

Результаты внешнего контроля качества диагностики острого лимфобластного лейкоза методом проточной цитометрии

А. М. Попов¹, Т. Ю. Вержбицкая², Е. Е. Зуева^{3, 4}, О. В. Ананьева⁵, Е. В. Бабенко⁶, Л. В. Байдун⁷, Е. А. Белякова⁸,
Е. В. Боякова⁹, О. Г. Бортникова¹⁰, М. В. Горчакова⁴, Л. Ю. Гривцова¹¹, Е. Н. Гринкевич¹², Ю. В. Давыдова¹³,
Е. И. Захарько¹⁴, О. И. Илларионова¹, Н. М. Капранов¹³, Е. А. Королева¹⁵, С. А. Коченгина¹⁶, Е. Г. Кузьмина¹⁷,
Е. А. Кустова¹⁸, Т. А. Макарова¹⁹, Ю. В. Миролюбова²⁰, О. Е. Мурашкина²¹, Т. Ю. Мушкарина¹⁷, Е. С. Нишева¹⁹,
И. А. Новикова²², Е. Ю. Осипова¹, Г. Э. Плужникова¹⁰, М. Е. Почтарь²³, Н. В. Пронкина²⁴, Е. Б. Русанова⁴,
Е. Б. Рыбкина¹⁴, О. В. Селиверстова⁹, Н. Н. Тупицин¹¹, Г. И. Улейская²⁵, Н. Т. Уразалиева¹⁸, Л. Г. Фечина²,
О. В. Хороших²⁶, О. Е. Царева²⁷, Л. А. Щекина²⁵, С. А. Плясунова¹, С. А. Луговская²³

¹ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России; Россия, 117997, Москва, ул. Саморы Машела, 1;

²ГБУЗ СО «Областная детская клиническая больница № 1»; Россия, 620088, Екатеринбург. ул. С. Дерябиной, 32;

³кафедра молекулярной биологии, факультет естественных наук Ариэльского университета; Израиль, 40700, Ариэль;

⁴лаборатория клинической иммунологии и молекулярной диагностики отдела лабораторной диагностики ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И. П. Павлова» Минздрава России; Россия, 197022, Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, 6–8;

⁵ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Минздрава России; Россия, 625023, Тюмень, ул. Одесская, 54;

⁶ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И. П. Павлова» Минздрава России, НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р. М. Горбачевой; Россия, 197022, Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, 6–8;

⁷ФГБУ «Российская детская клиническая больница» Минздрава России; Россия, 119571, Москва, Ленинский просп., 117;

⁸ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова» Минздрава России; Россия, 191015, Санкт-Петербург, ул. Кирочная, 41;

⁹ГБУЗ «Станция переливания крови Департамента здравоохранения г. Москвы»; Россия, 115516, Москва, ул. Бакинская, 31;

¹⁰ГБУ РО «Областная детская клиническая больница»; Россия, 344000, Ростов-на-Дону, ул. Благодатная, 168;

¹¹ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 23;

¹²БУ ХМАО – Югры «Нижневартовская окружная клиническая детская больница»; Россия, 628609, Нижневартовск, ул. Северная, 30;

¹³Научно-клиническая лаборатория иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России; Россия, 125167, Москва, Новый Зыковский пр-д, 4;

¹⁴Центральная клиничко-диагностическая лаборатория с группой патологии гемостаза ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России; Россия, 125167, Москва, Новый Зыковский пр-д, 4;

¹⁵КГБУЗ «Диагностический центр Алтайского края»; Россия, 656038, Барнаул, Комсомольский просп., 75а;

¹⁶ГБУЗ «Челябинская областная детская клиническая больница»; Россия, 454087, Челябинск, ул. Блохера, 42а;

¹⁷Медицинский радиологический научный центр им. А. Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Минздрава России; Россия, 249036, Обнинск, ул. Королева, 4;

¹⁸Научный центр педиатрии и детской хирургии; Казахстан, Алматы, ул. Аль-Фараби, 146;

¹⁹ГБУЗ «Детская городская больница № 1»; Россия, 198205, Санкт-Петербург, ул. Авангардная, 14;

²⁰ФГБУ «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр» Минздрава России; Россия, 197341, Санкт-Петербург, ул. Аккурадова, 2;

²¹ГБУЗ «Детская краевая клиническая больница»; Россия, 350007, Краснодар, площадь Победы, 1;

²²ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России; Россия, 344019, Ростов-на-Дону, ул. 14-я линия, 63;

²³кафедра клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования» Минздрава России; Россия, 125993, Москва, ул. Баррикадная, 2/1, стр. 1;

²⁴клиника иммунопатологии ГБНУ «НИИ фундаментальной и клинической иммунологии»; Россия, 630099, Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14;

²⁵ГБУЗ «Городская клиническая больница № 31»; Россия, 197110, Санкт-Петербург, просп. Динамо, 3;

²⁶ГБУЗ «Иркутская ордена «Знак Почета» областная клиническая больница»; Россия, ул. 664049, Иркутск, ул. Юбилейный микрорайон, 100;

²⁷ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В. И. Разумовского» Минздрава России; Россия, 410012, Саратов, ул. Большая Казачья, 112

Контакты: Александр Михайлович Попов uralcytometry@gmail.com

Цель данной работы – сравнение результатов интерпретации данных иммунофенотипирования (ИФТ) острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) в 26 лабораториях проточной цитометрии Российской Федерации и Казахстана. Участникам исследования было предложено интерпретировать результаты ИФТ 10 пациентов с ОЛЛ. Анализ полученных результатов показал наличие 4 основных категорий расхождений: диагностика В-линейных ОЛЛ на фоне выраженной регенерации в костном мозге, крайняя вариабельность заключений по ИФТ пациентов с Т-ОЛЛ, сложности в диагностике лейкозов неясной линейности, а также существенные различия формата заключений, которые крайне затрудняют стандартизацию ИФТ. Дальнейшее проведение подобных исследований с широким обсуждением результатов и итоговой разработкой консенсусного алгоритма анализа данных проточной цитометрии позволят сделать первые шаги в стандартизации применения данного лабораторного метода в онкогематологии в Российской Федерации и странах СНГ.

Ключевые слова: проточная цитометрия, острый лимфобластный лейкоз, стандартизация

DOI: 10.17650/1818-8346-2016-11-3-68-75

Results of external quality control study in flow cytometric acute lymphoblastic leukemia diagnostics

A.M. Popov¹, T. Yu. Verzhbitskaya², E. E. Zueva^{3,4}, O. V. Anan'eva⁵, E. V. Babenko⁶, L. V. Baydun⁷, E. A. Belyakova⁸, E. V. Boyakova⁹, O. G. Bortnikova¹⁰, M. V. Gorchakova⁴, L. Yu. Gritsova¹¹, E. N. Grinkevich¹², Yu. V. Davydova¹³, E. I. Zakhar'ko¹⁴, O. I. Illarionova¹, N. M. Kapranov¹³, E. A. Koroleva¹⁵, S. A. Kochengina¹⁶, E. G. Kuz'mina¹⁷, E. A. Kustova¹⁸, T. A. Makarova¹⁹, Yu. V. Mirolyubova²⁰, O. E. Murashkina²¹, T. Yu. Mushkarina¹⁷, E. S. Nisheva¹⁹, I. A. Novikova²², E. Yu. Osipova¹, G. E. Pluzhnikova¹⁰, M. E. Pochtar²³, N. V. Pronkina²⁴, E. B. Rusanova⁴, E. B. Rybkina¹⁴, O. V. Seliverstova⁹, N. N. Tupitsin¹¹, G. I. Uleyskaya²⁵, N. T. Urazalieva¹⁸, L. G. Fechina², O. V. Khoroshikh²⁶, O. E. Tsareva²⁷, L. A. Shchekina²⁵, S. A. Plyasunova¹, S. A. Lugovskaya²³

¹Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev, Ministry of Health of Russia; 1 Samory Mashela St., Moscow, 117997, Russia;

²Regional Children Clinical Hospital No 1; 32 S. Deryabinoy St., Ekaterinburg, 620088, Russia;

³Department of Molecular Biology, Faculty of Natural Sciences, Ariel University; Ariel, 40700, Israel;

⁴Laboratory of Clinical Immunology and Molecular Diagnostics, Department of Laboratory Diagnostics, I. P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Ministry of Health of Russia; 6–8, L. Tolstogo St., Saint Petersburg, 197022, Russia;

⁵Tyumen State Medical University, Ministry of Health of Russia; 54 Odesskaya St., Tyumen, 625023, Russia;

⁶I. P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Ministry of Health of Russia, R. M. Gorbacheva Research Institute of Pediatric Oncology, Hematology and Transplantology; 6–8, L. Tolstogo St., Saint Petersburg, 197022, Russia;

⁷Russian Children Clinical Hospital, Ministry of Health of Russia; 117 Leninskiy Prospekt, Moscow, 119571, Russia;

⁸North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov, Ministry of Health of Russia; 41 Kirochnaya St., Saint Petersburg, 191015, Russia;

⁹Blood Transfusion Station of the Moscow Healthcare Department; 31 Bakinskaya St., Moscow, 125167, Russia;

¹⁰Regional Children Clinical Hospital; 168 Blagodatnaya St., Rostov-on-Don, 344000, Russia;

¹¹N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 23 Kashirskoe Shosse, Moscow, 115478, Russia;

¹²Nizhnevartovsk Regional Children Clinical Hospital; 30 Severnaya St., Nizhnevartovsk, 628609, Russia;

¹³Scientific Clinical Laboratory of Immunophenotyping of Blood Cells and Bone Marrow, National Research Center for Hematology, Ministry of Health of Russia; 4 Novyy Zykovskiy Proezd, Moscow, 125167, Russia;

¹⁴Central Clinical Diagnostic Laboratory with a Group of Hemostasis Disorders, National Research Center for Hematology, Ministry of Health of Russia; 4 Novyy Zykovskiy Proezd, Moscow, 125167, Russia;

¹⁵Diagnostic Center of the Altai Region; 75a Komsomol'skiy Prospekt, Barnaul, 656038, Russia;

¹⁶Chelyabinsk Regional Children Clinical Hospital; 42a Blukhera St., Chelyabinsk, 454087, Russia;

¹⁷A. F. Tsyb Medical Radiological Research Center – Branch of the National Medical Radiological Research Center, Ministry of Health of Russia; 4 Koroleva Sr., Obninsk, 249036, Russia;

¹⁸Research Center of Pediatrics and Pediatric Surgery; 146 al' – Farabi St., Almaty, Kazakhstan;

¹⁹Children City Hospital No 1; 14 Avangardnaya St., Saint Petersburg, 198205, Russia;

²⁰Federal Almazov North-West Medical Research Center, Ministry of Health of Russia; 2 Akkuratova St., Saint Petersburg, 197341, Russia;

²¹Children Regional Clinical Hospital; 1 Pobedy Square, Krasnodar, 350007, Russia;

²²Rostov Research Institute of Oncology, Ministry of Health of Russia; 63 14th Liniya St., Rostov-on-Don, 344019, Russia;

²³Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Ministry of Health of Russia; Build. 1, 2/1 Barrikadnaya St., Moscow, 125993, Russia;

²⁴Clinic of Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology; 14 Yadrintsevskaya St., Novosibirsk, 630099, Russia;

²⁵City Clinical Hospital No 31; 3 Dinamo Prospekt, Saint Petersburg, 197110, Russia;

²⁶Irkutsk the Badge of Honor Order Regional Clinical Hospital; 100 Yubileynaya St., Irkutsk, 664049, Russia;

²⁷Saratov State Medical University named after V. I. Razumovsky, Ministry of Health of Russia; 112 Bol'shaya Kazach'ya St., Saratov, 410012, Russia

Comparison of interpretation of acute lymphoblastic leukemia (ALL) flow cytometric diagnostics data was the aim of the study. Immunophenotyping data obtained from 10 patients with ALL were analysed separately in 26 laboratories from Russian Federation and Kazakhstan. Results comparison showed four main type of discordance: B-lineage ALL diagnostics during heavy bone marrow regeneration, great variability of T-ALL interpretation, complexity of ambiguous lineage acute leukemia and, finally, very different report types, unique for each laboratory. All these problems are the serious obstacles for standardization of flow cytometric ALL diagnostics in multicenter setting. Continuation of similar QC rounds following by consecutive discussions with further development of consensus diagnostic algorithm could be the first step for standardization of ALL immunophenotyping in Russian Federation and CIS countries.

Key words: flow cytometry, acute lymphoblastic leukemia, standardization

Введение

Определение иммунофенотипа опухолевых клеток методом многоцветной проточной цитометрии является одним из основных диагностических инструментов при остром лимфобластном лейкозе (ОЛЛ) у детей и взрослых [1–3]. Различия в антигенном профиле лейкоэмических бластов позволяют не только уточнить линейную принадлежность ОЛЛ, но и выбрать наиболее подходящую терапевтическую схему для достижения оптимального результата лечения. К сожалению, проточная цитометрия является во многом весьма субъективной технологией, так как анализ и интерпретация данных напрямую зависят от квалификации и навыка оператора [4]. В связи с тем, что данные иммунофенотипирования (ИФТ) используются для стратификации пациентов в рамках крупных многоцентровых исследований по терапии ОЛЛ, необходима максимально возможная стандартизация данного метода диагностики. В европейских и американских исследовательских группах эта проблема решается двумя путями: либо централизацией диагностики в нескольких крупных лабораториях, специалисты которых обладают достаточным опытом работы, либо проведением жесткой процедуры стандартизации работы большого количества лабораторий, включающей контроль работы прибора, использование унифицированных панелей моноклональных антител, автоматический анализ данных при помощи специального программного обеспечения [4, 5].

Исторически для классификации ОЛЛ по иммунофенотипу используется система, предложенная в 1995 г. группой EGIL [6], с учетом позднее внесенных в нее изменений [7, 8]. Однако в последнем на данный момент пересмотре классификации Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) роль ИФТ в диагностике ОЛЛ была существенно снижена [9]. По сути, она свелась к дифференциальной диагностике с острым миелоидным лейкозом (ОМЛ), уточнению В- или Т-линейной принадлежности опухолевых лимфобластов, исключению лейкоза Беркитта и диагностике острых лейкозов неясной линейности [9]. Тем не менее традиционно чаще всего диагностика ОЛЛ проводится по классификации EGIL, но с учетом вновь выделяемых групп опухолей, в том числе и по классификации ВОЗ [9–11].

Наличие в Российской Федерации и большинстве стран СНГ своих протоколов лечения ОЛЛ как у детей, так и у взрослых [12–15] определяет необходимость выработки национальных стандартов диагностического ИФТ. Хотя российскими группами периодически публикуются примеры применения классификаций EGIL и ВОЗ [16–18], каких-либо общих подходов к проведению цитометрической диагностики ОЛЛ до настоящего времени не разработано. В то же время оказалось, что в лабораториях, проводящих цитометрическую диагностику, существуют совершенно разные подходы к пробоподготовке, настройкам приборов, анализу и интерпретации полученных результатов

[19]. Поэтому целью данной работы стало сравнение результатов интерпретации данных ИФТ ОЛЛ в различных лабораториях проточной цитометрии Российской Федерации и Казахстана.

Материалы и методы

Исследование проводилось в 2 раунда. В 1-м раунде приняли участие 18 лабораторий из Российской Федерации и 1 из Республики Казахстан. Одна российская лаборатория от участия отказалась. Участники были разделены на 2 группы. В 1-ю группу вошли 6 лабораторий, обладающих большим опытом в диагностике острых лейкозов (ОЛ), остальные 13 составили 2-ю группу. Так как в результате 1-го раунда исследования не было выявлено существенных различий в сопоставимости результатов 2 групп, 2-й раунд исследования проводился уже без такого разделения участников. В нем приняли участие 22 лаборатории, при этом к участникам 1-го раунда добавились еще 7 российских лабораторий, но 4 из ранее включенных результаты своей работы не прислали. Как и запрашивалось организаторами исследования, все участники 1-го раунда и часть участников 2-го раунда прислали результаты на используемых в лабораториях бланках заключений по ИФТ ОЛ.

В качестве материала были использованы данные ИФТ 10 пациентов, которым диагностическое исследование было выполнено в лаборатории иммунофенотипирования гемобластов ГБУЗ СО «Областная детская клиническая больница № 1» (Екатеринбург). В 1-м раунде было предложено проанализировать результаты ИФТ бластных клеток у 5 детей в возрасте от 9 мес до 10 лет. У 3 пациентов был диагностирован ОЛЛ из В-линейных предшественников (ВП-ОЛЛ), у 1 – Т-линейный ОЛЛ (Т-ОЛЛ), а 1 пациент находился в полной продолжающейся ремиссии на фоне терапии ВП-ОЛЛ, однако в костном мозге (КМ) наблюдалась выраженная В-линейная регенерация, что позволило на основании цитологического исследования предположить развитие рецидива опухоли. Во 2-й раунд были включены 2 взрослых пациента и 3 детей. У всех 5 больных иммунофенотип бластов соответствовал Т-ОЛЛ, однако в 1 случае вследствие коэкспрессии миелопероксидазы опухолевый иммунофенотип мог быть классифицирован согласно критериям ВОЗ как смешанно-фенотипический лейкоз (MPAL) [9]. Антигенный профиль 2 пациентов соответствовал ОЛЛ из ранних Т-линейных предшественников (ЕТР-ОЛЛ) [10, 11]. Суммарно иммунофенотип бластных клеток всех пациентов представлен в таблице 1.

Участникам исследования было предложено интерпретировать результаты ИФТ, показанные на точечных графиках экспрессии антигенов. На графиках были отображены только опухолевые клетки, а границы негативной области расставлены в виде квадрантов с указанием процентного соотношения клеток, попавших в каждый регион. В то же время нормальные В- и Т-лимфоциты, по флуоресценции которых эти границы вы-

Общая характеристика пациентов, включенных в исследование

Пациент	Пол	Возраст	Направительный диагноз	Относительное количество бластов по данным цитоморфологии, %	Относительное количество бластов по данным иммунофенотипирования, %	Имунофенотип бластных клеток	Кожэкспрессия антигенов других линий	Заключение по EGIL [6, 7]	MPAL по ВОЗ? [9]	ETP-ОЛЛ? [10, 11]
1-й раунд										
№ 1	М	2 года	ОЛ	83,0	71,6	CD19 ⁺ CD22 ⁺ iCD79a ⁺ CD34 ⁺ CD10 ⁺ CD38 ⁺ CD58 ⁺ CD45 ^{-/+}	Нет	ВП-ОЛЛ	Нет	—
№ 2	М	5 лет	ОЛ	69,0	66,1	CD19 ⁺ CD22 ⁺ iCD79a ⁺ CD33 ⁺ CD13 ⁺ CD10 ⁺ CD38 ⁺ CD58 ⁺ CD45 ⁺	CD13, CD33	ВП-ОЛЛ	Нет	—
№ 3	Ж	10 лет	ОЛЛ, рецидив	26,0	22,4	CD19 ⁺ CD22 ⁺ iCD79a ⁺ CD10 ⁺ CD20 ⁺ CD45 ⁺	Нет	Норм. ВП	Нет	—
№ 4	Ж	9 мес	ОЛ	Тотально	47,6	CD19 ⁺ CD22 ^{-/+} iCD79a ⁺ CD133 ⁺ CD15 ⁺ CD34 ⁺ CD38 ⁺ CD58 ⁺ CD45 ⁺ NG2 ⁺	CD15, NG2	VI-ОЛЛ	Нет	—
№ 5	М	8 лет	ОЛ	Тотально	92,1	CD7 ⁺ iCD3 ⁺ iCD79a ⁺ CD33 ⁺ CD117 ⁺ CD34 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45 ⁺ CD5 ⁺ CD99 ⁺ CD10 ⁺ iTdT ⁺	CD10, CD33, CD117, iCD79a	TIV-ОЛЛ	Нет	Нет
2-й раунд										
№ 1	М	21 год	ОЛ	Тотально	90,6	CD7 ⁺ iCD3 ⁺ iCD79a ⁺ CD33 ⁺ CD34 ⁺ CD45 ⁺	CD33, iCD79a	TI-ОЛЛ	Нет	Да
№ 2	М	11 лет	ОЛ	94,0	90,6	CD7 ⁺ iCD3 ⁺ CD33 ⁺ CD117 ⁺ CD34 ⁺ CD13 ⁺ CD2 ⁺ CD45 ⁺	CD13, CD33, CD117	BAL	Нет	Да
№ 3	М	23 года	ОЛ	Тотально	93,1	CD7 ⁺ iCD3 ⁺ CD1a ⁺ CD5 ⁺ CD14 ⁺ CD2 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45 ⁺ CD4 ⁺ CD10 ⁺ CD34 ⁺	CD10, CD14	ТПП-ОЛЛ	Нет	Нет
№ 4	Ж	8 лет	ОЛ	Тотально	90,8	CD7 ⁺ iCD3 ⁺ CD1a ⁺ CD5 ⁺ CD13 ⁺ CD2 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45 ⁺ CD4 ⁺ CD10 ⁺ CD33 ⁺ iCD79a ⁺ TCRγδ ⁺	CD10, CD33, CD13, iCD79a	ТПП-ОЛЛ	Нет	Нет
№ 5	Ж	10 мес	ОЛ	86,0	76,4	CD7 ⁺ iCD3 ⁺ CD1a ⁺ CD5 ⁺ CD2 ⁺ CD8 ⁺ CD45 ⁺ CD4 ⁺ iMPO ⁺ iCD79a ⁺	iCD79a, MPO	ТПП-ОЛЛ	Да	Нет

Примечание. Внутриклеточная экспрессия антигенов отмечена буквой «i». MPAL – смешанно-фенотипический лейкоз [9]; ETP-ОЛЛ – ОЛЛ из ранних T-линейных предшественников [10, 11]; BAL – острый бифенотипический лейкоз [6, 7].

ставлялись, на графиках не были показаны. Выделение опухолевых клеток и расстановка квадрантов были проведены организаторами исследования. Данные были предоставлены в таком формате потому, что задачей исследования являлось сопоставление результатов интерпретации данных ИФТ опухолевой популяции. Предоставление «сырых» цитометрических данных ставило бы результат в зависимость также и от анализа экспрессии антигенов всеми ядродержащими клетками КМ, что затруднило бы определение источника расхождения результатов. Для адекватной оценки интенсивности экспрессии участникам также была предо-

ставлена информация о том, какими флуорохромами мечены использовавшиеся антитела.

Статистическая значимость различия в количестве случаев ошибочной диагностики рецидива ВП-ОЛЛ при наличии выраженной регенерации КМ между группами лабораторий определялась при помощи точного критерия Фишера в программе Statistica 7.0. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

В 3 случаях ВП-ОЛЛ значимых расхождений между лабораториями не выявлено. Семнадцать (89,5 %)

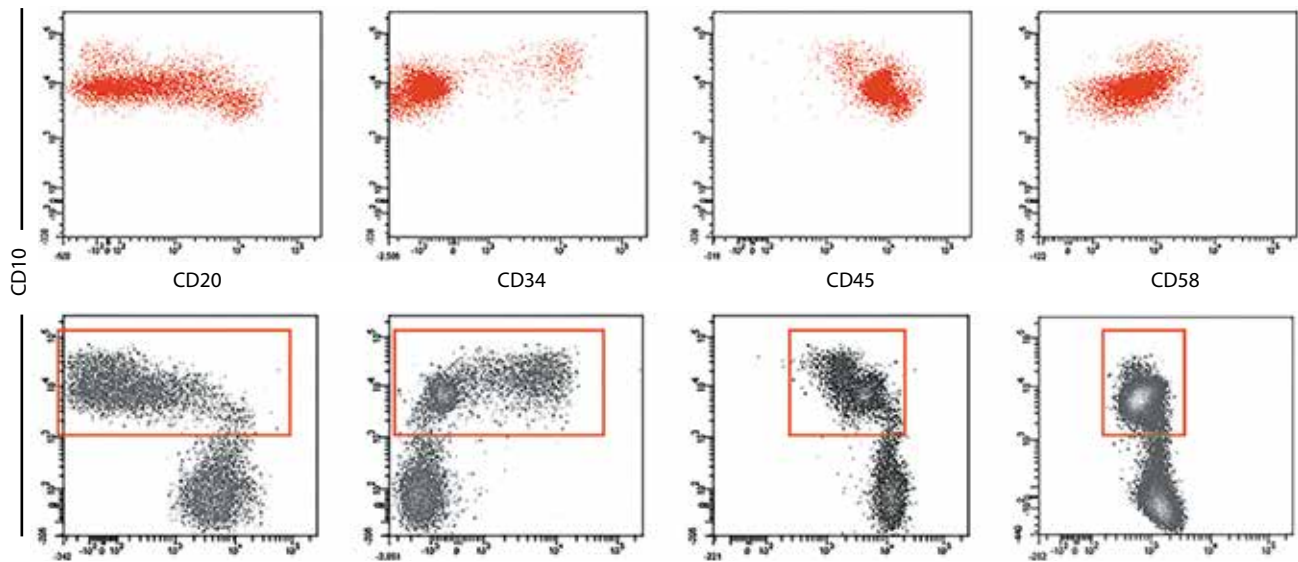


Рис. 1. Распределение В-линейных предшественников в костном мозге пациента № 3 1-го раунда исследования (верхний ряд) и типичное распределение клеток при нормальном В-линейном развитии [20–22]. Красной рамкой выделена область В-линейных предшественников

из 19 участвовавших лабораторий в заключение по пациенту № 2, кроме ВП-варианта по EGIL [6], также вынесли коэкспрессию CD13 и CD33. В случае № 4 9 (47,4 %) участников вынесли в заключение позитивность по CD15, а 7 (36,8 %) – по NG2. При этом у данного пациента в 4 (21,0 %) лабораториях предположили наличие перестройки гена *MLL*, а в 2 (10,5 %) о наличии такой реаранжировки было заявлено без сомнений. Кардинальные расхождения результатов вызвал пациент № 3. При анализе распределения клеток на точечных графиках хорошо видно, что выделенные лимфобласты являются нормальными ВП (рис. 1) [20–22], однако в 2 из 6 лабораторий 1-й группы и в 8 из 13 лабораторий 2-й группы эти клетки были расценены как опухолевые, т. е. большинством участников рецидив ОЛЛ был диагностирован ошибочно. При этом частота ошибок между группами лабораторий хотя и различалась (33,3 и 61,5 % для 1-й и 2-й групп соответственно), но статистической значимости эта разница не достигла ($p = 0,259$). В единственном для 1-го раунда случае Т-ОЛЛ сопоставимость результатов между лабораториями отсутствовала. Всего от 19 участников было получено 20 заключений, так как в 1 лаборатории предложили 2 разных варианта диагноза. ТIV-вариант, соответствующий классификации EGIL, был определен только в 2 (10,0 %) лабораториях. Одиннадцать (55,0 %) участников диагностировали ТП, несмотря на экспрессию поверхностного CD3, 1 (5,0 %) – ТI, 1 (5,0 %) – МРАL, а 5 (25,0 %) указали только Т-линейную принадлежность опухоли без уточнения варианта по EGIL. Коэкспрессия 1 миелоидного антигена была указана в 5 (25,0 %) заключениях, а 2 – в 9 (45,0 %). Только 1 лаборатория указала также экспрессию В-линейных маркеров CD10 и iCD79a.

Так как наибольшие расхождения результатов в разных лабораториях были получены для Т-линей-

ного ОЛЛ, во 2-й раунд исследования были включены только пациенты с преобладанием Т-лимфоидного иммунофенотипа. Распределение результатов, полученных из разных лабораторий, показано на рис. 2. Наиболее разнообразные заключения были получены для пациента № 2, чей случай представлял собой ЕТР-ОЛЛ, однако по классификации EGIL соответствовал острому бифенотипическому лейкозу. Четыре (18,2 %) и 7 (31,2 %) из 22 лабораторий отметили ЕТР-природу опухолевых клеток у пациентов № 1 и № 2 соответственно. При этом данная категория, не входящая в классификацию EGIL, 2 группами выносилась в качестве единственного диагноза. Важно отметить, что небольшая часть лабораторий в случае № 4 диагностировала не ТIII-вариант ОЛЛ, несмотря на экспрессию CD1a. В подавляющем большинстве случаев в заключение выносилась коэкспрессия миелоидных антигенов и CD79a, однако на наличие на мембране бластов CD10 указывали гораздо реже.

Присланные бланки заключений очень существенно различались. Варьировали как способы перечисления антигенов и указания степени их экспрессии, так и описательная часть заключений. В ряде случаев итоговое заключение формулировалось в виде суммарного иммунофенотипа опухолевых клеток и соответствия определенному варианту ОЛЛ. Однако в бланках некоторых лабораторий также была существенная описательная часть, зачастую содержащая не только полученные результаты, но и различные предположения авторов.

Обсуждение

Имунофенотипическая диагностика ОЛЛ имеет большое значение для правильного подбора противоопухолевой терапии. Именно поэтому стандартизация данного лабораторного метода является абсолютно необходимой для корректной работы любых коопериро-

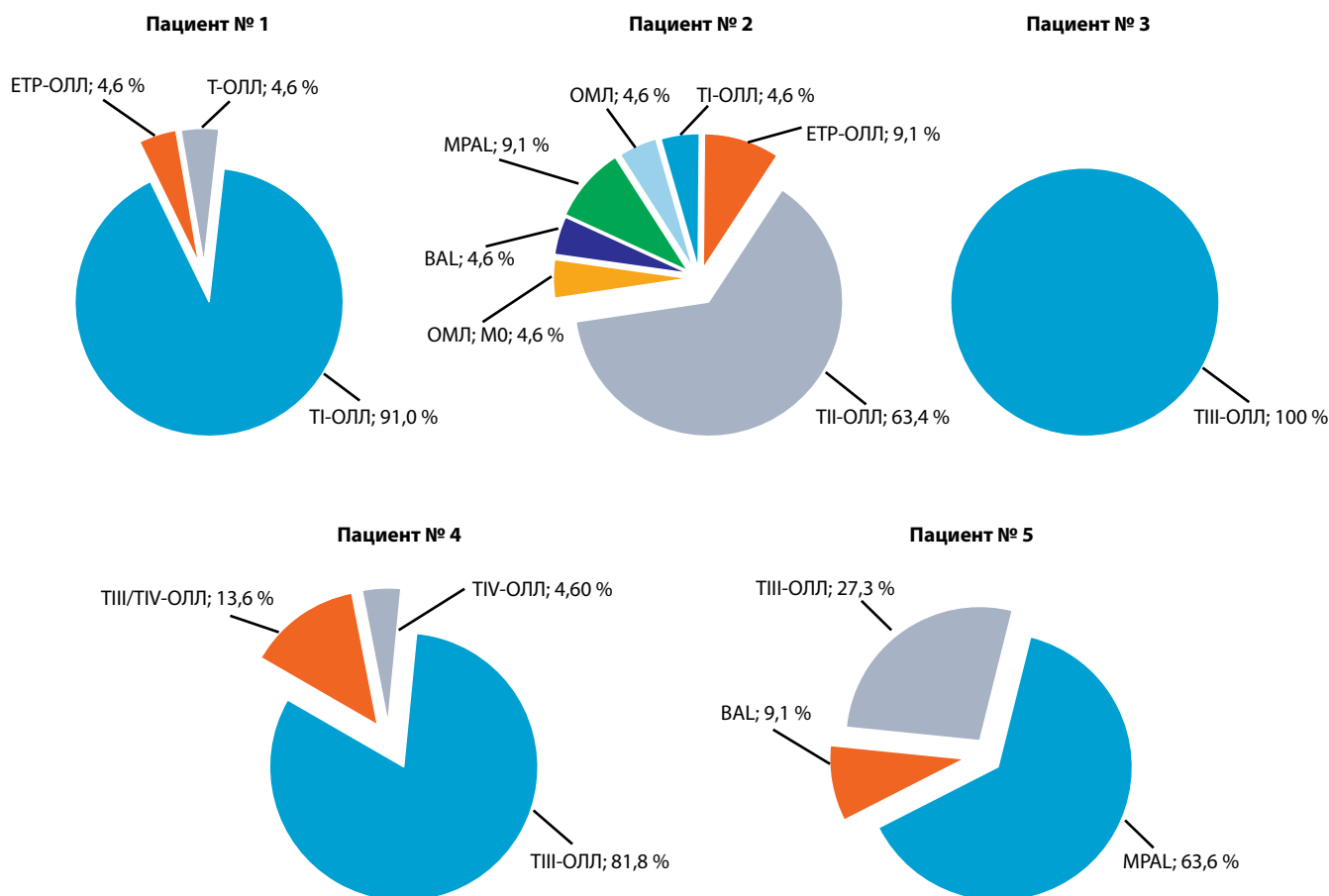


Рис. 2. Варианты диагнозов, полученные для пациентов 2-го раунда кругового исследования. МРАЛ – смешанно-фенотипический лейкоз; ЕТР-ОЛЛ – ОЛЛ из ранних Т-линейных предшественников; ВАЛ – острый бифенотипический лейкоз; МРАЛ – смешанно-фенотипический лейкоз

ванных групп по лечению ОЛ. Поскольку в странах СНГ до настоящего времени отсутствуют какие-либо стандарты проведения ИФТ, выполненное нами исследование можно считать своего рода первой попыткой широкого обсуждения необходимости разработки унифицированных подходов к применению проточной цитометрии в онкогематологии.

Анализ полученных результатов показал наличие 4 основных категорий расхождений.

Первой выявленной проблемой оказалась диагностика ВП-ОЛЛ на фоне выраженной В-линейной регенерации в КМ. Более чем в половине участвовавших лабораторий высокое относительное содержание нормальных ВП было интерпретировано как рецидив ВП-ОЛЛ. Выраженная регенерация КМ может являться причиной ошибок в диагностике как первичного ОЛЛ (реже), так и рецидивов опухоли (чаще), поэтому умение четко различать иммунофенотип опухолевых и нормальных ВП крайне важно. Однако, возможно, именно благодаря проведению кругового исследования удалось обратить внимание участников на наличие данной проблемы. Вероятно, итогом станет более внимательный анализ относительно небольших популяций ВП в КМ пациентов с подозрением на ОЛЛ или рецидив данного заболевания.

Второй существенной проблемой стала крайняя вариабельность заключений по ИФТ пациентов с Т-ОЛЛ. Способов ее решения два. При диагностике ОЛЛ нужно либо пользоваться уже созданными классификациями, либо путем детального многоцентрового обсуждения сформулировать новую оригинальную систему диагностики ОЛЛ. Однако до тех пор, пока такое обсуждение не проводится, приходится интерпретировать результаты проточной цитометрии в соответствии с классификацией EGIL [6]. Это, в свою очередь, требует четкого соблюдения критериев диагностики каждого из иммунологических вариантов Т-ОЛЛ [6], что существенно ограничивает субъективный компонент ИФТ. Следует также отметить, что большинство лабораторий не отмечали в заключениях соответствие антигенного профиля blasts клинически значимой группе ЕТР-ОЛЛ [10, 11]. Однако данная категория не входит в классификацию EGIL, поэтому она должна указываться отдельно от иммунологического варианта ОЛЛ (от Т1 до Т1V), но не заменять его. В отличие от Т-ОЛЛ, при ВП-ОЛЛ результаты, полученные из разных лабораторий, отличались несущественно.

Третьей причиной расхождения результатов стали сложности в диагностике лейкозов неясной линейности. Существенные различия в критериях определения

бифенотипического (EGIL [6]) и смешанно-фенотипического (ВОЗ [9]) ОЛ вносят некоторую путаницу как в терминологию, так и в саму интерпретацию данных проточной цитометрии. Выходом может являться коллективное решение, какой из систем пользоваться, либо договоренность указывать соответствие иммунофенотипа категориям по обеим классификациям.

Наконец, существенные различия формата заключений крайне затрудняют стандартизацию ИФТ. Необходимым является регламентирование как перечисления антигенов и степени их экспрессии, так и описательной части бланка. За образец могут быть взяты уже имеющиеся примеры, принятые в различных исследовательских группах [23, 24], однако возможна и разработка оригинальной системы документирования результатов.

Отдельно стоит вопрос о том, коэкспрессию каких антигенов необходимо указывать в итоговом заключении. Клиническое значение обнаружения миелоидных маркеров при ОЛЛ является предметом дискуссий и никак не влияет на выбор терапии, равно как и выявление В-линейных антигенов при Т-ОЛЛ. Однако традиционно в большинстве лабораторий такие коэкспрессии ука-

зываются в заключении. Также актуален вопрос, насколько целесообразно озвучивать сделанные на основе иммунофенотипа опухоли предположения о наличии тех или иных молекулярно-генетических aberrаций.

Важно отметить, что интерпретация результатов является лишь одной из составных частей ИФТ, поэтому для полноценной стандартизации данного исследования необходима выработка консенсуса также в подборе антител, методике пробоподготовки, настройке цитометра и анализе цитометрических данных.

Заключение

В целом проведенное исследование показало наличие существенных расхождений в подходах к интерпретации результатов диагностического ИФТ ОЛЛ, прежде всего при Т-линейной принадлежности опухолевых клеток. Только дальнейшие подобные исследования с широким обсуждением результатов и итоговой разработкой консенсусного алгоритма анализа данных проточной цитометрии позволят сделать первые шаги в стандартизации применения данного лабораторного метода в онкогематологии в Российской Федерации и странах СНГ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Pui C.H., Carroll W.L., Meshinchi S., Arceci R.J. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *J Clin Oncol* 2011;29:551–65. DOI: 10.1200/JCO.2010.30.7405.
- Pui C.H., Mullighan C.G., Evans W.E., Relling M.V. Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there? *Blood* 2012;120:1165–74. DOI: 10.1182/blood-2012-05-378943.
- Faderl S., O'Brien S., Pui C.H. et al. Adult acute lymphoblastic leukemia: concepts and strategies. *Cancer* 2010;116(5):1165–76. DOI: 10.1002/cncr.24862.
- van Dongen J.J. M., Orfao A. EuroFlow: resetting leukemia and lymphoma immunophenotyping. Basis for companion diagnostics and personalized medicine. *Leukemia* 2012;26(9):1899–907. DOI: 10.1038/leu.2012.121.
- Kalina T., Flores-Montero J., Lecomte Q. et al. Quality assessment program for EuroFlow protocols: summary results of four-year (2010–2013) quality assurance rounds. *Cytometry A* 2015;87(2):145–56. DOI: 10.1002/cyto.a.22581.
- Bene M.C., Castoldi G., Knapp W. et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 1995;9(10):1783–6. PMID: 7564526.
- Bene M.C., Bernier M., Casasnovas R.O. et al. The reliability and specificity of c-kit for the diagnosis of acute myeloid leukemias and undifferentiated leukemias. The European Group for the Immunological Classification of Leukemias (EGIL). *Blood* 1998;92(2):596–9. PMID: 9657760.
- Bene M.C., Nebe T., Bettelheim P. et al. Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. *Leukemia* 2011;25(4):567–74. DOI: 10.1038/leu.2010.312.
- Vardiman J., Thiele J., Arber D. et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009;111:937–51. DOI: 10.1182/blood-2009-03-209262.
- Coustan-Smith E., Mullighan C.G., Onciu M. et al. Early T-cell precursor leukaemia: a subtype of very high-risk acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol* 2009;10:147–56. DOI: 10.1016/S1470–2045(08)70314-0.
- Бойченко Э.Г., Попов А.М., Макарова Т.А. и др. Острый лимфобластный лейкоз из ранних предшественников Т-клеток (обзор литературы и собственные клинические наблюдения). *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2015;1:38–45. [Boychenko E.G., Popov A.M., Makarova T.A. et al. Acute lymphoblastic leukemia from early T-progenitor cells (a literature review and own experiences). *Voprosy gematologii i immunopatologii v pediatrii = Hematology/Oncology and Immunopathology in Pediatrics* 2015;1:38–45. (In Russ.)].
- Fechina L., Shorikov E., Tsaur G. et al. Contribution of all-trans retinoic acid to improved early relapse-free outcome in infant acute lymphoblastic leukemia comparing to the chemotherapy alone. *Blood* 2007;110(11):832A. Abstr. 2828.
- Румянцева Ю.В., Карачунский А.И., Румянцев А.Г. Оптимизация терапии острого лимфобластного лейкоза у детей в России. *Педиатрия* 2009;4:19–27. [Rumyantseva Yu.V., Karachunskiy A.I., Rumyantsev A.G. Children acute lymphoblastic leukemia therapy optimization in Russia. *Pediatriya = Pediatrics* 2009;4:19–27. (In Russ.)].
- Паровичникова Е.Н., Троицкая В.В., Соколов А.Н. и др. Промежуточные результаты по лечению острых Ph-негативных лимфобластных лейкозов у взрослых больных (итоги российской исследовательской группы по лечению острых лимфобластных лейкозов (RALL)). *Онкогематология* 2014;3:6–15. [Parovichnikova E.N., Troitskaya V.V., Sokolov A.N. et al. Interim treatment results of adult Ph-negative acute lymphoblastic leukemia (results of the Russian research group for the treatment of acute lymphoblastic leukemia (RALL)). *Onkogematologiya = Oncohematolog*, 2014; 3:6–15. (In Russ.)].

15. Литвинов Д. В., Карелин А. Ф., Романова К. И. Лечение острого лимфобластного лейкоза у детей: современные возможности и нерешенные проблемы. Доктор.Ру 2015; 10:30–7. [Litvinov D. V., Karelin A. F., Romanova K. I. et al. Treatment of acute lymphoblastic leukemia in children: current opportunities and unresolved issues. Doctor.ru 2015; 10:30–7. (In Russ.)].
16. Зуева Е. Е., Афанасьев Б. В., Тотолян А. А. Иммунофенотипирование в диагностике острых лейкозов (лекция). Клиническая лабораторная диагностика 2004; 7:25–32. [Zueva E. E., Afanasiev B. V., Totolyan A. A. Immunophenotyping in acute leukemia diagnosis (lecture). Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Clinical Laboratory Diagnostics 2004; 7:25–32. (In Russ.)].
17. Луговская С. А., Почтарь М. Е., Тупицин Н. Н. Иммунофенотипирование в диагностике гемобластозов. Тверь: Триада, 2005. 168 с. [Lugovskaya S. A., Pochtar' M. E., Tupitsin N. N. Immunophenotyping in leukemia diagnosis. Tver: Triada, 2005. 168 p. (In Russ.)].
18. Антипова А. С., Баранова О. Ю., Френкель М. А. и др. Острые лейкозы со смешанным фенотипом: клинико-лабораторные особенности и прогноз. Клиническая онкогематология 2015; 2: 136–50. [Antipova A. S., Baranova O. Yu., Frenkel M. A. et al. Acute leukemias with mixed phenotype: clinical and laboratory features and prognosis. Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical Oncohematology 2015; 2: 136–50. (In Russ.)].
19. Попов А. М., Лагойко С. Н., Румянцева Ю. В. и др. Проблемы иммунофенотипирования в России: опыт работы референс-центра кооперированной клинической группы «Москва-Берлин». Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2015; 1:58–61. [Popov A. M., Lagoiko S. N., Rumyantseva Yu. V. et al. Immunophenotyping problems in Russia: reference center of “Moscow-Berlin” cooperative group experience. Voprosi gematologii i immunopatologii v pediatrii = Hematology/Oncology and Immunopathology in Pediatrics 2015; 1:58–61. (In Russ.)].
20. Lucio P., Gaipa G., van Lochem E. G. et al. BIOMED-I concerted action report: flow cytometric immunophenotyping of precursor B-ALL with standardized triple-stainings. Leukemia 2001; 15: 1185–92. PMID: 11480560.
21. McKenna R. W., Washington L. T., Aquino D. A. et al. Immunophenotypic analysis of hematogones (B-lymphocyte precursors) in 662 consecutive bone marrow specimens by 4-color flow cytometry. Blood 2001; 98(8): 2498–507. PMID: 11588048.
22. van Lochem E. G., van der Velden V. H., Wind H. K. et al. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. Cytometry B Clin Cytom 2004; 60B(1): 1–13. DOI: 10.1002/cyto.b.20008.
23. Hrusak O., Basso G., Ratei R. et al. Flow diagnostics essential code: a simple and brief format for the summary of leukemia phenotyping. Cytometry B Clin Cytom 2004; 60B(1): 1–13. PMID: 25057519.
24. Wood B. L., Arroz M., Barnett D. et al. 2006 Bethesda international consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia by flow cytometry: optimal reagents and reporting for the flow cytometric diagnosis of hematopoietic neoplasia. Cytometry B Clin Cytom 2007; 72B(S1): 14–22. DOI: 10.1002/cyto.b.20363.