

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Горбенко А.С.^{1,2}, Столяр М.А.^{1,2}, Васильев Е.В.³, Михалёв М.А.⁴, Бахтина В.И.^{3,5}, Ольховик Т.И.⁴, Мочалова Е.Е.⁵, Орлова К.Э.⁵, Ольховский И.А.^{1,2}

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НАБОРА «BCR/ABL – МУЛЬТИТЕСТ» В АЛГОРИТМЕ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ: ЭКОНОМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

¹Красноярский филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава РФ, 660036, Красноярск, Россия;

²ФГБНУ Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный Центр Сибирского отделения РАН», 660036, Красноярск, Россия;

³КГБУЗ Краевая клиническая больница, 660022, Красноярск, Россия;

⁴КГБУЗ Красноярская межрайонная клиническая больница №7, 660003, Красноярск, Россия;

⁵ФГБОУ ВО Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава РФ, 660022, Красноярск, Россия

Аномальные мРНК гибридного гена BCR/ABL в подавляющем числе случаев в зависимости от точки слияния генов иницируют синтез протеинов с массой 210 кДа (p210), 190 кДа (p190) и 230 кДа (p230). Экспрессия варианта p210 наиболее часто встречается при ХМЛ (95% случаев), в то время как варианты p190 и p230 при этом заболевании встречаются гораздо реже (1–4%). Напротив, при ОЛЛ преобладает транскрипт p190 – до 80% всех BCR/ABL позитивных ОЛЛ. Определение экспрессии гена BCR/ABL регламентируется клиническими рекомендациями по диагностике ХМЛ и ОЛЛ как последовательные тесты в соответствии с частотой их встречаемости. Вместе с тем, в условиях первичного тестирования пациентов с подозрением на онкогематологические заболевания при низкой распространенности в когорте обследуемых лиц BCR/ABL позитивных пациентов последовательное тестирование сопряжено с низкой экономической эффективностью.

Цель: апробация параллельного алгоритма одновременного выявления основных вариантов химерных транскриптов BCR/ABL (p210, p190 и p230) с использованием мультиплексного формата ОТ-ПЦР, реализованного в наборе «BCR/ABL-МУЛЬТИТЕСТ». В работе использовались обезличенные пробы крови пациентов, направленных в лабораторию с подозрением на наличие ХМЛ, а также пробы пациентов с ОЛЛ. Тестирование проб крови проводили с использованием двух вариантов алгоритма: последовательного определения отдельных транскриптов BCR/ABL и параллельного выявления всех трех вариантов транскриптов с помощью разработанного набора «BCR/ABL-МУЛЬТИТЕСТ». Для детекции транскрипта p210, использовали коммерческий набор «АмплиСенс® Лейкоз Квант M-bcr-FRT» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия). Одновременно применяли тест выявления всех трех вариантов транскриптов BCR/ABL с использованием набора реактивов «BCR/ABL-МУЛЬТИТЕСТ», основанного на монохромной мультиплексной реакции «в одной пробирке». Обратную транскрипцию осуществляли с использованием набора реактивов «РЕВЕРТА-Л» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Показано, что при использовании наборов «BCR/ABL-МУЛЬТИТЕСТ» и «АмплиСенс® Лейкоз Квант M-bcr-FRT» наблюдается высокий уровень корреляции количественных результатов определения химерного транскрипта BCR/ABL p210 ($r = 0,99$). При использовании предлагаемого параллельного алгоритма с первичным использованием набора «BCR/ABL-МУЛЬТИТЕСТ» из 95 пациентов с подозрением ХМЛ было выявлено 9 проб с транскриптом p210, один с p190 BCR/ABL и также в одном случае был обнаружен вариант транскрипта, характерный для хронического нейтрофильного лейкоза – p230 BCR/ABL. Расчетная стоимость выявления одного позитивного случая BCR/ABL при использовании параллельного алгоритма диагностики с набором «BCR/ABL-МУЛЬТИТЕСТ» при сложившемся потоке исследований сокращается примерно в 2 раза за счет уменьшения количества используемого лабораторного пластика и объема реакционной смеси, а также отсутствия необходимости повторных отдельных тестов для выявления p190 и p230.

Использование мультиплексной тест-системы ПЦР-РВ «BCR/ABL-МУЛЬТИТЕСТ», позволяет выявлять «в одной пробирке» все три основных варианта транскриптов BCR/ABL – p210, p190, p230 и достигать существенной экономии ресурсов при обследовании когорты пациентов с подозрением на ХМЛ и ОЛЛ и низкой встречаемостью позитивных образцов

Ключевые слова: ПЦР-РВ; BCR/ABL; ХМЛ; ОЛЛ

Для цитирования: Горбенко А.С., Столяр М.А., Васильев Е.В., Михалёв М.А., Бахтина В.И., Ольховик Т.И., Мочалова Е.Е., Орлова К.Э., Ольховский И.А. Использование набора «BCR/ABL – мультитест» в алгоритме лабораторной диагностики онкогематологических заболеваний: экономические аспекты. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66(9): 571–576. <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-9-571-576>

Для корреспонденции: Ольховский Игорь Алексеевич, канд. мед. наук, дир. Красноярского филиала ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии»; e-mail: krashemcenter@mail.ru

Gorbenko A.S.^{1,2}, Stolyar M.A.^{1,2}, Vasiliev E.V.³, Mikhalev M.A.⁴, Bakhtina V.I.^{3,5}, Olkhovik T.I.⁴, Mochalova E.E.⁵, Orlova K.E.⁵, Olkhovskiy I.A.^{1,2}

USE OF THE «BCR/ABL – MULTITEST» KIT IN THE ALGORITHM OF LABORATORY DIAGNOSTICS OF ONCOHEMATOLOGICAL DISEASES: ECONOMIC ASPECTS

¹Krasnoyarsk branch of the «National Research Center for Hematology» Department of Health, Krasnoyarsk, Russian Federation;

²Federal Research Center Krasnoyarsk Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation;

³Krasnoyarsk regional clinic Hospital, Krasnoyarsk, Russian Federation;

⁴Krasnoyarsk city clinical Hospital №7, Krasnoyarsk, Russian Federation;

⁵Prof. V.F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Abnormal mRNAs of the hybrid BCR-ABL gene in the majority of cases initiate the synthesis of proteins with a mass of 210 kDa (p210), 190 kDa (p190), and 230 kDa (p230). Expression of the p210 variant is most common in CML (95% of cases), while the p190 and p230 variants are less common (1-4%). On the contrary, p190 predominates in ALL. Measurement of BCR/ABL gene expression is included in clinical guidelines for the diagnosis of CML and ALL as sequential tests in accordance with their occurrence. At the same time, in the context of primary patients testing with suspected hematological malignancies with a low prevalence of BCR-ABL positive patients in the cohort of examined individuals, sequential testing is associated with low cost-effectiveness.

Purpose: approbation of a parallel algorithm for detecting all three (p210, p190 and p230) using the multiplex RT-PCR format implemented in the «BCR/ABL-MULTITEST» reagent kit.

We used anonymized blood samples from patients with suspected CML, as well as samples from ALL patients before starting therapy. Testing of blood samples was carried out using two variants of the algorithm: sequential determination of individual BCR-ABL transcripts and parallel determination using the developed set of reagents «BCR/ABL-MULTITEST». To detect the p210 transcript, a commercial kit «AmpliSens® Leukemia Quantum M-bcr-FRT» (Central Research Institute of Epidemiology of Rospotrebnadzor, Russia) was used. Simultaneously, a test was used to detect all three variants of BCR-ABL transcripts using the «BCR/ABL – MULTITEST» reagent kit based on a monochrome multiplex reaction «in one test tube». Reverse transcription were carried out using the REVERTA-L reagent kit (Central Research Institute of Epidemiology of Rospotrebnadzor, Russia) in accordance with the manufacturer's instructions.

Using the reagent kits «BCR/ABL-MULTITEST» and «AmpliSens® Leukemia Quantum M-bcr-FRT» there is a high level of correlation of quantitative results of determining the chimeric transcript BCR-ABL p210 ($r = 0.99$). When using the proposed parallel algorithm with the primary use of the «BCR/ABL-MULTITEST» reagent kit, out of 95 patients with suspected CML, 9 samples with p210 transcript were identified, one with p190 BCR / ABL, and in one case a transcript variant characteristic of chronic neutrophilic leukemia – p230 BCR / ABL.

The estimated cost for detecting one positive case of BCR-ABL when using the parallel diagnostic algorithm «BCR/ABL-MULTITEST» with a focused flow of studies is reduced by about 2 times due to a decrease in the amount of laboratory plastic used and the volume of the reaction mixture, as well as the absence of the need for repeated separate tests to detect p190 and p230.

The use of the multiplex PCR-RT test system «BCR/ABL-MULTITEST» allows detecting in one test tube all three main variants of BCR-ABL transcripts – p210, p190, p230 and achieving significant resource savings when examining a cohort of patients with suspected CML and ALL and low frequency of positive samples.

Key words: JAK2 mRNA; CLL; CML; multiple myeloma

For citation: Gorbenko A.S., Stolyar M.A., Vasiliev E.V., Mikhalev M.A., Bakhtina V.I., Olkhovik T.I., Mochalova E.E., Orlova K.E., Olkhovskiy I.A. Use of the «BCR/ABL – multitest» kit in the algorithm of laboratory diagnostics of oncohematological diseases: economic aspects. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (9): 571-576 (in Russ.). <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-9-571-576>

For correspondence: Olkhovskiy I.A., PhD, docent, director of Krasnoyarsk branch of the «National Research Center for Hematology» Department of Health, research fellow of the Krasnoyarsk Scientific Center SB RAS; e-mail: krashemcenter@mail.ru

Information about authors:

Stolyar M.A., <https://orcid.org/0000-0002-8037-9844>
Gorbenko A.S., <https://orcid.org/0000-0001-8756-2660>
Mikhalev M.A., <https://orcid.org/0000-0003-3769-3405>
Olkhovik T.I., <https://orcid.org/0000-0002-4526-1920>
Bakhtina V.I., <https://orcid.org/0000-0002-6465-9942>
Mochalova E.E., <https://orcid.org/0000-0001-8439-2854>
Orlova K.E., <https://orcid.org/0000-0002-5190-9316>
Olkhovskiy I.A., <https://orcid.org/0000-0003-2311-2219>

Acknowledgment. *This study was carried out within the framework of the state order «Development of diagnostic reagent kits for molecular genetic detection of oncogenic transcripts for the purpose of early diagnosis and monitoring of minimal residual disease in acute leukemia No. RK AAAA-A20-120021890163-5».*

Conflict of interest. *The authors declare no conflict of interest.*

Received 07.04.2021
Accepted 25.06.2021

Введение. Филадельфийская хромосома (Ph-хромосома) образуется в результате транслокации t(9;22) (q34;q11), при которой части двух хромосом (9-й и 22-й) меняются местами. В результате часть гена BCR из хромосомы 22 сливается с геном ABL на хромосоме 9. На матрице образовавшегося гибридного гена BCR-ABL в зависимости от локализации точки разрыва хромосом могут формироваться свыше 16 разных вариантов химерных РНК транскриптов BCR-ABL. В подавляющем большинстве случаев образуются транскрипты e13a2 (b2a2), e14a2 (b3a2), реже e1a2, e13a3 и e19/a2. Аномальные мРНК гибридного гена инициируют синтез соответствующих белков с массой 210 кДа (p210), 190 кДа (p190) и 230 кДа (p230). Белковые продукты гена BCR /ABL обладают аномальной тирозинкиназной активностью, неадекватно влияющей на пролиферацию, дифференцировку, активацию, адгезию и апоптоз клеток. Именно избыточная активность химерной BCR-ABL-тирозинкиназы определяет развитие хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ) и также вовлечена в патогенез отдельных вариантов острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ). Транскрипты BCR /ABL выявляются также при остром миелоидном лейкозе и остром лейкозе смешанного фенотипа [1–3]. Следует отметить, что BCR-ABL – ключевой диагностический маркер всех случаев ХМЛ. BCR-ABL-положительный вариант ОЛЛ выявляется у детей не чаще 5-7 %, но его частота в дебюте заболевания возрастает до 40 % к сократительному возрасту пациентов, а затем увеличивается на 10% в течение каждого последующего десятилетия жизни. При ОЛЛ с Ph-хромосомой примерно в одной четверти случаев экспрессируется p210 и примерно три четверти случаев характеризуются экспрессией p190 [4]. Протеин p230, образующийся на матрице транскрипта e19/a2, проявляет более низкую внутреннюю тирозинкиназную активность, чем p210 и p190 и связан с вялотекущим миелопротеративным заболеванием, называемым хроническим нейтрофильным лейкозом [4] и лишь однажды был описан при ОЛЛ [5].

На молекулярно-генетическом уровне транскрипт BCR-ABL чаще всего выявляется посредством полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) и выполнение данного исследования регламентируется клиническими рекомендациями при первичной диагностике ХМЛ, а в количественном формате для мониторинга эффективности терапии ХМЛ и BCR-ABL (оценка молекулярного ответа). Отрицательный результат теста на BCR-ABL учитывается также при диагностике Ph-негативных миелопротеративных неоплазий (МПН) – эссенциальной тромбоцитемии и первичном миелофиброзе [6].

Следует отметить, что для первичного выявления ХМЛ клиническими рекомендациями [3] предлагается последовательный алгоритм выявления отдельных транскриптов BCR-ABL: вначале определение экспрессии химерного транскрипта BCR-ABL p210, а при его отсутствии показано определение более редких транскриптов BCR-ABL (p190, p230). Учитывая поток направляемых в нашу лабораторию проб крови первичных пациентов и невысокую долю (менее 10-15%) среди них положительных результатов тестирования на BCR-ABL, нами предлагается параллельный алгоритм тестирования одновременно на все основные варианты BCR/AL, так как необходимость последовательной постановки тестов на p190 и p230 при отрицательном тесте на p210 существенно снижает экономическую эффективность

работы лаборатории и увеличивает время постановки окончательного диагноза.

Целью настоящей работы явилось апробация параллельного алгоритма выявления трех вариантов (p210, p190 и p230) BCR-ABL с использованием мультиплексного формата ОТ-ПЦР, реализованного в наборе «BCR/ABL-МУЛЬТИТЕСТ».

Материал и методы. Дизайн настоящего исследования заключался в сравнительном использовании двух вариантов алгоритма тестирования образцов венозной крови: последовательного определения отдельных транскриптов BCR-ABL и параллельного с помощью разработанного набора «BCR/ABL-МУЛЬТИТЕСТ». В работе использовались обезличенные пробы крови пациентов с подозрением на наличие ХМЛ, а также пробы пациентов с ОЛЛ, поступившие в лабораторию с 01.01 по 31.03 2021 г.

Выявление вариантов слияния химерного гена BCR-ABL проводили методом мультиплексной ПЦР в режиме «реального времени» (ПЦР-РВ) на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США). Для выделения РНК, выполнения обратной транскрипции и детекции транскрипта p210, использовали коммерческий набор «АмплиСенс® Лейкоз Квант М-bcr-FRT» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия). Транскрипты p190 и p230 определяли в пробах кДНК с отрицательным результатом на p210 также методом ПЦР-РВ в соответствии с описанными методиками [7] и [8].

Одновременно с традиционным последовательным алгоритмом применяли тест выявления всех трех вариантов BCR-ABL с использованием набора реактивов «BCR/ABL-МУЛЬТИТЕСТ», основанного на монохромной мультиплексной реакции «в одной пробирке». В этом случае выделение РНК проводили методом фенол-хлороформной экстракции, обратную транскрипцию проводили с использованием набора реагентов «РЕВЕРТА-Л» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) согласно инструкции производителя.

В соответствии с разработанной нами методикой, при использовании набора реагентов «BCR/ABL-МУЛЬТИТЕСТ», амплификацию проводили в 25 мкл смеси, содержащей: 100 мМ Трис-НСl, pH 8,8; 0,5 М КCl; 0,8% Nonidet P-40; 2 мМ MgCl₂; 0,2 мМ каждого из дНТФ; 10 мкл кДНК; по 0,3 мкМ каждого праймера и TaqMan зонда; 1 единицу активности SynTaq ДНК-полимеразы (ООО «НПО Синтол», Россия). Использовали следующую программу амплификации: предварительный прогрев при 95°C — 5 мин, далее 50 циклов: 95°C — 15 с, 60°C — 60 с, детекция флуоресцентного сигнала проводилась по каналу FAM в ходе ПЦР-РВ. Для нормализации получаемых данных в качестве гена «домашнего хозяйства» использовали ген ABL1.

В наборе использовали следующие праймеры и олигонуклеотидные зонды:

ENF501: TCCGCTGACCATCAAYAAGGA
ENR561: CACTCAGACCCTGAGGCTCAA
ENF402: CTGGCCCAACGATGGCGA
E19: TGGAGGAGGTGGGCATGAC
ENP541: FAM-CCCTTCAGCGCCAGTAGCATCTGA-BHQ1.

При оценке экономического эффекта ориентировались на стоимость реактивов коммерческих наборов (<https://www.helicon.ru/catalog/>; <https://genetechnology.ru>) в расчете на одно исследование в качественном формате реакции. Стоимость затрат на реактивы при альтер-

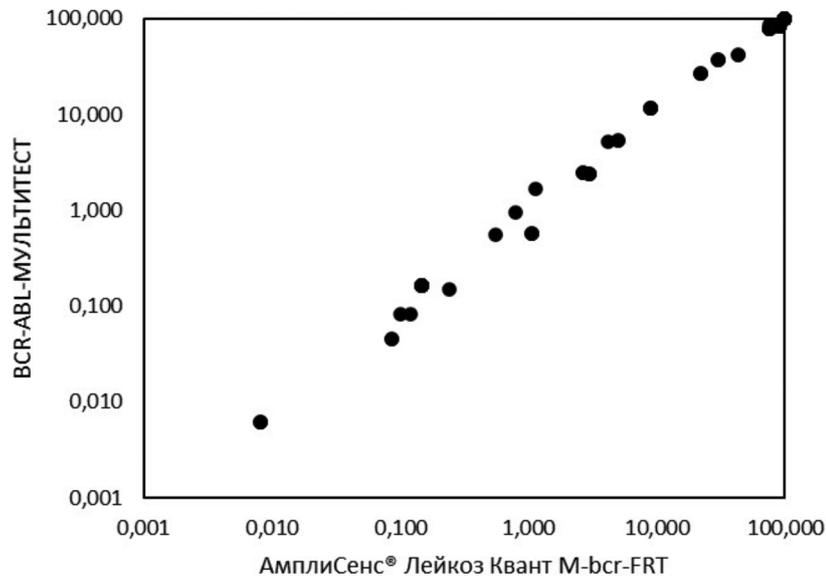


Рис. 1. Корреляция результатов тестирования образцов крови пациентов с подозрением на ХМЛ при использовании набора «BCR/ABL-МУЛЬТИТЕСТ» и коммерческого набора «АмплиСенс® Лейкоз Квант М-bcr-FRT».

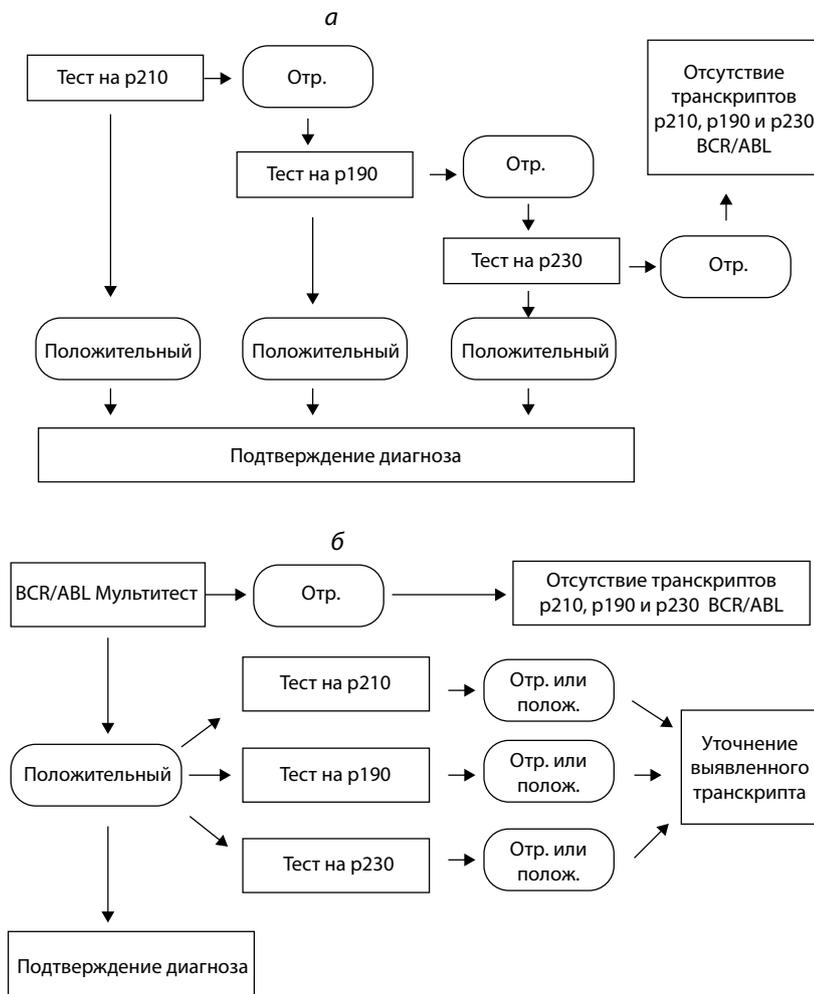


Рис. 2. Последовательный алгоритм выявления транскриптов BCR-ABL (а) и алгоритм с первичным использованием мультиплексного теста (б).

нативном алгоритме определялась исходя из стоимости коммерческих наборов на выделение РНК и обратную транскрипцию, а также реактивов, входящих в состав набора «BCR/ABL-МУЛЬТИТЕСТ».

Результаты. На рис. 1 представлен график корреляции результатов количественного определения уровня BCR-ABL p210 при параллельном тестировании образцов крови пациентов с подозрением на ХМЛ с использованием набора «BCR/ABL-МУЛЬТИТЕСТ» и коммерческого набора «АмплиСенс® Лейкоз Квант М-bcr-FRT» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора). В 86 пробах крови BCR-ABL p210 не выявлялись обоими тест-системами. Высокий уровень корреляции позитивных значений BCR-ABL p210 в диапазоне от 0,008 до 100% у 27 пациентов с ХМЛ ($r=0,998$) демонстрирует полное совпадение полученных результатов при использовании данных наборов при выявлении транскрипта p210.

При выполнении параллельного анализа поступающих в лабораторию проб пациентов с подозрением на ХМЛ и использованием сравнимых алгоритмов (рис. 2, а, б) различий в выявляемости отдельных транскриптов также не наблюдалось. Среди 95 проб было выявлено 9 случаев с позитивной реакцией на BCR-ABL (p210), в одной пробе определено присутствие изолированного варианта p190 BCR-ABL и в еще одном случае был обнаружен вариант транскрипта, характерный для хронического нейтрофильного лейкоза – p230 BCR-ABL. У трех пациентов, в последующем был выявлен генетический маркер Ph-негативной миелопролиферации – JAK2 V617F. При тестировании 8 взрослых пациентов с острым лейкозом с использованием набора «BCR/ABL-МУЛЬТИТЕСТ» также как и в альтернативном варианте тестирования на трех отдельных наборах было выявлено всего 2 случая BCR-ABL позитивного ОЛЛ (p190) (табл.1).

В табл. 2 представлены результаты оценки расчетной экономической эффективности внедрения алгоритма с первичным использованием набора «BCR/ABL-МУЛЬТИТЕСТ» при тестировании в сложившемся в нашей лаборатории потоке проб крови пациентов, направляемых врачами гематологами в связи с подозрением на ХМЛ. Расчетная стоимость выявления одного позитивного случая BCR-ABL при использовании предлагаемого алгоритма диагностики в нашей лаборатории сокращается в примерно в 2 раза – с 7,0 до 3,6 тыс. руб.

Обсуждение. За более чем 30-летнюю историю тестирования пациентов на BCR-ABL разработано множество методов обнаружения и количественной оценки уровней транскриптов BCR-ABL: от оценки кривых плавления до секвенирования нового поколения [1]. Вместе с тем, с целью практического использования наиболее приемлемы

Таблица 1

Частота выявления отдельных транскриптов BCR-ABL в пробах крови при проведении сравнительного исследования эффективности двух алгоритмов.

Всего поступило первичных проб для подтверждения диагноза	Всего	Из них положительные		
		p210	p190	p230
ХМЛ	95	9	1	1
ОЛЛ (взрослые)	8	0	2	0

тесты, характеризующиеся надежностью, простотой выполнения, максимальной экономичностью и минимизацией трудозатрат. Следует также признать, что необходимость противодействия пандемии коронавирусной инфекции вызвала взрывное развитие лабораторий, использующих методы полимеразной цепной реакции (ПЦР), существенно обновился соответствующий парк оборудования, что определяет целесообразность использования накопленной мощности ПЦР-лабораторий и для диагностики онкологических заболеваний.

В настоящее время в Российской Федерации регистрационные удостоверения Росздравнадзора изделий медицинского назначения имеют лишь единичные наборы для выявления только самого распространенного транскрипта p210 BCR-ABL, которые можно использовать в форматах как качественной, так и количественной оценки результатов. Вместе с тем, включение в диагностические критерии утвержденных клинических рекомендаций результатов выявления всех трех транскриптов BCR-ABL актуализирует необходимость разработки соответствующих стандартизованных коммерческих наборов.

Описано достаточно много вариантов тестов на основе ОТ-ПЦР для одновременного выявления трех самых распространенных химерных транскриптов BCR-ABL. Хотя эти мультиплексные тесты не являются строго соответствующими требованиям к количественным результатам идентификации каждого из транскриптов, преимущество их использования неоспоримо при обследовании когорт пациентов с низкой вероятностью наличия BCR-ABL, например при первичном скрининге пациентов с подозрением на ХМЛ.

Известна методика мультиплексного анализ ОТ-ПЦР в реальном времени для обнаружения BCR-ABL, которая допускает количественную оценку конкретного химерного транскрипта, включает использование праймера к ABL, меченного на 5'-конце флуоресцентным красителем NED (Applied Biosystems) [9] Метка NED, не

мешая сигналу флуоресцентного зонда TaqMan, позволяет впоследствии идентифицировать химерный транскрипт с помощью дополнительного выполнения капиллярного электрофореза высокого разрешения. Однако её использование не получило широкого распространения ввиду необходимости дополнительного дорогостоящего зонда и трудоемкого этапа капиллярного электрофореза.

Алгоритм, предложенный О.В. Никулиной и соавт. [10], основанный на выполнении двух последовательных реакций «гнездовой» ПЦР, позволяет идентифицировать наряду с основными вариантами при последующем секвенировании также и более редкие варианты транскриптов BCR-ABL, выявляемые менее чем у 1,0% всех обследованных пациентов с ХМЛ. Вместе с тем, его использование может быть эффективно с экономической точки зрения при тестировании когорты пациентов с очень высокой вероятностью наличия ХМЛ, как правило с выраженными клиническими и гематологическими проявлениями заболевания.

Наиболее простой и доступной по стоимости мультиплексной технологией выявления химерных транскриптов могла бы быть признана методика, основанная на оценке значения температур плавления полученных продуктов реакции ПЦР в присутствии флуоресцентного красителя SYBR Green I [5]. Однако описанная авторами методика позволяет выявлять только два варианта BCR-ABL – p210 и p190 и часто нуждается в последующей верификации ОТ-ПЦР.

Недавно описанный [11] мультиплексный метод ОТ-ПЦР с использованием пяти праймеров и одного зонда для количественной оценки BCR-ABL позволяет одновременно выявлять до 14 различных вариантов слияния, включая редкие подтипы. В комбинации с последующим капиллярным электрофорезом, методика также позволяет идентифицировать конкретные подтипы генов слияния BCR-ABL.

В отличие от описанных выше технологий, в своем наборе для классической ПЦР в реальном времени мы используем смесь одного специфического зонда и праймеров, что позволяет в одной пробирке детектировать нарабатываемые ампликоны любого из этих транскриптов. Кроме того, при разработке дизайна специфических праймеров мы учли также вероятность присутствия последовательностей генетических полиморфизмов, влияющих на специфичность получаемых результатов [12].

Предлагаемый алгоритм позволяет надеяться на выявление не менее 97% всех случаев присутствия в пробах крови пациентов основных вариантов BCR-ABL и является наиболее оптимальным с точки зрения соот-

Таблица 2

Сравнительная экономическая эффективность последовательного и параллельного алгоритмов выявления BCR-ABL при диагностике ХМЛ в условиях сформированного в лаборатории потока проб и контингента пациентов

Варианты алгоритма молекулярного скрининга при подозрении на ХМЛ	Выполнено тестов с учетом позитивности (9,5% p210, 1,1% p190 и 1,1% p230)			Всего тестов	Всего затрат (тыс. руб.) реактивы (услуги)	Стоимость (тыс. руб.) выявления одного случая реактивы (услуги)
	p210	p190	p230			
Стандартный последовательный алгоритм	1000	905	895	2800	820,0 (8120)	7,0 (69,4)
С использованием набора «BCR/ABL-МУЛЬТИТЕСТ»		1000		1000	420,0 (3100)	3,6 (26,5)

Примечание. При расчете стоимости затрат при использовании коммерческих реактивов и услуг в стандартном алгоритме использовали данные преискуранта ООО «Генотехнология»: <https://genetechnology.ru/?q=ru/node/99> и <https://genetechnology.ru/?q=ru/node/28>.

ношения экономической и диагностической эффективности первичного тестирования пациентов с подозрением на онкогематологические заболевания. Наличие выраженных клинических и гематологических проявлений позволяющих подозревать ХМЛ, несмотря на отрицательный результат тестирования предлагаемым нами набором, будет являться показанием для более эффективного использования дорогостоящих методов при редких вариантах слияния генов BCR-ABL.

В настоящей работе показана высокая корреляция количественных результатов тестирования при использовании наборов «BCR/ABL-МУЛЬТИТЕСТ» и «Ампли-Сенс® Лейкоз Квант М-bcr-FRT», что может свидетельствовать о перспективной возможности использования нашего набора и для количественной идентификации транскрипта p210.

Безусловно, конкретная экономическая эффективность использования разных диагностических алгоритмов зависит от многих факторов кроме непосредственной стоимости реактивов: распространенность заболевания среди направляемых на обследование пациентов, сложившийся объем исследований, организация внутривлабораторной логистики и т.д. Включение набора «BCR/ABL-МУЛЬТИТЕСТ» в диагностический алгоритм тестирования в нашей лаборатории при обследовании пациентов с подозрением на ХМЛ и острый лейкоз позволило достоверно выявлять более редкие транскрипты (p190 и p230) и существенно снизить стоимость выявления одного случая подтвержденного заболевания ХМЛ.

В связи с небольшой выборкой результатов тестирования пациентов с ОЛ провести корректные аналогичные финансовые расчеты не представляется возможным. Вместе с тем учитывая, что соотношение p190 и p210 транскриптов при Ph-позитивном ОЛЛ составляет примерно 75% и 25%, соответственно [4], а общая доля BCR-ABL-позитивных вариантов ОЛЛ у взрослых пациентов составляет менее 40%, использование мультиплексного теста перед выполнением количественных анализов на каждый из транскриптов также обуславливает более экономичный режим тестирования.

Организационные аспекты включения мультиплексных ПЦР-тестов в меню лабораторных исследований в дополнении стандартному гематологическому анализу уже на первичном этапе диагностики при подозрении на онкогематологические заболевания требуют дополнительного изучения.

Заключение. В результате проведенной работы нами был апробирован диагностический алгоритм с использованием тест-системы, позволяющей в формате мультиплексного ПЦР-РВ выявлять одновременно все три основных варианта транскриптов BCR-ABL – p210, p190 и p230. Предложен параллельный алгоритм лабораторного исследования, позволяющий снизить стоимость выявления одного позитивного случая BCR-ABL при тестировании проб крови пациентов с подозрением на миелопролиферативные заболевания и острый лейкоз.

Финансирование. Настоящее исследование проведено в рамках государственного заказа «Разработка диагностических наборов реагентов для молекулярно-генетического выявления онкогенных транскриптов с целью ранней диагностики и мониторинга минимальной остаточной болезни при острых лейкозах № РКАААА-А20-120021890163-5».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 4 – 5, 7-12 см. REFERENCES)

2. Савченко В.Г., Паровичникова Е.Н., Афанасьев Б.В., Троицкая В.В., Гаврилина О.А., Соколов А.Н. и др. Клинические рекомендации по диагностике и лечению острых лимфобластных лейкозов взрослых. (редакция 2018) [электронный документ]. Доступно по: https://npngo.ru/uploads/media_document/293/556718e9-0ff5-46f3-bff8-bd592c83b992.pdf Ссылка активна на 30.03.2021.
3. Туркина А.Г., Зарицкий А.Ю., Шуваев В.А., Чельшева Е.Ю., Ломаиа Е.Г. и др. Клинические рекомендации по диагностике и лечению хронического миелолейкоза. *Клиническая онкогематология*. 2017;10(3): 294–316. <https://doi.org/10.21320/2500-2139-2017-10-3-294-316>
6. Меликян А.Л., Ковригина А.М., Суборцева И.Н., Шуваев В.А., Морозова Е.В., Ломаиа Е.Г. и др. Клинические рекомендации по диагностике и терапии Ph-негативных миелопролиферативных заболеваний (истинная полицитемия, эссенциальная тромбоцитемия, первичный миелофиброз) (редакция 2020 г.). *Клиническая онкогематология*. 2021;14(2): 262–98.

REFERENCES

1. Kang Z.J., Liu Y.F., Xu L.Z., Long Z.J., Huang D., Yang Y. et al. The Philadelphia chromosome in leukemogenesis. *Chin. J. Cancer*. 2016;35:48. <https://doi.org/10.1186/s40880-016-0108-0>
2. Savchenko V. G., Parovichnikova E. N., Afanasyev B. V., Troitskaya V. V., Gavrilina O. A., Sokolov A. N. et al. Clinical guidelines for the diagnosis and treatment of acute lymphoblastic leukemias in adults. [Internet] Available from: https://npngo.ru/uploads/media_document/293/556718e9-0ff5-46f3-bff8-bd592c83b992.pdf (accessed 30.03.2021) (In Russian)
3. Turkina A.G., Zaritskii A.Yu., Shuvaev V.A., Chelysheva E.Yu., Lomaia E.G., Morozova E.V. et al. Clinical Recommendations for the Diagnosis and Treatment of Chronic Myeloid Leukemia. *Clinical oncohematology*. 2017;10(3):294–316. (in Russian)
4. Deininger M.W., Goldman J.M., Melo J.V. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2000;96(10):3343-56.
5. Gutiérrez M.I., Timson G., Siraj A.K., Bu R., Barbhaya S., Banavali S. et al. Single monochrome real-time RT-PCR assay for identification, quantification, and breakpoint cluster region determination of t(9;22) transcripts. *J. Mol. Diagn.* 2005;7(1):40-7. [https://doi.org/10.1016/S1525-1578\(10\)60007-4](https://doi.org/10.1016/S1525-1578(10)60007-4)
6. Melikyan A.L., Kovrigina A.M., Subortseva I.N., Shuvaev V.A., Morozova E.V., Lomaia E.G. et al. National Clinical Guidelines on Diagnosis and Treatment of Ph-Negative Myeloproliferative Neoplasms (Polycythemia Vera, Essential Thrombocythemia, and Primary Myelofibrosis) (Edition 2020). *Gematologiya i transfuziologiya*. 2021;14(2):262–98. (in Russian)
7. Tsuchiya K., Tabé Y., Ai T., Ohkawa T., Usui K., Yuri M. et al. Eprobe mediated RT-qPCR for the detection of leukemia-associated fusion genes. *PLoS One*. 2018;13(10):e0202429. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202429>
8. Jinawath N., Norris-Kirby A., Smith B.D., Gocke C.D., Batista D.A., Griffin C.A. et al. A rare e14a3 (b3a3) BCR-ABL fusion transcript in chronic myeloid leukemia: diagnostic challenges in clinical laboratory practice. *J. Mol. Diagn.* 2009;11(4):359-63. <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2009.090008>
9. Luthra R., Sanchez-Vega B., Medeiros L.J. TaqMan RT-PCR assay coupled with capillary electrophoresis for quantification and identification of BCR-ABL transcript type. *Mod. Pathol.* 2004;17(1):96-103. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800026>
10. Никулина О.В., Цаур Г.А., Ригер Т.О., Яковлева Ю.А., Демина А.С., Семенихина Е.Р. и др. Тактика выявления частых и редких типов химерного транскрипта BCR-ABL при хроническом миелоидном лейкозе. *Клиническая онкогематология*. 2015;8(2):161–8.
11. Tong Y.Q., Zhao Z.J., Liu B., Bao A.Y., Zheng H.Y., Gu J. et al. New rapid method to detect BCR-ABL fusion genes with multiplex RT-qPCR in one-tube at a time. *Leuk. Res.* 2018;69:47-53. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2018.04.001>
12. Saussele S., Weisser A., Müller M.C., Emgi M., La Rosée P., Paschka P. et al. Frequent polymorphism in BCR exon b2 identified in BCR-ABL positive and negative individuals using fluorescent hybridization probes. *Leukemia*. 2000;14(11):2006-10. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2401929>