

# Minimální reziduální nemoc – možnosti detekce u hematologických i nehematologických malignit - eSupplementum

Markéta Kalinová

Ústav patologie a molekulární medicíny, 2. LF UK a FN Motol, Praha

Elektronické supplementum k publikaci "Minimální reziduální nemoc – možnosti detekce u hematologických i nehematologických malignit" v časopise Česko-slovenská patologie.

## Kritéria EuroMRD

### Kritéria pro specifitu

Problémem v případě RQ-PCR detekce Ig/TCR genů může být pozadí zdravých lymfocytů. Aby se zabránilo vzniku falešně pozitivních výsledků, používá se jako negativní kontrola DNA izolovaná ze vzorků periferní krve odebrané od dárců, ideální počet je 10 (stejná směsná DNA, do které se ředí standardní kalibrační křivka) a to minimálně v šesti replikátech do reakce, což v případě amplifikace udává hodnotu pozadí.

### Kritéria pro senzitivitu

Senzitivitu určuje několik faktorů jako je typ Ig/TCR přestavby, velikost a složení N úseku a množství DNA. Senzitivita RQ-PCR systému je nejvyšší ředění, které:

- se specificky amplifikuje
- má nejméně jeden vzorek z replikátu pozitivní
- má nejvyšší Ct replikátů v rozmezí 20 cyklů od Ct 100% infiltrovaného (diagnostického) vzorku
- nejméně jedna hodnota Ct je o nejméně jeden cyklus nižší než nejnižší hodnota Ct pozadí

### Kritéria pro rozmezí kvantifikace

Rozmezí kvantifikace je nejnižší ředění, které:

- se specificky amplifikuje a rozdíl Ct replikátů je 1,5
- jeho průměrná hodnota Ct je o 2,6-4,0 cykly větší než předchozí 10x nižší ředění nebo o 0,5-1,5 cyklu větší než předchozí 5x nižší ředění
- standardní křivka má sklon mezi -3,1 a -3,9 a korelační koeficient je 0,98 a zahrnuje nejméně 3 ředící body přes dvě logaritmická ředění
- jeho průměrná hodnota Ct musí být nejméně o 3 cykly nižší než nejnižší Ct hodnota pozadí

### Hodnocení MRN v reziduálních vzorcích

Hladinu MRN lze vyjádřit ze standardní kalibrační křivky s normalizací ke kontrolnímu genu, jestliže:

- průměrná hodnota Ct replikátů nejvyšší Ct rozmezí kvantifikace a rozdíl Ct replikátů je 1,5
- všechny pozitivní hodnoty pod hodnotou rozmezí kvantifikace by měly být uváděny pouze jako pozitivní, bez uvedení číselné hodnoty
- vzorek je dále pokládán za pozitivní, pokud Ct hodnota nejméně jednoho z replikátů je v rozmezí 4 cyklů od senzitivity a Ct hodnota nejméně jednoho z replikátů je o 1,0 nižší než nejnižší Ct pozadí. Toto pravidlo vzhledem k možnosti falešné positivity je nejspornější a nejdiskutovanější, proto bylo rozšířeno podle následné klinické aplikace: Méně přísná kritéria jsou aplikována tam, kde je nutné vyhnout se falešné negativitě, např. u protokolů s redukcí léčby (Ct hodnota nejméně jednoho z replikátů je o 1,0 nižší než nejnižší Ct pozadí-stejně jako výše). Přísnější kritéria jsou aplikována tam, kde by bylo možno falešnou pozitivitou s následnou aplikací léčby (např. infuzí dárcovských lymfocytů) poškodit pacienta (Ct hodnota nejméně jednoho z replikátů je o 3,0 nižší než nejnižší Ct pozadí) (50,51).

### ✉ Adresa pro korespondenci:

RNDr. Markéta Kalinová, Ph.D.

Ústav patologie a molekulární medicíny 2.LF UK a FN Motol

V Úvalu 84, 150 06 Praha 5

tel.: 224435634

e-mail: marketa.kalinova@lfmotol.cuni.cz