

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Р.А. Часнойть
5 марта 2009 г.
Регистрационный № 138-1108

**СПОСОБЫ ДИАГНОСТИКИ ОСТАТОЧНЫХ ОПУХОЛЕВЫХ
КЛЕТОК ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ТИПАХ ОСТРОГО ЛЕЙКОЗА У ДЕТЕЙ**

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: канд. мед. наук, доц. Н.Н. Савва, канд. биол. наук М.В. Белевцев, канд. биол. наук В.П. Савицкий, канд. биол. наук Т.В. Савицкая, канд. биол. наук А.М. Кустанович, канд. биол. наук А.Н. Мелешко, канд. техн. наук О.В. Красько, д-р мед. наук, проф. О.В. Алейникова, Н.В. Мигаль, В.В. Федосенко, Л.В. Мовчан

Минск 2009

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ПРЕПАРАТОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

- Иммунофенотипическое определение aberrантной экспрессии антигенов лейкоэмических клеток методом трехцветной проточной цитофлуориметрии (ПЦФ): проточный цитофлуориметр с набором прикладных программ; центрифуга; моноклональные антитела (IgG1/IgG2a/CD19, CD45/CD14/CD19, CD20/CD10/CD19, CD58/CD10/CD19, CD10/CD34/CD19, CD10/CD11a/CD19, CD45RA/CD10/CD19); фосфатно-солевой буфер (PBS); раствор для лизиса эритроцитов; раствор параформальдегида 1%.

- Полимеразная цепная реакция для анализа химерных онкогенов: термоциклер; центрифуга с охлаждением на 14000 об/мин; ячейки для горизонтального и вертикального электрофореза с источником тока; набор пипеток с переменными объемами от 0,5 мкл до 1 мл; термомиксер для выделения ДНК; ламинарный шкаф с вертикальным потоком воздуха; набор для выделения тотальной РНК; набор для выделения геномной ДНК, набор для синтеза кДНК; набор для проведения ПЦР; праймеры к химерным онкогенам.

- ПЦР для анализа реаранжировок IgH/TCR.

А. Выделение МНК: фосфатно-солевой буфер (PBS), гистопак, раствор для лизиса эритроцитов; центрифуга на 2000 об/мин; морозильник -20 °С; морозильник -70 °С.

В. Выявление мишеней-реаранжировок Ig/TCR: набор для выделения геномной ДНК; ламинарный шкаф с вертикальным потоком воздуха; фосфатно-солевой буфер; вортекс; ультрацентрифуга с охлаждением на 14000 об/мин; набор пипеток с переменными объемами от 0,5 мкл до 1 мл; термомиксер для выделения ДНК; фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (25:24:1); хлороформ, ацетат аммония, изопропанол, этанол 70%, этанол 96%; набор реагентов для проведения ПЦР; таq-ДНК-полимераза; панель праймеров (олигонуклеотидов) к Ig/TCR генам; термоциклер; спектрофотометр; агароза; маркер молекулярного веса ДНК для электрофореза; аппарат для горизонтального (агарозного) электрофореза с источником тока; гель-документирующая система с фото- или видеокамерой; аппарат для вертикального (PAGE) электрофореза с источником тока; набор для секвенирования BigDye® Terminator v1.1 (или v3.1) Cycle Sequencing Kit; генетический анализатор (секвенатор)

С. Количественное измерение МРБ: аллель-специфические олигонуклеотиды (АСО); набор для количественной ПЦР в реальном времени ПЦР Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG; аппарат для ПЦР «в реальном времени».

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Современные успехи в лечении острых лейкозов (ОЛ) достигнуты благодаря эффективной полихимиотерапии (ПХТ), базирующейся на четкой стратификации на группы риска. В настоящее время основной проблемой,

влияющей на бессобытийную выживаемость, являются рецидивы. Дальнейшее улучшение результатов первой линии лечения острых лейкозов может происходить за счет оптимизации групп риска и индивидуализации терапии. Оценка ответа на лечение проводится микроскопическими (цитоморфологическими) и субмикроскопическими (выявление остаточных опухолевых клеток (ООК) — минимальной резидуальной болезни) методами. Субмикроскопическая оценка ответа на терапию индукции ремиссии является важным фактором в прогнозе рецидива.

Минимальная резидуальная болезнь (МРБ) может быть определена 2 основными методами: проточной цитофлуориметрией и молекулярно-генетическим методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Методология определения МРБ при различных типах ОЛ в настоящее время достаточно отработана как в плане постановки различными методами, так и интерпретации результатов. Однако ни один метод не дает возможности детекции МРБ у всех пациентов. Поэтому разработан алгоритм использования различных методов определения МРБ с целью осуществления возможности субмикроскопической оценки ответа на лечение у максимального числа пациентов.

Данная инструкция разработана для оптимизации использования методов детекции МРБ при лечении детей с острыми лейкозами.

Область применения: детская онкология и гематология.

Уровень внедрения: республиканский.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПОСОБА

Алгоритм применения способов диагностики остаточных опухолевых клеток при различных типах ОЛ у детей

Характеристика методов, используемых в настоящее время для определения МРБ при различных типах острых лейкозов у детей, приведена в табл. 1 и 2. Особенностью метода ПЦФ является зависимость аппликабельности от количества маркировочных цветов (при трехцветной цитофлуориметрии использование метода возможно примерно у 70% больных с ОЛЛ). Использование сочетания метода проточной цитофлуориметрии и ПЦР-анализа реаранжировок Ig/TCR дает возможность мониторировать МРБ более чем у 98% больных. При ОМЛ использование метода трехцветной цитофлуориметрии затруднительно, так как существует проблема низкой чувствительности (недостаточно маркеров для определения aberrантного иммунофенотипа лейкоэмических клеток). Кроме того, на фоне лечения наблюдается сдвиг иммунофенотипа. Мониторинг МРБ по детекции химерных онкогенов является в настоящее время наиболее оптимальным при ОМЛ, но применим лишь у $1/3$ больных (табл. 1).

Таблица 1

Применимость методов оценки МРБ при различных типах острых лейкозов у детей

Метод	ОЛЛ, все типы, %	ОЛЛ из предшественников В-клеток, %	Т-ОЛЛ, %	ОМЛ, %
ПЦФ (4–6-цветная)	98	>95	>95	93
ПЦР анализ химерных онкогенов	<50	40–45	15–35	<30
ПЦР-анализ реаранжировок IgH/TCR	95	90–95	90–95	<10

Таблица 2

Характеристика методов, используемых в настоящее время для определения МРБ (по Szczepański T., 2007)

Чувствительность	ИФТ	ПЦР анализ химерных онкогенов	ПЦР-анализ реаранжировок IgH/TCR
		10^{-3} (при ОМЛ) – 10^{-4} (при ОЛЛ)	10^{-4} – 10^{-6}
Преимущества	Применим у большинства пациентов Относительно дешев Быстрый: 1–2 дня	Относительно легкий и дешевый Чувствительный и специфичный для лейкемии Быстрый: 2–3 дня Подходит для мониторингования однотипных групп больных (BCR/ABL и др.)	Применим теоретически у всех больных, если IgH, IgK-Kde, TCRG и TCRD гены используются как мишени; чувствительный и пациент-специфичный; быстрый для отслеживания follow-up, если функциональный регион идентифицирован

			и если используется RQ-PCR)
Недостатки	Ограниченная чувствительность, необходимо установить желательно 2 абберантных иммунофенотипа на больного, так как существует вероятность иммунофенотипического шифта; индуцированная лекарствами модуляция иммунофенотипа может влиять на уровень экспрессии Ag	Может быть использован у небольшого количества больных и не специфичен для данного больного — кросс-контаминация ПЦР-продуктом может привести к ложно-положительным результатам (даже при диагностике); могут быть различия в экспрессии транскрипта у одного пациента; стабильность транскриптов химерных онкогенов может снижаться	Длительный на момент диагностики; относительно дорогой; требует, как правило, 2-х мишеней на пациента, так как существует возможность клональной эволюции Две чувствительные мишени ($\leq 10^{-4}$) возможно найти лишь у 80% больных

Алгоритм использования различных методов для определения МРБ у детей с ОЛ должен включать на первом этапе (диагностическом) определение МРБ методом ПЦФ и замораживание образцов КМ для мониторинга МРБ путем выявления реаранжировок TCR/IgH (при ОЛЛ) или химерных онкогенов (при ОЛЛ и ОМЛ) (рис. 1а и рис. 2). Мониторирование МРБ на поддерживающей терапии для преТ/Т-ОЛЛ показано на рис. 1б.

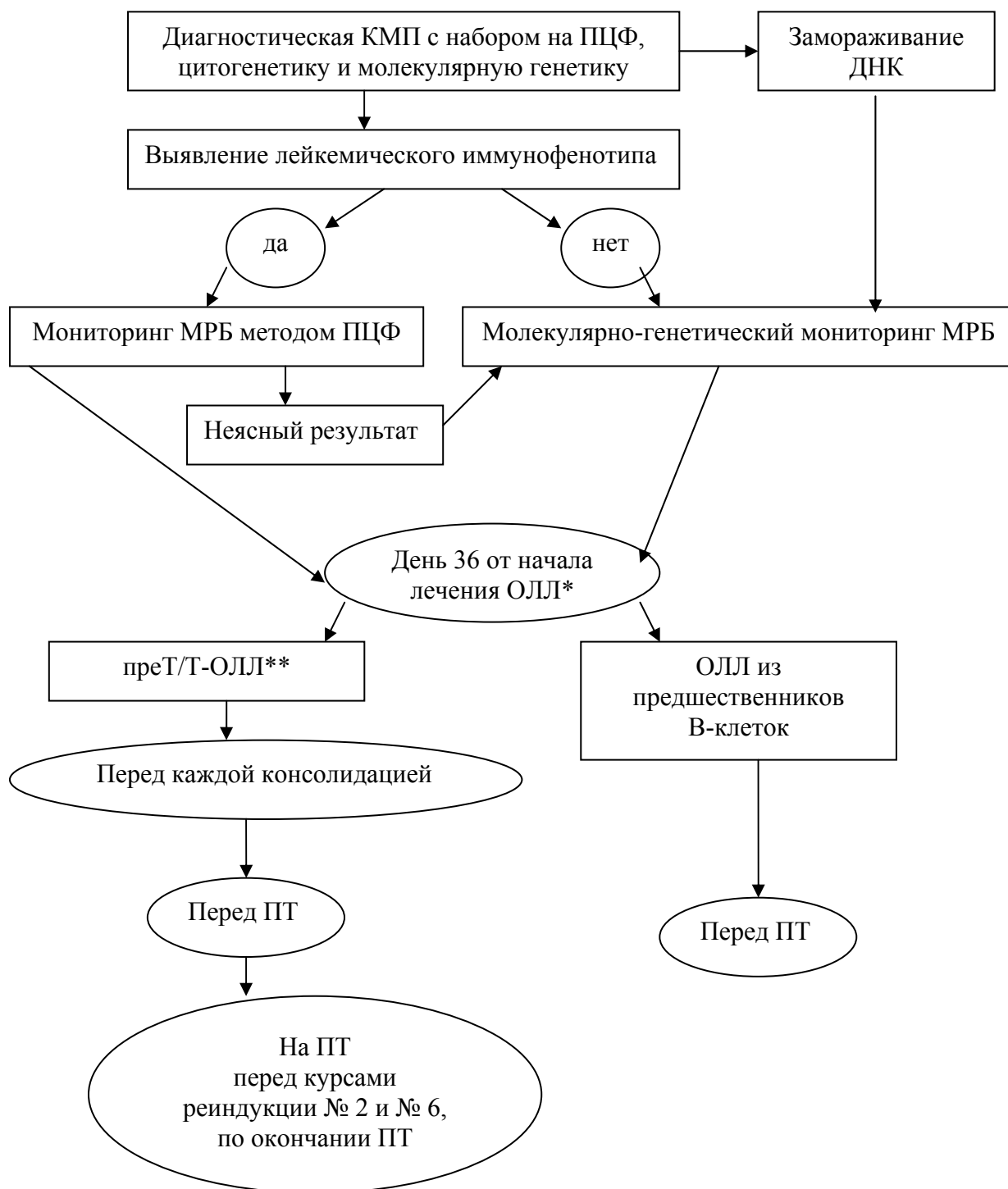


Рис. 1а. Алгоритм исследования МРБ путем использования нескольких методов при разных типах ОЛЛ у детей

*Оценка ответа на индукцию ремиссии.

**При Т-ОЛЛ мониторинг МРБ можно проводить не только в КМ, но и в ПК при типичном Т-ОЛЛ. КМП — костно-мозговая пункция, ПЦФ — проточная цитофлуориметрия, МРБ — минимальная резидуальная болезнь, ОЛЛ — острый лимфобластный лейкоз, ПТ — поддерживающая терапия.

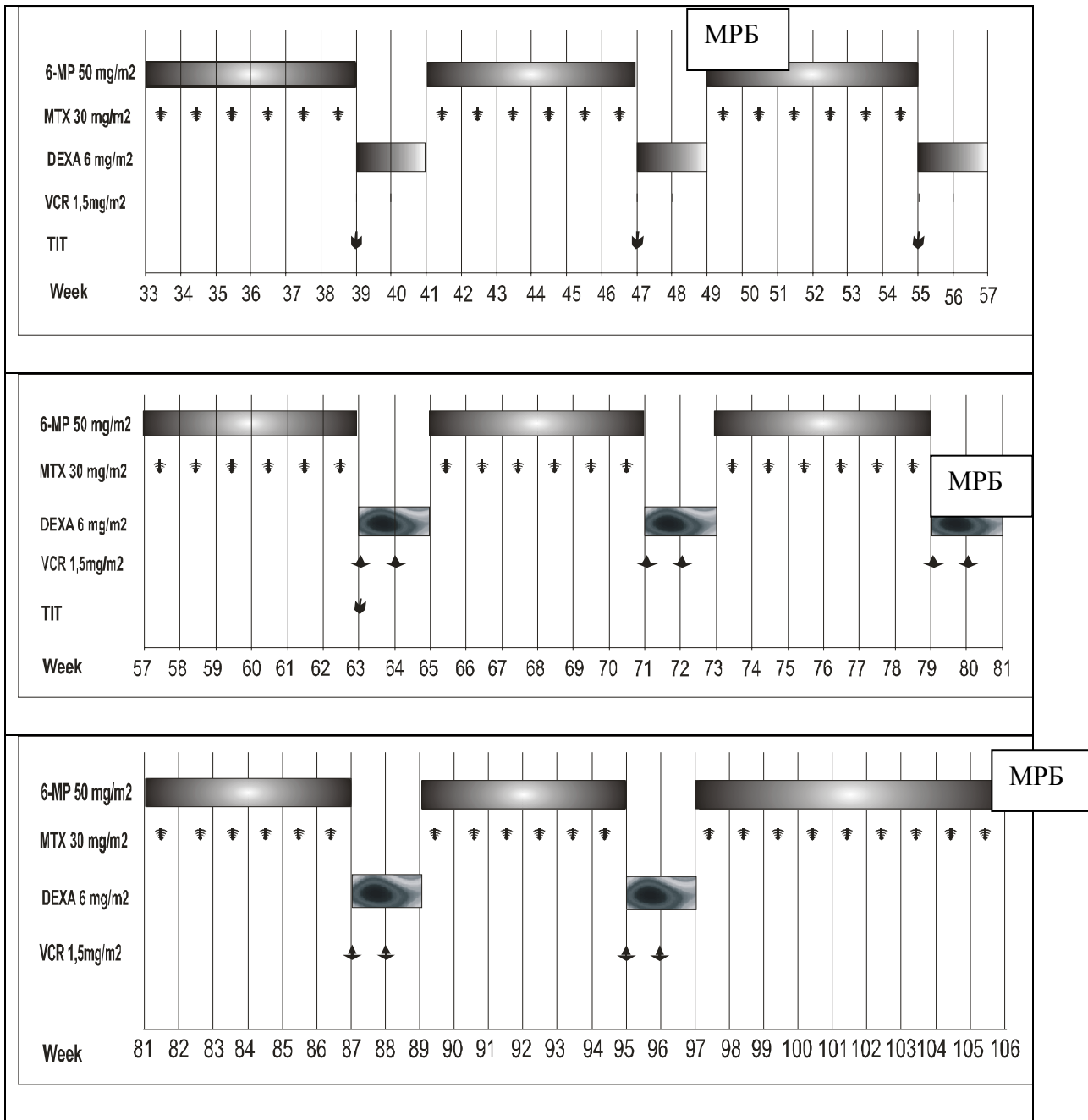


Рис. 1. Точки мониторингования MRБ на поддерживающей терапии при преТ/Т-ОЛЛ (группа промежуточного риска)

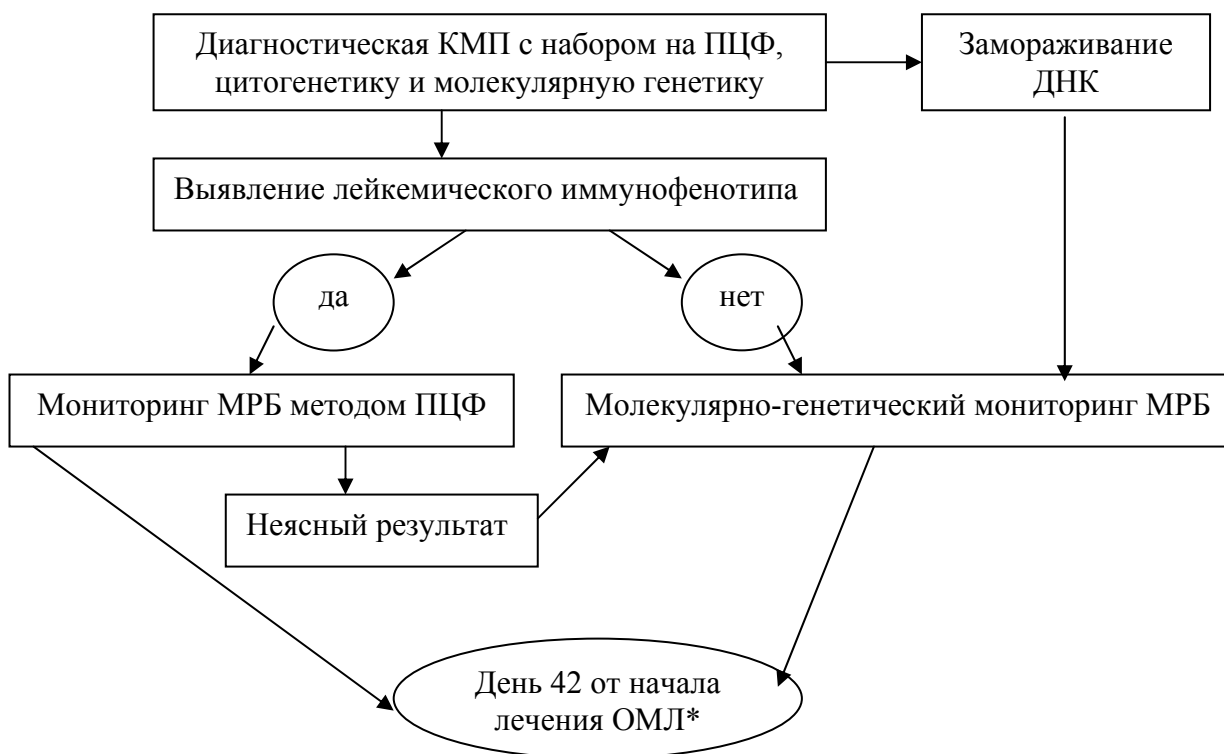


Рис. 2. Алгоритм исследования МРБ путем использования нескольких методов при ОМЛ у детей

*Оценка ответа на индукцию ремиссии, материал — КМ.

Краткое описание методов детекции МРБ

Иммунофенотипическое определение aberrантной экспрессии антигенов лейкемических клеток методом трехцветной ПЦФ

При ОЛЛ методологический подход заключается в анализе степени экспрессии определенных ИФТ-маркеров (или их комбинации) на CD19+ клетках КМ. С этой целью предварительно из анализа исключаются лейкоциты, не относящиеся к В-клеткам, путем установки «ворот» во всех пробах по маркеру CD19 (рис. 3).

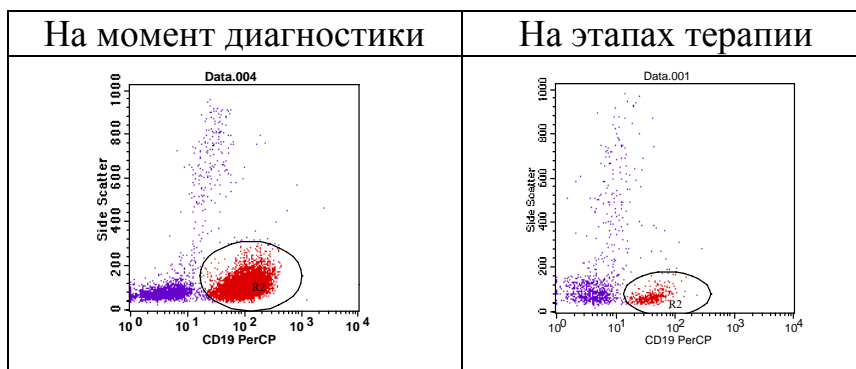


Рис. 3. Пример выделения CD19 клеток на момент диагностики и на этапах терапии среди лейкоцитов

Определяют относительное содержание остаточных опухолевых клеток в КМ. Используют следующие комбинации моноклональных антител (МКА): IgG1/IgG2a/CD19, CD45/CD14/CD19, CD20/CD10/CD19, CD58/CD10/CD19, CD10/CD34/CD19, CD10/CD11a/CD19, CD45RA/CD10/CD19. Результат расценивается как положительный при наличии 10 и более опухолевых клеток в виде кластера при учете 300000 ядросодержащих клеток костного мозга.

При ОМЛ методологический подход заключается в анализе степени экспрессии определенных ИФТ (или их комбинации) и сопоставлении с экспрессией данных маркеров на лейкозных клетках до начала специфической терапии на CD45+ клетках КМ. Для этого предварительно из анализа исключаются лейкоциты, не относящиеся к миелобластам, путем выделения гейта во всех пробах по CD45 маркеру. Используют МКА в следующих комбинациях: IgG1/IgG2a/CD45, CD45/CD14, CD7/CD13/CD45, CD34/CD33/CD45, CD34/CD117/CD45. На рис. 4 представлен пример идентификации лейкоэмических клеток в образце КМ пациента с ОМЛ: распределения клеток по степени экспрессии основных миелоидных маркеров CD33, CD117 и маркера ранних стволовых клеток CD34.

Начало терапии

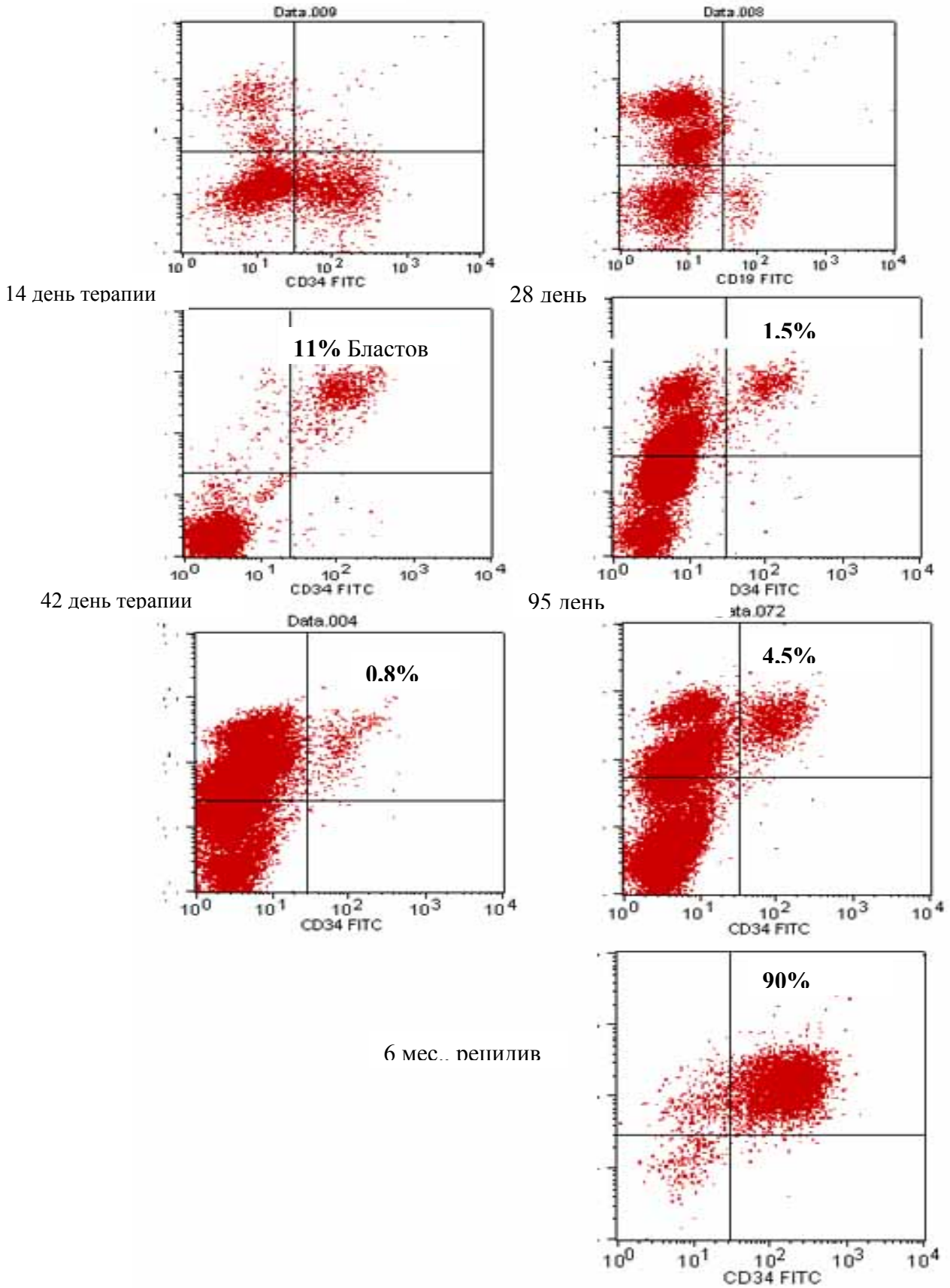


Рис. 4. Методология определения минимальной резидуальной болезни методом проточной цитометрии у пациента с ОМЛ

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) для анализа химерных онкогенов

1. Выделение МНК из образцов КМ и/или периферической крови.
2. Выделение суммарной РНК.
3. Синтез кДНК.
4. Определение МРБ методом ПЦР в реальном времени.

Определение МРБ методом ПЦР в реальном времени с использованием в качестве мишени химерных онкогенов (BCR-ABL, MLL-AF4, TEL-AML1, SIL-TAL1, E2A-PBX1, AML1-ETO, CBFB-MYH11, PML-RARA) проводили с использованием стандартизованного протокола, предложенного в 2003 г. в рамках Европейской Программы по борьбе с раком. Эффективность, чувствительность и воспроизводимость ПЦР-исследования определяли по характеристикам построенных калибровочных кривых. Коэффициент корреляции R², отражающий точность расположения калибровочной прямой, должен составлять 0,997–1,0; угол наклона калибровочной прямой (-3,2) – (-3,6); эффективность ПЦР — 89–110%.

Для каждого пациента количество химерного транскрипта было нормализовано по отношению к количеству контрольного гена в этом же образце, т. е. исследуемый химерный онкоген/контрольный ген. Нормализованное значение химерного транскрипта в первой точке (момент диагностики) принимается как 100%. Все образцы были анализированы в дубликатах. Образцы с уровнем экспрессии контрольного гена — негативные или имеющие значение менее 1000 копий — исключались из исследования. Позитивные и негативные контроли включали во все исследования.

ПЦР для анализа реаранжировок IgH/TCR

1. Выделение моноклеарных клеток (МНК).
2. Выделение геномной ДНК.
3. Выявление мишеней-реаранжировок генов Ig/TCR.
4. Измерение уровня МРБ методом количественной ПЦР «в реальном времени».
5. Проверка специфичности и чувствительности анализа.
6. Количественный анализ МРБ.

Мишени для анализа МРБ — клональные реаранжировки генов Ig/TCR выявляют в первичном образце КМ мозга, взятого на 0 день терапии (в день диагностики). Метод полимеразной цепной реакции используют для амплификации соединительных (CDR3) регионов перестроенных генов IgH, IgK, TCRD и TCRG с применением праймеров к V, D и J-генным сегментам. Реаранжировки тяжелой цепи иммуноглобулина (IgH) следует анализировать в 6 ПЦР с использованием 6 «прямых» праймеров, специфических к отдельным семействам генных сегментов (VH1-VH6), в паре с одним «обратным» JH праймером. Для TCRD гена определяют две перестройки, полная V δ 1-J δ 1 и неполная V δ 2-D δ 3. Для IgK гена (каппа-цепь иммуноглобулина) анализируют 3 варианта делеции этого гена с участием генных сегментов Vk-I, II, III семейств и KDE (каппа-делецирующий элемент). При оценке реаранжировок гена TCRG, IgK и V δ 1-J δ 1 гена TCRD использовать протокол и праймеры, предложенные в соответствии с

рекомендациями Европейского многоцентрового исследования BIOMED-1 CONCERTED ACTION. Для идентификации моно- и поликлональных продуктов реакции ПЦР, не различимых при электрофорезе в агарозном геле, следует использовать гетеродуплексный анализ в неденатурирующих условиях. Элюированную ДНК секвенируют для идентификации мишени. При необходимости ДНК повторно реамплифицируют с теми же праймерами. Реакцию секвенирования проводят с помощью набора BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) на автоматическом капиллярном ДНК-анализаторе ABI PRISM 3130. Каждую мишень следует секвенировать как минимум дважды с каждым из пары праймеров (прямой и обратный). Полученные последовательности уравнивают для уточнения результатов и получения общей итоговой последовательности с помощью программы ContigExpress из пакета Vector NTI Advance 9. Далее проводят анализ нуклеотидной последовательности с целью выявления V, D, J-генных сегментов и соединительного региона, в т. ч. нематричных (N) нуклеотидов. Для этой цели следует использовать специализированные интернет-программы, такие как IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system® <http://imgt.cines.fr/> (для всех генов Ig/TCR) и IgBLAST <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/> (только для генов IgH и IgK). Альтернативно полная база данных генных сегментов может использоваться для анализа реаранжировки с помощью программ BioEdit и MEGA-3. Дизайн аллель-специфичного праймера (АСО) выполняют с помощью программ OLIGO 6.0, Primer Express либо веб-программы Primer-3 http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi. Дизайн праймера выполняется по следующим критериям: Длина праймера должна составлять 19–25 н.; Температура «плавления» праймера должна быть 58–61 °С при стандартной ПЦР с $T_m=60$ °С; Праймер подбирается к месту соединения V-N-(D-N-)-J или V-N-D-генных сегментов, полностью с полным совпадением с нематричными (N) нуклеотидами; 3'-конец праймера должен находиться в области N нуклеотидов или заходить на следующий генный сегмент не более чем на 4 (3 GC) нуклеотида; Праймер должен формировать наименьшее количество вторичных (самокомплементарных) структур.

Подобранные АСО-праймеры используются в паре с герминальным праймером и TaqMan-зондом. В зависимости от расположения праймера и зонда возможно использование как «прямого» АСО-праймера, так и «обратного», обратного и комплементарного кодирующей последовательности реаранжировки. Схема расположения праймеров и зондов изображена на рис. 5, перечень герминальных праймеров и зондов для ПЦР в «реальном времени» представлен в табл. 3. Все зонды мечены флуоресцентными метками: в качестве репортерной флуоресцентной метки используют краситель FAM (FITC), а гасителя — BHQ-1 (Black Hole Quenchers). После получения АСО-праймера следует проводить проверку его специфичности. Для этого выполняют реакцию ПЦР в «реальном времени» с диагностической ДНК пациента (на 0 день терапии) в дуплетах, параллельно

с неспецифическим контролем (смесь поликлональной ДНК от 5-10 доноров ПК), в триплетах.

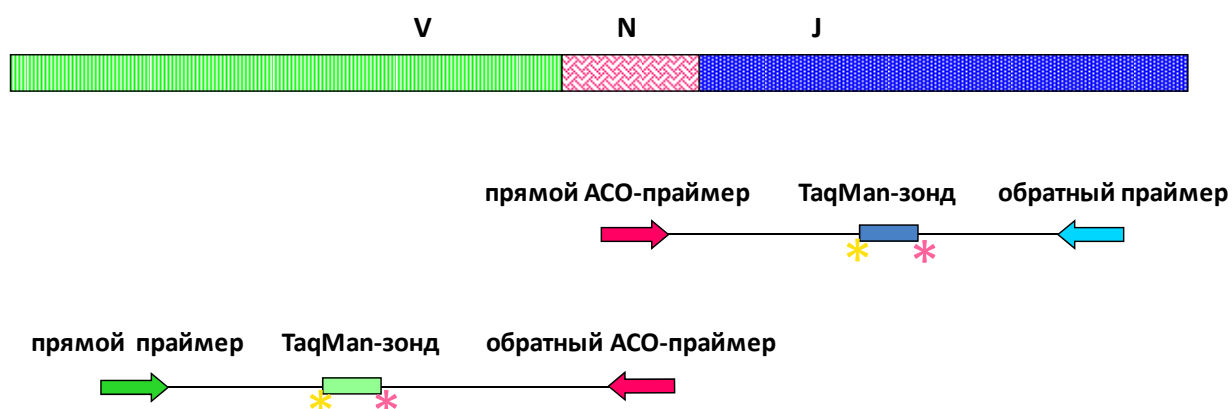


Рис. 5. Схема расположения АСО-праймера, герминального праймера и ТМ-зонда относительно V-N-J реаранжировки

Таблица 3

Последовательности консенсусных (герминальных) праймеров для стандартизованного ПЦР-анализа в «реальном времени»

Ген/реаранжировка	Последовательность праймера/зонда
<i>IgK (Vk-KDE)</i>	
обратный (kdeR)	AGACCCTTCAGGCACATGCTT
TM-probe (kdeTM)	FAM-TCCTCAGAGGTCAGAGCAGGTTGTCCT-BHQ
<i>TCRD (Vd2-Dd3)</i>	
обратный (Dd3R)	CTGCTTGCTGTGTTTGTCTCCT
TM-probe (Dd3TM)	FAM-ATATCCTCACCTGGGTCCCATGCCT-BHQ
<i>TCRD (Vd1-Jd1)</i>	
обратный (Jd1R)	TGCCTTAACCTTAAACTTCAGA
TM-probe (Jd1TM)	FAM-AACCCGTGTGACTGTGGAACCAAGT-BHQ
<i>TCRD (Vd2-Dd3)</i>	
прямой (Vd2F)	CCCAAGGTAACACAATCACTT
TM-probe (Vd2TM)	FAM-TACCGAGAAAAGGACATCTATGGCCCT-BHQ
<i>TCRG (Vg-Jg1/2) (Vg-Jg1.3, 2.3)</i>	
обратный (Jg1/2R)	GTTTAATAATTCCTGCTTCCCTCTAT
TM-probe (Jg1/2TM)	FAM-TCCGATACTTACCTGTGACAACAAGTGT-BHQ
<i>TCRG (Vg-JPg1/2) (Vg-Jg1.1, 2.1)</i>	
обратный (JPg1/2R)	ACCCTGAAAAATTGCTGTTCGT

TM-probe (JPg1/2TM)	FAM-TACTGAGGCCAGGAATGTGACATATTCAG-BHQ
<i>albumin</i>	
Albumin1 (прямой)	TGAAACATACGTTCCCAAAGAGTTT
Albumin2 (обратный)	CTCTCCTTCTCAGAAAGTGTGCATAT
TM-probe albumin	FAM-TGCTGAAACATTCACCTTCCATGCAGA-BHQ
<i>IgH(VH-JH)</i>	
R-JH1-intron (обратный)	CGCTATCCCCAGACAGCAGA
R-JH2-intron (обратный)	GGTGCCTGGACAGAGAAGACT
R-JH3-intron (обратный)	AGGCAGAAGGAAAGCCATCTTAC
R-JH4-intron (обратный)	CAGAGTTAAAGCAGGAGAGAGAGGTTGT
R-JH5-intron (обратный)	AGAGAGGGGGTGTTGAGGACT
R-JH6-intron (обратный)	GCAGAAAACAAAGGCCCTAGAGT
T-JH1.2.4.5-intron	FAM-CCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGTG-BHQ
T-JH3-intron	FAM-CAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA-BHQ
T-JH6-intron	FAM-GCAGAAAACAAAGGCCCTAGAGT-BHQ

Оценивают значение цикла ПЦР реакции (Ct), на котором амплификационная кривая пересекла пороговый уровень (threshold). Праймер считают пригодным для количественного анализа, если амплификация ДНК первичного образца: имеет характерную форму логистической кривой; началась ранее 27–28 цикла; разница между ним и поликлональным контролем превышает 20 циклов. В идеале поликлональный образец ДНК вообще не дает амплификации, что позволяет судить об отсутствии неспецифической амплификации. Следует отметить, что специфичность мишени (АСО-праймера) зависит не только от правильного дизайна и качества анализа, но в значительной мере от последовательности реаранжировки. В случае очень маленького соединительного региона специфичность мишени может и не достигаться. В этом случае целесообразно использовать другую мишень. Количественный анализ МРБ выполняют методом ПЦР «в реальном времени» и построения стандартной (калибровочной) кривой. Для измерения количества мишени ДНК пациента при первичном диагнозе следует разводить в поликлональной ДНК донора с шагом в 1 порядок до 10^{-6} (1 к 1 000 000) (можно ограничиться разведением до 10^{-5}). Аналогично для определения количество ДНК в образце ДНК пациента разводят в воде. Все разведения измеряются в дуплетах, на основании чего строится стандартная кривая.

Стандартная кривая является количественной моделью МРБ, отражает специфичность, чувствительность анализа и является средством измерения уровня мишени. Стандартная кривая должна соответствовать следующим критериям: должна включать в себя как минимум 3 точки разведения; охватывать диапазон как минимум 2 порядка разведения; иметь угол наклона (slope) от -3,1 до 3,9, оптимально 3,3–3,4; коэффициент корреляции должен быть выше 0,9; эффективность ПЦР может варьировать в интервале 90–

110%. При постановке ПЦР «в реальном времени» все разведения, включая «нулевое разведение» — неразбавленную первичную ДНК пациента, следует задавать в качестве количественных «стандартов» в соответствии с инструкцией к аппарату для real-time PCR. Каждый образец ДНК из костного мозга от пациентов на этапах лечения (follow-up образцы) исследовать ПЦР в триплетах как с праймерами/зондом для выявления реаранжировки (АСО-праймер, герминальный праймер и ТМ-зонд), так и на контрольный ген альбумина. Уровень амплификации в образцах для мишени (реаранжировка) и контрольного гена альбумина автоматически рассчитывается по стандартной кривой для каждой точки прибором ПЦР «в реальном времени», и выдается в виде стандартного количества SQ. Уровень амплификации контрольного гена (альбумина) необходимо использовать для нормализации результатов измерения МРБ между разными образцами по количеству и качеству ДНК. Расчет уровня МРБ для каждого follow-up образца выполнять по формулам:

$$\text{Поправочный коэффициент} = \frac{\text{SQ(альбумин) [follow-up]} / \text{SQ (альбумин)}}{\text{[первичный диагноз]}}$$

$$\text{Снижение мишени} = \frac{\text{SQ(мишень) [follow-up]} / \text{SQ (мишень) [первичный}}{\text{диагноз]}}$$

$$\text{МРБ уровень} = \text{Поправочный коэффициент} / \text{Снижение мишени}$$

Полученный таким образом уровень МРБ выражен в долях от единицы, и показывает, во сколько раз снизилось количество бластных клеток в костном мозге по сравнению с их количеством при диагностике. Результат исследования определяется как позитивная МРБ, выраженная количественно; позитивная неколичественная МРБ; отрицательная МРБ.

Критерии количественной позитивной МРБ: значение C_t для по крайней мере одного образца из триплета более чем на 3 цикла ниже, чем наименьший C_t поликлонального контроля; ΔC_t в репликах $\leq 1,5$; среднее C_t триплета находится внутри «количественного интервала», полученного при построении стандартной кривой.

Критерии позитивной неколичественной МРБ: ΔC_t в репликах $> 1,5$; все C_t образца выходят за пределы «количественного интервала»; уровень МРБ в этом случае точно определить невозможно, указывается только диапазон, например, $< 10^{-3}$.

Критерии негативной МРБ: специфическая амплификация мишени отсутствует полностью; значение всех C_t из триплета более чем на 3 цикла ниже, чем наименьший C_t поликлонального контроля; все C_t образца более чем на 4,0 выходят за пределы «количественного интервала».