ПК качественно методом двухстадийной гнездовой ПЦР при выявленной или предполагаемой экспрессии соответствующего химерного гена (*NPM/ALK* или *TPM3/ALK*) в опухоли. При выявлении экспрессии *NPM/ALK* или *TPM3/ALK* в КМ и/или ПК МДБ-статус считают позитивным; при отрицательном результате — негативным, если экспрессия онкогена в опухоли была выявлена. Если экспрессия онкогена в опухоли не определялась, то при отсутствии экспрессии онкогена в КМ и/или ПК МДБ-статус нельзя расценивать как негативный, а считать неизвестным. Чувствительность метода составляет 10^{-5} .

2.2. Определение минимальной диссеминированной болезни при лимфобластной лимфоме по экспрессии химерных генов

Оценку МДБ при лимфобластной лимфоме из предшественников В-клеток проводят до начала лечения посредством определения экспрессии одного или всех химерных онкогенов *BCR/ABL*, *MLL/AF4*, *MLL/AF6*, *MLL/AF9*, *MLL/AF10*, *MLL/ENL*, *MLL/ELL*, *TEL/AML1*, *E2A/PBX1* в КМ и ПК методом гнездовой ПЦР при наличии или предполагаемой экспрессии одного из перечисленных химерных онкогенов в опухоли. Если в опухоли была выявлена экспрессия какого-либо из перечисленных химерных онкогенов, то в КМ/ПК следует определять только этот ген, и в зависимости от полученного результата считать МДБ-статус позитивным или негативным. Если исследование химерных онкогенов в опухоли не проводилось, то МДБ-статус считают позитивным при получении положительного результата в КМ/ПК либо неизвестным при получении отрицательного результата. Чувствительность метода составляет 10^{-5} .

При лимфобластной лимфоме из предшественников Т-клеток изучается экспрессия в КМ/ПК химерного онкогена *SIL/TAL* по описанной для В-лимфобластных лимфом схеме.

2.3. Оценка минимальной диссеминированной болезни при лимфоме Беркитта по определению генетической перестройки *MYC-IgH*

Оценку МДБ при лимфоме Беркитта проводят до начала лечения по определению генетической перестройки *MYC-IgH* в КМ и ПК методом ПЦР длинных фрагментов. При выявлении перестройки *MYC-IgH* в КМ и/или ПК МДБ-статус считать позитивным; при получении отрицательного результата — негативным, если перестройка *MYC-IgH* в опухоли была выявлена, и неизвестным, если перестройка *MYC-IgH* в опухоли не определялась. Чувствительность метода составляет 10^{-3} . Количественная оценка МДБ проводится после секвенирования *MYC-IgH* и подбора пациент-специфических праймеров с помощью ПЦР в реальном времени в КМ и/или ПК. Чувствительность метода составляет 10^{-5} – 10^{-6} .

2.4. Оценка минимальной диссеминированной болезни при В-клеточных неходжкинских лимфомах по определению клональных реаранжировок генов иммуноглобулина

Оценку МДБ при лимфоме Беркитта при отсутствии перестройки *MYC-IgH*, а также других вариантах В-клеточных НХЛ (лимфобластной лимфоме из предшественников В-клеток, диффузной В-крупноклеточной лимфоме, первичной медиастинальной В-крупноклеточной лимфоме) проводить до начала лечения по определению клональных реаранжировок генов иммуноглобулина — тяжелой (IgH) и легкой (IgK) цепей. Исходным материалом во всех случаях, кроме лейкоза Беркитта, является ткань опухоли или лимфоузла, плевральная или асцитическая жидкость. Для идентификации клональных реаранжировок используется ПЦР-скрининг с праймерами к 6 VH-генным сегментам IgH, трем семействам Vk генных сегментов гена IgK. Полученные ПЦР-продукты секвенируют, выявляют соединительный регион и подбирают пациент-специфический праймер к соединительному региону реаранжировки. Измерение МДБ проводят методом количественной ПЦР в реальном времени. Образцами для оценки МДБ являются ПК и КМ. Результат анализа устанавливается как негативная или позитивная МДБ и уровень МДБ — в процентах или стандартном виде числа. Чувствительность метода 10^{-5} .

Оценка минимальной остаточной болезни

Определение кинетики диссеминированных в КМ/ПК клеток лимфомы на этапах, т. н. МОБ, возможно при положительном результате МДБ с использованием методов многопараметрической проточной цитометрии и ПЦР.

1. Определение минимальной остаточной болезни методом многопараметрической проточной цитометрии

При МДБ-позитивных лимфобластных лимфомах проводят определение МОБ в ПК на 15 и 33-й дни лечения методом многопараметрической проточной цитометрии с использованием аналогичной для оценки МДБ панели моноклональных антител. При детектируемой МОБ на 33-й день лечения исследование повторяют перед началом М-протокола. Отсутствие полного

клиренса клеток лимфомы к 33-му дню лечения является фактором неблагоприятного прогноза.

2. Определение минимальной остаточной болезни с использованием ПЦР

2.1. Определение минимальной остаточной болезни при ALK-позитивной анапластической крупноклеточной лимфоме по экспрессии химерного гена *NPM/ALK* или *TPM3/ALK* методом ПЦР в реальном времени

При *NPM/ALK*-положительной анапластической крупноклеточной лимфоме при выявлении МДБ количественно методом ПЦР в реальном времени определяют уровень *NPM/ALK* (или *TPM3/ALK* при *TPM3/ALK*-положительной лимфоме) в крови после профазы, перед вторым и последующими курсами химиотерапии до получения двух отрицательных результатов, а также через 3–4 недели после последнего курса химиотерапии. Полученное значение нормализованной экспрессии ИГ на момент постановки диагноза принимают за 100% и в дальнейшем сопоставляют с ним все последующие точки, выражая уровень МОБ в процентах (%) от уровня МДБ или в логарифмах, когда одному логарифму соответствует изменение в 10 раз.

Чувствительность метода 10^{-4} – 10^{-5} . Положительный результат МОБ позволяет определить группу пациентов с очень высоким риском развития рецидива и может явиться основанием для изменения объема и интенсивности полихимиотерапии.

2.2. Определение минимальной остаточной болезни при лимфобластной лимфоме по экспрессии химерных генов

При лимфобластной лимфоме из предшественников В/Т-клеток при обнаружении экспрессии одного из химерных онкогенов в КМ или ПК до начала лечения определяют МОБ количественно методом ПЦР в реальном времени по уровню экспрессии выявленного онкогена в ПК на 15 и 33-й дни лечения. Исследуемая панель онкогенов при лимфобластной лимфоме из предшественников В-клеток: *BCR/ABL*, *MLL/AF4*, *MLL/AF6*, *MLL/AF9*, *MLL/AF10*, *MLL/ENL*, *MLL/ELL*, *TEL/AML1*, *E2A/PBX1*; при лимфобластной лимфоме из предшественников Т-клеток изучается ген *SIL/TAL*.

Отсутствие полного клиренса клеток лимфомы в ПК на 33-й день лечения является неблагоприятным прогностическим фактором.

2.3. Определение минимальной остаточной болезни при лимфоме/лейкозе Беркитта методом ПЦР в реальном времени с использованием пациент-специфических праймеров у пациентов с наличием перестройки *MYC-IgH*

При выявлении у пациентов с лимфомой/лейкозом Беркитта реаранжировки *MYC-IgH* в КМ/ПК до начала лечения методом ПЦР длинных фрагментов проводится секвенирование *MYC-IgH* и подбор пациент-специфических праймеров. Определение МОБ осуществляется количественно методом ПЦР в реальном времени с использованием пациент-специфических праймеров в ПК и/или КМ перед началом 2, 3-го (далее — при позитивной МОБ), а также после последнего курса химиотерапии. Чувствительность метода 10^{-5} – 10^{-6} .

Детектируемый уровень МОБ перед 3-м курсом полихимиотерапии является фактором неблагоприятного прогноза.

2.4 Оценка минимальной остаточной болезни при В-клеточных неходжкинских лимфомах по реаранжировкам генов иммуноглобулинов

У пациентов с В-клеточными НХЛ (лимфома Беркитта при отсутствии перестройки *MYC-IgH*, лимфобластная лимфома из предшественников В-клеток, диффузная В-крупноклеточная лимфома, первичная медиастинальная В-крупноклеточная лимфома) проводится первичный скрининг клональных реаранжировок генов иммуноглобулина тяжелой (IgH) и легкой (IgK) цепей с подбором пациент-специфического праймера так же, как и для МДБ.

Количественный анализ МОБ выполняется методом ПЦР в реальном времени с использованием пациент-специфического праймера на образцах ДНК, полученных из ПК и/или КМ пациента на этапах лечения. Анализ проводится перед началом 2, 3-го (далее — при позитивной МОБ), а также после последнего курса химиотерапии. Результат МОБ оценивается как отрицательный или положительный с уровнем МОБ, выраженным в процентах относительно уровня МДБ до начала лечения. Детектируемый уровень МОБ перед 3-м курсом полихимиотерапии является фактором неблагоприятного прогноза. Чувствительность метода до 10^{-5} .

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Использование метода не связано с риском для здоровья пациента. Однако при проведении определенных методик есть вероятность получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

При флуоресцентной *in situ* гибридизации могут возникнуть проблемы:

1. Плохо дифференцируемые, слабые сигналы. Решение: изменить концентрацию отмывочных растворов, проверить правильность условий денатурации и гибридизации.
2. Диффузные сигналы. Решение: изменить температуру денатурации.
3. Плохо зафиксированный материал или недостаточное количество клеток для анализа. Решение: исследование на срезах формалин-фиксированных опухолей, заключенных в парафиновые блоки.

При определении клональных реаранжировок генов иммуноглобулина могут возникнуть проблемы:

1. Неспецифическая мишень — реаранжировка гена иммуноглобулина, приводящая к ложноположительным или ложноотрицательным результатам. Причина: ошибочная идентификация реаранжировки, происходящая из клона нормальных В-лимфоцитов или олигоклональная реаранжировка в опухоли. Решение: избегать олигоклональных реаранжировок, т.е. наличие нескольких полос ДНК при электрофорезе ПЦР-продукта в агарозном и полиакриламидном геле. При проверке пациент-специфического праймера следует использовать поликлональный контроль (смесь ДНК из крови 10 здоровых доноров) в 6 повторах. Амплификация в поликлональном контроле должна отсутствовать или отличаться от амплификации диагностической ДНК более чем на 20 циклов. При

наличии нескольких мишеней предпочтение отдается V(D)J реаранжировке тяжелой (IgH) цепи иммуноглобулина.

2. Недоступен нативный материал опухоли. Причина: биопсия произведена в другой клинике, нативный материал потерян, не доставлен в лабораторию или испорчен. Решение: для первичного скрининга допустимо использовать фракцию мононуклеаров, выделенную из КМ или ПК в том случае, если содержание опухолевых клеток в материале превышает 80% по данным цитологического анализа или проточной цитометрии.

При определении генетической перестройки *MYC-IgH* основной проблемой является деградированная ДНК, что делает невозможным проведение ПЦР длинных фрагментов. ДНК должна быть высокомолекулярной, недеградированной, позволяющей амплифицировать участки более 10 тыс. пар оснований. Решение: при работе с ДНК следует избегать ее вортексирования, многократного замораживания-размораживания, а также следует соблюдать концентрацию ДНК в реакционной смеси, так как ее избыток может ингибировать реакцию. Для проверки качества ДНК параллельно с определением химерного гена *MYC-IgH* ставятся внутренние контроли для амплификации фрагментов длиной 4,9 и 8,2 пар оснований. При деградированной ДНК возможно отсутствие амплификации либо амплификация только контроля на 4,9 пар оснований и получение ложно-отрицательных результатов. Поэтому необходимо всегда использовать внутренние контроли и при отсутствии амплификации контрольного фрагмента длиной 8,2 пар оснований не учитывать полученный отрицательный результат. Для подтверждения результата возможно перевыделение ДНК и повторная постановка ПЦР длинных фрагментов.

При определении экспрессии химерного гена *NPM/ALK* или *TPM3/ALK* методом ПЦР в реальном времени проблемой является низкое качество материала (кДНК). Если качество кДНК низкое (например, $C_t > 26-29$ циклов при амплификации гена Абельсон) и химерный ген не амплифицируется, ответ с использованием данного материала выдан быть не может – низкое качество или недостаточное количество материала. Если качество кДНК низкое и химерный ген амплифицируется, можно говорить о том, что экспрессия гена в образце присутствует, но количественно интерпретировать данные не представляется возможным с использованием данного материала. Решение: заново выделить РНК и/или повторно синтезировать кДНК и повторить ПЦР.