https://doi.org/10.47183/mes.2024-244
УДК 616.155.392.8:577.218

CC BY 4.0
Check for updates

РАЗРАБОТКА И ОЦЕНКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ мРНК ХИМЕРНОГО ГЕНА *BCR::ABL1*

М.А. Авдонина[1]✉, Н.Г. Куклина[1,2], А.А. Главацкая[1,2], В.К. Дмитриев[3], А.С. Чегодарь[3], А.М. Данишевич[3], Н.А. Бодунова[3], И.С. Абрамов[3], Г.А. Шипулин[1]

[1] Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

[2] Научно-исследовательский институт медицины труда им. академика Н.Ф. Измерова, Москва, Россия

[3] Московский клинический научный центр имени А.С. Логинова, Москва, Россия

Введение. Хронический миелолейкоз (ХМЛ) — миелопролиферативное заболевание, ассоциированное с транслокацией t(9;22)(q34;q11), в результате которой образуется химерный ген *BCR::ABL1*. Одним из методов постановки диагноза, а также определения минимальной остаточной болезни является молекулярно-генетическое исследование, а именно количественное определение уровня экспрессии мРНК химерного гена *BCR::ABL1*.

Цель. Апробация разработанной мультиплексной тест-системы для одновременного количественного определения транскриптов e13a2 (b2a2) и e14a2 (b3a2) транслокации p210 в сравнении с зарегистрированным в России аналогом.

Материалы и методы. В качестве образцов использовали 50 проб периферической крови. Из них 39 проб принадлежали пациентам с установленным диагнозом ХМЛ, 11 образцов от здоровых участников использовались для подтверждения аналитической специфичности. В состав набора реагентов входят разработанные праймеры и флуоресцентно-меченые зонды, концентрация которых была подобрана экспериментально, а также оригинальные реагенты производства ФГБУ «ЦСП» ФМБА (Россия). Статистический анализ проводился с использованием программы StatTech v.4.5.0 (разработчик — ООО «Статтех», Россия). Различия считались значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. Экспериментальные данные по определению аналитических и диагностических характеристик разработанного набора показали следующие результаты: относительная чувствительность, определяемая с помощью клеточных стандартов, составила 0,01%. Воспроизводимая аналитическая чувствительность составила 100 копий/мл (CV = 1,86%). При проверке аналитической специфичности было показано отсутствие ложноспецифических выходов. При тестировании реагентов тест-системы на клинических образцах было выявлено полное совпадение (100%) с результатами, полученными при использовании аналога зарегистрированного в России набора.

Выводы. Апробация разработанного нами набора реагентов продемонстрировала достаточно высокие показатели аналитической и диагностической чувствительности, что позволит обнаруживать и выявлять количество мРНК химерного гена *BCR::ABL1* как для диагностики, назначения своевременной и точной терапии, так и для мониторинга минимальной остаточной болезни.

Ключевые слова: хронический миелолейкоз; химерный ген BCR::ABL1; молекулярно-генетический мониторинг

Для цитирования: Авдонина М.А., Куклина Н.Г., Главацкая А.А., Дмитриев В.К., Чегодарь А.С., Данишевич А.М., Бодунова Н.А., Абрамов И.С., Шипулин Г.А. Разработка и оценка набора реагентов для количественного определения уровня экспрессии мРНК химерного гена *BCR::ABL1*. *Медицина экстремальных ситуаций.* 2025;27(1):74–79. https://doi.org/10.47183/mes.2024-244

Финансирование: работа выполнена без спонсорской поддержки.

Соответствие принципам этики: исследование одобрено на заседании независимого этического комитета (выписка из протокола № 12/2019 от 16.12.2019). Все участники подписали добровольное информированное согласие на исследование.

Потенциальный конфликт интересов: Г.А. Шипулин является членом редакционного совета журнала «Медицина экстремальных ситуаций». Остальные авторы декларируют отсутствие потенциального конфликта интересов.

✉ Авдонина Мария Алексеевна MAvdonina@cspmz.ru

Статья поступила: 02.10.2024 **После доработки:** 09.12.2024 **Принята к публикации:** 12.12.2024 **Online first:** 30.12.2024

DEVELOPMENT AND EVALUATION OF A REAGENT SET FOR QUANTITATION OF MRNA EXPRESSION LEVEL OF CHIMERIC *BCR::ABL1* GENE

Mariia A. Avdonina[1]✉, Natalia G. Kuklina[1,2], Arina A. Glavatskaya[1,2], Vladislav K. Dmitriev[3], Anzhelika S. Chegodar[3], Anastasia M. Danishevich[3], Natalia A. Bodunova[3], Ivan S. Abramov[3], German A. Shipulin[1]

[1] Centre for Strategic Planning, of the Federal Medical and Biological Agency, Moscow, Russia

[2] Izmerov Research Institute of Occupational Health, Moscow, Russia

[3] Loginov Moscow Clinical Scientific Centre, Moscow, Russia

Introduction. Chronic myeloid leukemia is a myeloproliferative disease associated with a t(9;22)(q34;q11) translocation resulting in a chimeric *BCR::ABL1* gene. Molecular genetic studies are used as a diagnostic method and for determination of minimal residual disease by quantification of the mRNA expression level of the chimeric *BCR::ABL1* gene.

Objective. To validate the developed multiplex test system for simultaneous quantitative determination of e13a2 (b2a2) and e14a2 (b3a2) transcripts of translocation p210 in comparison with the analog system registered in Russia.

Materials and methods. In total, 50 peripheral blood samples were used. Of these, 39 belonged to patients diagnosed with CML; 11 blood samples from healthy people were used to confirm analytical specificity. The reagent kit includes the specifically developed primers and fluorescently labeled probes, the concentration of which was selected experimentally, as well as original reagents manufactured by the Centre for Strategic Planning, Federal Medical and Biological Agency (Russia). Statistical analysis was performed using the StatTech v.4.5.0 software (developed by StatTech, Russia). Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results. The conducted analytical and diagnostic characterization of the developed kit showed the following results. The relative sensitivity determined using cell standards was 0.01 %. The reproducible analytical sensitivity was 100 copies/mL (CV = 1.86 %). In analytical specificity testing, the absence of false results was shown. When testing the reagents of the test system on clinical samples, the complete convergence (100 %) with the results obtained using the reference kit was revealed.

© М.А. Авдонина, Н.Г. Куклина, А.А. Главацкая, В.К. Дмитриев, А.С. Чегодарь, А.М. Данишевич, Н.А. Бодунова, И.С. Абрамов, Г.А. Шипулин, 2024

Conclusions. Approbation of the developed reagent set showed its sufficiently high analytical sensitivity and diagnostic sensitivity. This set can be used for identification and quantitative determination of the mRNA of the chimeric *BCR::ABL1* gene for the purposes of diagnosis, timely and accurate therapy, and monitoring of minimal residual disease.

Keywords: chronic myeloid leukemia; chimeric *BCR::ABL1* gene; molecular genetic monitoring

For citation: Avdonina M.A., Kuklina N.G., Glavatskaya A.A., Dmitriev V.K., Chegodar A.S., Danishevich A.M., Bodunova N.A., Abramov I.S., Shipulin G.A. Development and evaluation of a reagent set for quantitation of mRNA expression level of chimeric *BCR::ABL1* gene. *Extreme Medicine*. 2025;27(1):74–79. https://doi.org/10.47183/mes.2024-244

Funding: the work was carried out without sponsorship.

Compliance with the principles of ethics: the study was approved by the Ethics committee (Protocol No. 12/2019 dated 16 Dec. 2019). All participants signed a voluntary informed consent for the study.

Potential conflict of interest: G.A. Shipulin is a member of the Editorial Council of Extreme Medicine. Other authors declare no potential conflict of interest.

✉ Mariia A. Avdonina MAvdonina@cspmz.ru

Received: 2 Oct. 2024 **Revised:** 9 Dec. 2024. **Accepted:** 12 Dec. 2024. **Online first:** 30 Dec. 2024

ВВЕДЕНИЕ

Хронический миелолейкоз (ХМЛ) представляет собой клональное опухолевое миелопролиферативное новообразование, обусловленное злокачественным перерождением стволовых гемопоэтических клеток и характеризующееся усилением пролиферации гранулоцитарного ростка без потери способности к дифференцировке, гиперплазией миелоидной ткани, миелоидной метаплазией кроветворных органов, ассоциированное с хромосомной аномалией — транслокацией t(9;22)(q34;q11) так называемой филадельфийской хромосомы, в результате которой образуется химерный ген *BCR::ABL1* [1]. Данное слияние является наиболее частой цитогенетической аномалией у взрослых пациентов с хроническим миелолейкозом (ХМЛ) — в 95% случаев, а также с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) — в 30% у взрослых и примерно в 5% у детей[1] [1].

По данным статистики за 2022 год в России было выявлено 1087 новых случаев заболевания ХМЛ; среди них 54% случаев у женщин и 47% случаев у мужчин. Указанная нозология чаще всего (в 28,9% случаев) регистрируется у лиц в возрасте 60–69 лет, в 16,5% случаев ХМЛ выявлен у людей в возрастах 50–59 и 70–79 лет, частота встречаемости ХМЛ в возрасте 30–39 лет составляет 12% [2].

Диагностика транслокации осуществляется с помощью цитогенетического исследования (кариотип) костного мозга либо молекулярно-цитогенетического исследования (FISH-метод), а также определением количественного уровня экспрессии мРНК *BCR::ABL1* p210 для транскриптов e13a2 или e14a2[2].

Целью современной терапии является достижение большого молекулярного ответа (БМО > 3,0), глубокого молекулярного ответа (МО ≥ 4,0) и последующего предотвращения появления опухолевых клонов [3, 4]. Для мониторинга ответа на лечение ингибиторами тирозинкиназ (ИТК) используются несколько методов оценки: полный гематологический ответ, определяемый путем исследования полного количества клеток крови, дифференцированный, выполняемый с помощью проточной цитометрии, и полный цитологический ответ, оцениваемый с использованием аспирата костного мозга и образцов биопсии на основании изучения молекулярного ответа с помощью количественной ПЦР [5].

Наиболее чувствительным методом оценки минимальной остаточной болезни является ПЦР, однако в большинстве лабораторий используются наборы реагентов различных производителей, вследствие чего возникает высокая межлабораторная вариабельность полученных результатов, что может привести к несоответствию сравниваемых показателей и повлиять на выбор тактики в лечении пациентов. Согласно рекомендациям Европейской сети по лейкемии и Национальной комплексной онкологической сети (National Comprehensive Cancer Network), с целью гармонизации молекулярного мониторинга ХМЛ необходимо контролировать уровни мРНК *BCR::ABL1* с использованием международной шкалы (IS), которая основана на стандартизированном базовом уровне транскрипта, представленном в исследовании Международного рандомизированного исследования интерферона и STI571 (International Randomized Study of Interferon and STI571–IRIS) [3]. По результатам проведенного исследования было предложено оценивать логарифмическое снижение *BCR::ABL1* (отношение IS) во время терапии по сравнению с исходным соотношением IRIS при постановке диагноза [6, 7]. Для применения данной Международной шкалы каждая лаборатория должна откалибровать полученные результаты, используя коэффициент преобразования (CF), числовое значение которого необходимо умножать на количественные показатели, полученные в конкретной лаборатории. С целью определения коэффициента преобразования, индивидуального для каждой лаборатории, Всемирная организация здравоохранения создала международную генетическую панель для количественной оценки транскриптов *BCR::ABL1* с помощью ПЦР, содержащую четыре различных варианта (10, 1, 0,1, 0,01%), с использованием клеточной линии K562, разведенной в клеточной линии, не имеющей слияния *BCR::ABL1* [9].

По рекомендациям Международных руководств для диагностики экспрессии мРНК *BCR::ABL1* и мониторинга минимальной остаточной болезни необходимо использовать количественный метод ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с чувствительностью обнаружения ниже, чем МО 4,5 (0,0032% IS) [4, 9]. Использование реагентов с недостаточной чувствительностью может привести к получению некорректных результатов анализов и, как следствие, к преждевременному прекращению

[1] Клинические рекомендации. Хронический миелоидный лейкоз. С92.1. Возрастная группа: Взрослые.
[2] Там же.

лечения и дальнейшему развитию заболевания [6]. Согласно Клиническим рекомендациям определен порядок периодического мониторинга уровня экспрессии: при уровне экспрессии мРНК p210 *BCR::ABL1* ниже БМО количественная ПЦР в реальном времени проводится каждые 3 месяца, по достижении БМО — каждые полгода [10, 11]. В этой связи актуальными являются разработка, апробация и внедрение в клинико-лабораторную практику отечественных высокочувствительных специфичных диагностических наборов реагентов для определения уровня транскриптов *BCR::ABL1* с помощью ПЦР.

Цель работы — разработка и оценка набора реагентов для количественного определения уровня экспрессии мРНК химерного гена *BCR::ABL1* в образцах периферической крови.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 50 человек в возрасте от 20 до 80 лет, среди них 28 мужчин и 22 женщины. В основную группу были включены 39 пациентов с установленным клиническим диагнозом ХМЛ. Для проверки аналитической специфичности на отсутствие ложноположительных результатов были использованы образцы крови 11 практически здоровых лиц, сопоставимых по полу и возрасту с основной группой пациентов.

Образцы периферической крови были получены в МКНЦ им. Логинова после информационного согласия. Забор крови осуществляли в вакуумные пробирки с K2 ЭДТА (Китай, РУ № РЗН 2013/921 от 25.05.2018). Для подтверждения диагноза ХМЛ и определения уровня экспрессии мРНК химерного гена *BCR::ABL1* использовали набор реагентов для выявления и количественного определения мРНК химерного гена *bcr-abl* (вариант M-bcr) и мРНК гена *abl* в клиническом материале методом ПЦР с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени АмплиСенс® Лейкоз Квант M-bcr-FRT (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия, РУ ФСР 2007/00579) согласно инструкции производителя.

Выделение РНК осуществлялось с помощью набора реагентов АмплиТест® РИБО-преп (ФГБУ «ЦСП» ФМБА, Россия) согласно инструкции. Эффективность выделения мРНК определяли с помощью флуориметра Qubit 4 (Thermo Scientific, США).

В состав разработанного набора реагентов входят специфичные праймеры и флуоресцентно-меченные зонды, наличие которых позволяет проводить одновременное обнаружение экспрессии химерного гена *BCR::ABL1* и гена *ABL1*. Олигонуклеотиды для выявления экспрессии химерного гена были подобраны на основании рекомендаций международной группы Europe Against Cancer (EAC) 2003 г. и позволили выявлять 2 наиболее часто встречающихся химерных транскрипта: e13a2 (b2a2) и e14a2 (b3a2). Контроль взятия материала, выделение РНК, прохождение реакции обратной транскрипции и ПЦР осуществляли с помощью эндогенного внутреннего контроля, в качестве которого были использованы специфично подобранные праймеры и зонд на ген *ABL1*.

Концентрации праймеров и флуоресцентно-меченых зондов были подобраны экспериментально.

Реакционную смесь готовили с использованием следующих реагентов (производство ФГБУ «ЦСП» ФМБА, Россия): 5x ПЦР-буфер (5 мкл), 10 mM dNTP (0,5 мкл), Taq-полимераза (0,5 мкл), ревертаза MMLV (0,25 мкл).

Условия ПЦР амплификации: обратная транскрипция при 50 °C (30 мин), предварительный прогрев 95 °C (15 мин), далее 45 циклов: денатурация 95 °C (10 сек) и отжиг 60 °C (60 сек). Детекция флуоресцентного сигнала по каналу FAM и HEX.

Интерпретацию результатов проводили только при правильных результатах для отрицательного контрольного образца (ОКО) и положительного контрольного образца (ПКО) при каждой постановке. В качестве ОКО была использована стерильная деионизованная вода, ПКО представляет собой смесь бактериофаговых препаратов, содержащих последовательности мРНК транслокации p210 химерного гена *BCR::ABL1* и мРНК контрольного гена *ABL1*.

В качестве калибраторов использовались плазмиды, содержащие последовательности мРНК транслокации p210 химерного гена *BCR::ABL1* и мРНК контрольного гена *ABL1* с известной концентрацией. Концентрация плазмид была измерена с помощью системы QX200 для цифровой ПЦР (Bio-Rad, США). Плазмиды использовали в пяти 10-кратных разведениях примерно от 10 до 1×10^6 копий/мл для определения линейности и эффективности ОТ-ПЦР. Реакция одностадийной ОТ-ПЦР проводилась на амплификаторе ДТ-96 («ДНК-Технология», Россия).

Для установления предела обнаружения специфичности и чувствительности разработанного набора использовалась РНК, выделенная из клеточной линии K562 (*BCR::ABL1* — положительная) и HeLa (образцы дикого типа), а также образцы от пациентов с ХМЛ и здоровых доноров. Для определения относительной чувствительности были приготовлены клеточные стандарты с определенными концентрациями 10, 1, 0,1, 0,01% согласно процедуре, описанной White et al., 2010 г [8]. Количество клеток подсчитывали с помощью автоматического счетчика Countess II FL Automated Cell Counter (Thermo FS). Полученные стандарты были калиброваны согласно протоколу WHO [12].

Оценка относительного уровня экспрессии мРНК химерного гена *BCR::ABL1* проводилась на основании расчетов в отношении *BCR::ABL1/ABL1* по следующей формуле:

$$\frac{\text{количество копий } BCR::ABL1}{\text{количество копий } ABL1} \times 100\%.$$

Статистический анализ проводился с использованием программы StatTech v.4.5.0 (разработчик — ООО «Статтех», Россия). Различия считались значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате апробации разработанного нами набора реагентов были получены следующие результаты. Параметры ПЦР в реальном времени: эффективность в пределах 95–105%, коэффициент корреляции $r = 0,99$. По данным экспериментальных работ с использованием клеточных стандартов относительная чувствительность разработанного набора составила 0,01%, что соответствует уровню ПМО (полного молекулярного ответа)[3]. Воспроизводимая чувствительность по контрольным плазмидам и на РНК, выделенной из культуры клеток K562, — 100 копий/мл (CV% = 1,86).

[3] Клинические рекомендации. Хронический миелоидный лейкоз. С92.1. Возрастная группа: Взрослые.

Проверка аналитической специфичности показала отсутствие ложноположительных результатов при тестировании образцов, полученных от здоровых пациентов, при этом определялся только сигнал внутреннего контроля по каналу HEX и отсутствовал сигнал детекции мРНК химерного гена *BCR::ABL1* по каналу FAM.

В исследовании была проанализирована случайная выборка образцов периферической крови больных с клиническим диагнозом ХМЛ. В основной группе экспрессия мРНК транслокации p210 химерного гена *BCR::ABL1* была выявлена во всех 39 образцах. Количество положительных результатов среди мужчин составляло 21 (53,8%), среди женщин — 18 (46,2%). Частота встречаемости транслокации в возрастной категории 20–29 лет составила 3,2%, в категории от 30 до 49 лет — 12,9% случаев, в возрастной группе 50–59 лет — 9,6%, в возрастах 60–69 и 70–79 лет — 19,3% пациентов, 6,4% случаев встречаемости транслокации зарегистрировано в возрастной категории от 80 лет, что согласуется со статистическими данными.

Наибольшее количество пациентов с отмеченными изменениями регистрировали в возрастных категориях 60–69 и 70–79 лет, что также согласуется со статистическими данными по России [2]. Пациенты моложе 20 лет представлены не были; это связано с небольшой выборкой и заболеваемостью в этом возрасте: около 1% по стране. ХМЛ одинаково распространен как у мужчин, так и у женщин [13, 14].

Относительная экспрессия гена *BCR::ABL1* (белок p210, варианты b3a2 или b2a2) по результатам тестирования в образцах периферической крови больных с клиническим диагнозом ХМЛ составила от 2,3 до 100%. При этом количество копий гена *ABL1* находилось в диапазоне от 2200 до 17 595 440 копий/мл в группе с диагнозом ХМЛ и от 11 675 896 до 18 634 577 копий/мл в группе здоровых.

Согласно Лабораторным рекомендациям по диагностике и лечению хронического миелоидного лейкоза (European LeukemiaNet) минимальное количество референтных генных транскриптов независимо от того, обнаружен *BCR::ABL1* или нет, должно быть не менее 10 000 *ABL1* для MR 4, 32 000 для MR 4,5, 100 000 для MR 5 в том же объеме кДНК, в котором тестируется образец на *BCR::ABL1* [4]. Количество полученных транскриптов референтного гена соответствует международным стандартам, и результаты могут быть включены в клинические отчеты.

Во время тестирования пациентов из группы с клиническим диагнозом ХМЛ было выявлено 8 образцов IS ≤ 1% *BCR::ABL1* (MR 2), 9 образцов IS ≤ 0,1% (MR 3), 7 образцов IS ≤ 0,01% (MR 4), 7 образцов IS ≤ 0,0032% (MR 4,5). Объектом исследования были образцы крови рандомных пациентов. Критерием включения в основную группу пациентов было наличие подтвержденного диагноза ХМЛ, установленного с использованием зарегистрированного в России аналога «АмплиСенс® Лейкоз Квант M-bcr-FRT».

Апробация разработанного набора реагентов на образцах периферической крови с известным уровнем экспрессии химерного гена *BCR::ABL1* продемонстрировала полное совпадение с результатами, полученными при использовании набора реагентов «АмплиСенс® Лейкоз Квант M-bcr-FRT».

При установлении диагноза ХМЛ для выявления химерного гена *BCR::ABL1* применяют молекулярно-генетическое исследование (FISH-метод), а также определение экспрессии мРНК *BCR::ABL1* p210 (количественное) для химерных транскриптов e13a2 или e14a2 методом ПЦР [15]. Данный метод также используют при оценке уровня ответа на лечение пациентов с помощью ингибиторов тирозинкиназы (ИТК) и определении уровня минимальной остаточной болезни, когда количество остаточных лейкемических клеток ниже уровня чувствительности цитогенетических исследований [16].

В настоящее время на рынке существует ряд отечественных тест-систем, направленных на выявление мРНК химерного гена *BCR::ABL1*. Например, «АмплиСенс® Лейкоз Квант M-bcr-FRT» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора), ОНКОСКРИН 1-1-Q (ООО «ГеноТехнология»), имеющие регистрационные удостоверения, так и без регистрационных удостоверений: «Миелоскрин BCR-ABL» («Формула гена»), BCR-ABL1 Mbcr RQ Kit® (ООО «Иноген»).

Аналитическая чувствительность набора «АмплиСенс® Лейкоз Квант M-bcr-FRT» по количеству воспроизводимых копий ниже в 2 раза по сравнению с анализируемым нами набором и составляет 237 копий/мл vs 100 копий/мл[4]. В то же время проведение анализа с использованием набора «АмплиСенс® Лейкоз Квант M-bcr-FRT» предполагает постановку первоначально изолированной реакции обратной транскрипции, а далее проведение ПЦР в реальном времени, что довольно трудозатратно. В отличие от набора сравнения, в разработанном комплекте использовали смесь, позволяющую детектировать экспрессию мРНК *BCR::ABL1* p210 в одной пробирке.

Результаты количественной оценки мРНК *BCR::ABL1*, полученные с использованием тестируемого набора, совпали с результатами, зарегистрированными с помощью набора «АмплиСенс® Лейкоз Квант M-bcr-FRT», во всех образцах. Оба набора могут идентифицировать по крайней мере 4,5-кратное снижение отношения IS.

С помощью набора «BCR/ABL МУЛЬТИТЕСТ» возможно одновременное выявление химерных транскриптов p210, p190 и p230 гена *BCR::ABL1* с применением мультиплексного формата ОТ-ПЦР, что экономически целесообразно при проведении первичного скрининга [17].

H. Kitamura et al. в 2019 г. представили новый высокочувствительный двухэтапный набор реагентов ОТ-ПЦР (Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией) с диагностической чувствительностью IS 0,01%, которая была определена с помощью вторичной контрольной панели Armored RNA Quant® (ARQ) (Asuragen, Inc., Остин, Техас, США) [6].

М.В. Дубиной и соавт. были определены аналитические показатели теста, при котором специфичность должна стремиться к 100%, адекватным показателю уровня чувствительности 3–5 копий мРНК на реакцию, при этом отношение транскрипта *BCR::ABL1* к гену-нормализатору должно составлять 0,01% (соответствует уровню ПМО) [18].

По сравнению с аналогом разработанный набор имеет ряд преимуществ. Во-первых, у него более высокие аналитические показатели. Во-вторых, использование одностадийной ОТ-ПЦР дает возможность значительно снизить риск контаминации, технических ошибок при раскапывании реагентов и образцов, а также снижает время

[4] https://roszdravnadzor.gov.ru/services/misearch

работы персонала. В-третьих, применяемая мультиплексная смесь специфических зондов и праймеров по двум каналам детекции позволяет существенно сократить объем используемого расходного материала.

Таким образом, нами был создана высокочувствительная мультиплексная тест-система, позволяющая одновременно детектировать транскрипты e13a2 (b2a2) и e14a2 (b3a2) транслокации p210, а также содержащая эндогенный внутренний контроль с оценкой правильности прохождения всех этапов ПЦР, включая выделение РНК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Количественное определение и обнаружение транслокации при ХМЛ важны для выбора протоколов лечения и мониторинга рецидивов заболевания, а чувствительный и точный мониторинг минимальной остаточной болезни играет важную роль в управлении лечения ХМЛ, облегчая принятие решения о прекращении лечения и выявляя пациентов с риском прогрессирования. Апробирование разработанной тест-системы, позволяющей выявлять транскрипт p210 химерного гена *BCR::ABL1,* показало достаточно высокий порядок диагностической специфичности и чувствительности разработанного набора реагентов для количественного выявления уровня относительной экспрессии мРНК химерного гена *BCR::ABL1* в крови с целью верификации диагноза ХМЛ на уровне 100%. Использование эндогенного внутреннего контроля (ген *ABL1*) позволило контролировать основные этапы ПЦР-исследования (пробоподготовку, выделение РНК, реакцию обратной транскрипции и амплификации).

Литература / References

1. Ravandi F, Kebriaei P. Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2009;23(5):1043–63. https://doi.org/10.1016/j.hoc.2009.07.007
2. Каприн АД, ред. Злокачественные новообразования в России в 2022 году (заболеваемость и смертность) М.:МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2023.
Kaprin AD, red. Malignant neoplasms in Russia in 2022 (morbidity and mortality). M.: P.A. Herzen Moscow State Medical Research Institute — branch of the Federal State Budgetary Institution NMIC Radiology of the Ministry of Health of Russia; 2023(In Russ.).
3. Etienne G, Guilhot J, Rea D, Rigal-Huguet F, Nicolini F, Aude C, et al. Long-Term Follow-Up of the French Stop Imatinib (STIM1) Study in Patients With Chronic Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol.* 2017;35(3):298–305. https://doi.org/10.1200/JCO.2016.68.2914
4. Hochhaus A., Baccarani M, Silver RT, Schiffer C, Apperley JF, Cervantes F., et al. European LeukemiaNet 2020 Recommendations for Treating Chronic Myeloid Leukemia. Leukemia. 2020;34(4):966–84. https://doi.org/10.1038/s41375-020-0776-2
5. Kantarjian H., Schiffer C., Jones D., Cortes J. Monitoring the response and course of chronic myeloid leukemia in the modern era of BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors: practical advice on the use and interpretation of monitoring methods. *Blood*. 2008;111(4): 1774–80. https://doi.org/10.1182/blood-2007-09-110189
6. Kitamura H, Tabe Y, Ai T, Tsuchiya K, Yuri M, Misawa S, et al. A new highly sensitive real-time quantitative-PCR method for detection of BCR-ABL1 to monitor minimal residual disease in chronic myeloid leukemia after discontinuation of imatinib. *PLoS One*. 2019;14(3):e0207170. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207170
7. Martinez RJ, Kang Q, Nennig D, Bailey N, Brown N, Betz B, et al. One-Step Multiplexed Droplet Digital Polymerase Chain Reaction for Quantification of p190 BCR-ABL1 Fusion Transcript in B-Lymphoblastic Leukemia. *Arch Pathol Lab Med.* 2022;146(1):92–100. https://doi:10.3390/diagnostics12061305
8. White H.E, Matejtschuk P, Rigsby P, Gabert J, Lin F, Wang YL, et al. Establishment of the first World Health Organization International Genetic Reference Panel for quantitation of BCR-ABL mRNA. *Blood*. 2010;116(22):e111–7. https://doi.org/10.1182/blood-2010-06-291641
9. Özdemir NZ, Kılıçaslan NA, Yılmaz M, Eşkazan AE. Guidelines for the Treatment of Chronic Myeloid Leukemia From the NCCN and ELN: Differences and Similarities. *Int J Hematol*. 2023;117(1):3–15. https://doi.org/10.1007/s12185-022-03446-1
10. Kottwitz D, Hadi EH, Amrani E, Cabezas S, Dehbi H, Nadifi S, et al. Evaluation of a novel multiplex RT-qPCR assay for the quantification of leukemia-associated BCR-ABL1 translocation. *Int J Hematol*. 2015;102(3):335–41. https://doi.org/10.1007/s12185-015-1839-4
11. Franke GN, Maier J, Wildenberger K, Cross M, Giles FJ, Müller M.C, et al. Comparison of Real-Time Quantitative PCR and Digital Droplet PCR for BCR-ABL1 Monitoring in Patients with Chronic Myeloid Leukemia Comparative Study. *J Mol Diagn.* 2020;22(1):81–9. https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2019.08.007
12. International Standard, 1st WHO International Genetic Reference Panel for the quantitation of *BCR-ABL1* translocation NIBSC code: 09/138
13. Winn AN, Atallah E, Cortes J, Deininger MWN, Kota V, Larson RA, et al. Estimated Savings After Stopping Tyrosine Kinase Inhibitor Treatment Among Patients With Chronic Myeloid Leukemia. *JAMA Netw Open*. 2023;6(12):e2347950. https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2023.47950
14. Cantoni N, Sommavilla R, Seitz P, Kulenkampff E, Kahn S, Lambert JF, et al. A multicenter real-world evidence study in the Swiss treatment landscape of chronic myeloid leukemia. *BMC Cancer.* 2022;22(1):1192. https://doi.org/10.1186/s12885-022-10241-y
15. Cross NCP, Ernst T, Branford S, Cayuela J-M ,Deininger M, Fabarius A,et al. European LeukemiaNet laboratory recommendations for the diagnosis and management of chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2023;37(11):2150–67. https://doi.org/10.1038/s41375-023-02048-y
16. Рябчикова НР, Минниахметов ИР, Сафуанова ГШ, Исламгулов ДВ, Карунас АС, Хуснутдинова ЭК. Хронический миелолейкоз: молекулярный мониторинг в клинической практике. *Онкогематология*. 2013;8(1):7–16.
Ryabchikova NR, Minniakhmetov IR, Safuanova GSh, Islamgulov DV, Karunas AS, Khusnutdinova EE. Chronic myelogenous leukemia: molecular monitoring in clinical practice. *Oncohematology*. 2013;8(1):7–16 (In Russ.). https://doi.org/10.17650/1818-8346-2013-8-1-7-16
17. Горбенко АС, Столяр МА, Васильев ЕВ, Михалёв МА, Бахтина ВИ, Ольховик ТИ, и др. Использование набора «BCR/ABL — мультитест» в алгоритме лабораторной диагностики онкогематологических заболеваний: экономические аспекты. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021;66(9):571–6.
Gorbenko AS, Stolyar MA, Vasiliev EV, Mikhalev MA, Bakhtina VI, Olkhovik TI, et al. Use of the «BCR/ABL — multitest» kit in the algorithm of laboratory diagnostics of oncohematological diseases: economic aspects. *Klinicheskaia Laboratornaia Diagnostika*.2021;66(9):571–6. https://doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-9-571-576
18. Дубина МВ, Куевда ДА, Хомякова ТЕ, Цаур ГА, Куцев СИ,

Зарицкий АЮ. Молекулярный мониторинг эффективности терапии больных хроническим миелолейкозом в России. *Современная онкология*. 2010;4(12):9–17.
Dubina MV, Kuevda DA, Khomyakova TE, Tsaur GA, Kutsev SI, Zaritskiy AY. Molecular monitoring of the effectiveness of therapy in patients with chronic myeloid leukemia in Russia. *Journal of Modern Oncology*. 2010; 4(12):9–17 (In Russ.).
EDN: NCXVBJ

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: М.А. Авдонина — написание текста статьи, обзор публикаций по теме статьи; Н.Г. Куклина — планирование исследования, обзор публикаций по теме статьи; А.А. Главацкая — проведение экспериментальных работ; В.К. Дмитриев — проведение экспериментальных работ, сбор и анализ данных; А.С. Чеготарь — проведение экспериментальных работ, сбор и анализ данных; А.М. Данишевич — обзор публикаций по теме статьи; Н.А. Бодунова — обзор публикаций по теме статьи, редактирование текста статьи; И.С. Абрамов — сбор и анализ данных; Г.А. Шипулин — редактирование статьи, окончательное утверждение рукописи.

ОБ АВТОРАХ

Авдонина Мария Алексеевна, канд. биол. наук
https://orcid.org/0000-0002-8605-7432
marysheilaus@gmail.com

Куклина Наталья Григорьевна, канд. биол. наук
https://orcid.org/0000-0002-8255-6226
NKuklina@cspfmba.ru

Главацкая Арина Андреевна
https://orcid.org/0000-0001-6223-8258
abessonova1705@gmail.com

Дмитриев Владислав Константинович
https://orcid.org/0009-0004-6282-0036
meetyourmeetr1ch@gmail.com

Чегодарь Анжелика Сергеевна
https://orcid.org/0000-0001-7753-3698
a.chegodar@mknc.ru

Данишевич Анастасия Михайловна
https://orcid.org/0000-0002-3573-8342
a.danishevich@mknc.ru

Бодунова Наталья Александровна, канд. мед. наук
https://orcid.org/0000-0002-3119-7673
n.bodunova@mknc.ru

Абрамов Иван Сергеевич
https://orcid.org/0000-0002-6954-1564
i.abramov@mknc.ru

Шипулин Герман Александрович, канд. мед. наук
https://orcid.org/0000-0002-9734-0620
shipulin@cspfmba.ru