

Charakterystyka i częstość występowania koekspresji w ostrych białaczkach u dzieci

Characteristics and frequency of coexpression in acute lymphoblastic leukemia in children

Jolanta Kaufmann¹, Bogdan Mazur¹, Tomasz Szczepański²

STRESZCZENIE

¹Katedra i Zakład Mikrobiologii i Immunologii oraz

²Katedra i Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii Dziecięcej Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

WSTĘP

Ostra białaczka limfoblastyczna (*acute lymphoblastic leukemia* – ALL) jest najczęstszą postacią białaczki u dzieci i stanowi około 80% wszystkich białaczek wieku rozwojowego, z czego 70–80% pochodzi z linii limfocyta B, a jedynie 15–20% z linii limfocyta T. Ostra białaczka nielimfoblastyczna (*acute myeloid lymphoblastic* – AML) stanowi około 20% wszystkich białaczek wykrywanych u dzieci. Cytometryczna analiza immunofenotypu komórek białaczkowych pozwala określić przynależność do danej linii komórkowej oraz stopień dojrzałości, a także wykryć fenotypy nietypowe. Celem pracy było określenie częstości i rodzaju występowania koekspresji w ostrych białaczkach u dzieci.

MATERIAŁ I METODY

Przeanalizowano grupę 275 dzieci z ALL diagnozowanych w Klinice Pediatrii i Hematologii w Zabrze w latach 1995–2007. Materiałem był szpik kostny lub krew obwodowa zawierająca nie mniej niż 80% komórek blastycznych. W badaniach zastosowano metodę znakowania pełnej krwi lub szpiku z liszą erytrocytów. Użyto przeciwciał sprzężonych z fluorochromami FITC, PerCP lub PE skierowanych przeciwko antygenom: CD1a/CD2/CD3/CD4/CD5/CD7/CD8/CD10/CD13/CD14/CD15/CD19/CD20/CD22/CD33/CD34/CD117/HLA-DR/MPO/TdT.

ADRES

DO KORESPONDENCJI:

Dr n. med. Jolanta Kaufmann
Szpital Wojewódzki w Opolu
ul. Kośnego 53
45-372 Opole
tel. 604 307 068
e-mail: jolantakaufmann@vp.pl

Ann. Acad. Med. Siles. 2012, 66, 3, 20–26
Copyright © Śląski Uniwersytet Medyczny
w Katowicach
ISSN 0208-5607

WYNIKI

Największą grupę stanowią pacjenci z białaczką prekursorową z linii limfocyta B – 70,55%, zaś liczby przypadków z T-ALL (14,91%) i AML (14,55%) są do siebie zbliżone. Wśród B-ALL największy odsetek koekspresji dotyczył antygenów mieloidalnych: CD13+ (7,2% przypadków), CD33+ (w 7,7%), CD13+CD33+ (8,7%) oraz CD15+ (4,6%). Koekspresja antygenów z linii limfocyta T stanowi niewielki odsetek: CD7+ wykryto w 1,5% przypadków B-ALL, CD2+ w 1,5%, CD4+ w 0,5%, CD1a w 0,5% i CD5+ w 0,5%. W przypadku T-ALL koekspresje z innych linii komórkowych zanotowano w 26,8% przypadków, z czego większość dotyczyła

antygenów mieloidalnych: CD13, CD33, CD14, zaś obecność CD19 wykryto jedynie w 3 przypadkach. Antygen CD13+ zanotowano w 7,3% przypadków T-ALL, CD13+CD33+ w 9,8%, CD14+ w 2,4%. W AML stwierdzono obecność koekspresji: CD19 w 3 (7,5%) przypadkach, CD2 w 5 (12,5%) oraz CD4 w 2 (5,0%) przypadkach.

WNIOSKI

Obecność nietypowych immunofenotypów, w tym występowanie antygenów z innych linii komórkowych na komórkach blastycznych, stanowi swoisty dla pacjenta marker diagnostyczny pozwalający monitorować osiągnięcie remisji w trakcie leczenia, identyfikować białaczkowe nacieczenie PMR.

SŁOWA KLUCZOWE

ALL, AML, koekspresja, immunofenotyp

ABSTRACT

INTRODUCTION

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common form of leukemia and makes about 80% of all developmental age leukemias, 70–80% of which come from B lymphocyte line and only 15–20% from T lymphocyte line. Acute myeloid leukemia (AML) makes up about 20% of all leukemias detected among children. Cytometric analysis of leukemic cells immunophenotype allows a precise determination of each cell line status, degree of maturity and occurrence of co-expression phenomenon.

MATERIAL AND METHODS

275 cases of children with acute leukemia, diagnosed in the University Ward of Pediatrics and Hematology in Zabrze in the years 1995–2007. The material consisted of bone marrow or peripheral blood containing not less than 80% blast cells. The study applied the method of whole blood and marrow marking with the subsequent erythrocyte lysis. FITC, PerCP or PE fluorochrome-coupled antibodies were used and they were directed against CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD10, CD13, CD14, CD15, CD19, CD20, CD22, CD33, CD34, CD117, HLA-DR, MPO, TdT.

RESULTS

Patient group with acute leukemia includes 275 cases. The biggest group consists of patients with diagnosed acute precursor leukemia from B lymphocyte line – 70.55% while the number of cases with T-ALL (14.91%) and AML (14.55%) were similar. The most frequent coexpression belonged to the coexpression of determinants characteristic for the myeloid line: CD13, CD33, CD15, which were observed in 28.2% of cases among the studied ones. The coexpression of T lymphocyte line antigens was noticed only in individual cases and those were determinants CD1a, CD2, CD4, CD5, CD7 which occur in 4.5% of all cases of precursor leukemia from B lymphocyte line. In the group of leukemias from T lymphocyte line the coexpression from other cell lines was noticed in 26.8% of cases, most of which were about the expression of myeloid antigens: CD13, CD33, CD14. The coexpression of antigen CD19 was noticed only in 3 cases (7.3%). There was detected a small number of cases with children with AML where there were noticed antigens from other cell lines on leukemia cells. The coexpressions CD19, CD2 and CD4 were discovered.

CONCLUSIONS

A presence of atypical immunophenotypes, including the occurrence of antigens from other cell lines on blast cells, is a good diagnostic marker which enables to identify leukemic CSF infiltra-

tion and to monitor remissions during treatment, and additionally, to find out a possible disease recurrence in bone marrow and CSF.

KEY WORDS

ALL, AML, coexpression, immunophenotypic profile

WSTĘP

Ostra białaczka limfoblastyczna (*acute lymphoblastic leukemia* – ALL) jest najczęstszą postacią białaczki u dzieci i stanowi około 80% wszystkich białaczek wieku rozwojowego, z czego 70–80% pochodzi z linii limfocyta B, a jedynie 15–20% z linii limfocyta T. Ostra białaczka nielimfoblastyczna (*acute myeloid leukemia* – AML) stanowi około 20% wszystkich białaczek wykrywanych u dzieci [1]. Białaczka limfoblastyczna jest złośliwym nowotworem wywodzącym się z komórek prekursorowych linii limfoidalnej [2,3]. Jest to choroba niejednorodna, zaś ocena fenotypu antygenowego komórek białaczkowych pozwala określić ich pochodzenie oraz stopień dojrzałości, co ma znaczenie w doborze protokołu leczenia [4]. Immunofenotyp jest to charakterystyczny zbiór antygenów powierzchniowych, cytoplazmatycznych oraz jądrowych związanych z dojrzewaniem, różnicowaniem i funkcją badanej komórki oraz informujący, w jakim stopniu immunofenotyp komórek białaczkowych odpowiada immunofenotypowi prawidłowej komórki szpiku [5,6,7]. Antygeny wykrywano przy użyciu swoistych przeciwciał monoklonalnych. W tabeli I przedstawiono przykładowe markery immunologiczne wykorzystywane do diagnostyki ostrych białaczek, które pozwalają stwierdzić, jaka linia komórkowa uległa transformacji nowotworowej oraz czy obecne są antygeny nietypowe [8].

Podstawą określenia immunofenotypu jest założenie, że komórka białaczkowa zatrzymuje się na określonym etapie dojrzewania i różnicowania, a jej immunofenotyp odpowiada immunofenotypowi komórki z prawidłowej hematopoezy. Można jednak zaobserwować zjawisko występowania nietypowych immunofenotypów komórek białaczkowych, polegające na braku ekspresji jednej charakterystycznej determinanty antygenowej (immunofenotyp niepełny) bądź obecności determinant dodatkowych, charakterystycznych dla innych linii komórkowych (koekspresja), a także występowanie fenotypu asynchronicznego, polegające na równoczesnej ekspresji determinant z prekursorowego i dojrzałego etapu rozwoju danej komórki [2]. Występowanie nieprawidłowych, aberrantnych immunofenotypów bywa tłumaczone anormalną ekspresją genów, złośliwą transformacją pluripotencjalnych komórek progenitorowych, które zdolne są zarówno do limfoidalnego, jak i mieloidalnego różnicowania. Wykazanie koekspresji jest możliwe w przypadku zastosowania wieloparametrowej cytofluorometrii.

W grupie białaczek z koekspresją antygenów innych niż zdefiniowana linia komórkowa można wyróżnić:

- białaczki limfoblastyczne z ekspresją antygenu mieloidalnego – ALL+My lub limfoidalnego innego niż opisana linia ALL+Ly;
- białaczki mieloidalne z ekspresją antygenów limfoidalnych AML+Ly [54].

Celem pracy było określenie rodzaju i częstości występowania koekspresji w ostrych białaczkach u dzieci.

Tabela I. Podstawowe markery immunologiczne stosowane w immunofenotypowaniu białaczek

Table I. Basic immunological markers used in leukemia immunophenotyping

Typ białaczki	Markery immunologiczne
ALL z linii B	CD19, CD20, cyCD22, CD79a, CD10, cyIgM kappa, lambda, TdT, CD34, CD38, HLA-DR
ALL z linii T	cyCD3, CD3, CD2, CD7, CD5, CD1a, CD4, CD8, TdT, HLA-DR, TCRα/β, TCRγ/δ, CD34
AML	MPO, CD34, CD117, CD13, CD33, CD15CD64, CD14, CD71, CD41, Gly-A, HLA-DR, TdT

MATERIAŁ I METODY

Badaniem objęto 275 dzieci z wstępnym rozpoznaniem ostrej białaczki, diagnozowanych w Katedrze i Klinice Pediatrii, Hematologii i Onkologii Dziecięcej w Zabrzu w latach 1995–2007, w wieku 0,5–16 lat, w tym 119 dziewczynek i 156 chłopców.

Materiałem był szpik kostny lub krew obwodowa zawierające nie mniej niż 80% komórek blastycznych (zliczone w preparacie barwionym metodą May-Grunwalda-Giemsy). Analizę wykonano przed upływem 3 godzin od momentu pobrania materiału badawczego.

W badaniach zastosowano metodę znakowania pełnej krwi lub szpiku z lizą erytrocytów. Badany materiał inkubowano w temperaturze pokojowej, bez dostępu światła przez 30 min z określonymi przeciwciałami monoklonalnymi sprzężonymi z fluorochromami: izotiocyanianem fluoresceiny (FITC), fikoerytryną (PE) oraz peridininochlorofilem (PerCP). Antygeny cytoplazmatyczne: MPO i TdT, barwiono po uprzednim wybarwieniu determinant powierzchniowych, utrwaleniu komórek i permabilizacji błony komórkowej. W barwieniu na obecność MPO do permabilizacji użyto zestawu odczynników Intrastain firmy Dako, zaś dla TdT płynu lizującego firmy Becton Dickinson.

Używano zestawów przeciwciał dla następujących determinant powierzchniowych: CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD10, CD13, CD14, CD15, CD19, CD20, CD22, CD33, CD34, CD38, CD45, CD117, HLA-DR, oraz cytoplazmatycznych: MPO, TdT (Becton Dickinson oraz Dako). Jako kontroli tła używano zawiesiny komórek z mieszaniną mysich immunoglobulin odpowiedniej klasy IgG1(FITC), IgG2(PE), IgG2a(PerCP). Do kalibracji cytometru stosowano kalibrator CaliBRITE™3 (Becton Dickinson).

Po zakończeniu inkubacji erytrocyty lizowano przy użyciu FACS Lysing Solution (Becton Dickinson). Po dwukrotnym przepłukaniu w buforze PBS, znakowane komórki wprowadzono do cytometru przepływowego FACScan, rejestrując każdorazowo nie mniej niż 10 000 komórek. Parametry fizyczne komórek oraz obecność i intensywność fluorescencji analizowano za pomocą programu Cell Quest (Becton Dickinson). Analiza obejmowała ocenę populacji komórkowych pod względem wielkości (parametr FSC), struktury powierzchni

(parametr SSC), obecności determinanty CD45 i selekcji populacji zawierających komórki białaczkowe.

Za występowanie danej determinanty przyjęto wartość > 20% komórek badanej populacji. Ponadto w analizie uwzględniono występowanie na powierzchni komórek determinant z innej linii komórkowej – koekspresja.

WYNIKI

Grupa pacjentów z ostrymi białaczkami obejmuje 275 przypadków (w okresie 06.01.1995–19.03.2007). Największą grupę, aż 70,55%, stanowi tu białaczka prekursorowa z linii limfocyta B. Natomiast liczby przypadków z T-ALL (14,91%) i AML (14,55%) są do siebie zbliżone. Liczbę zachorowań oraz odsetek poszczególnych typów białaczek przedstawia tabela II.

Tabela II. Liczba przypadków i odsetek poszczególnych typów białaczek włączonych do analizy

Table II. Number of casus and the percentage of particular leukemia types included in the analysis

Typ białaczki	Liczba przypadków n	%
Prekursorowa B-ALL	194	70,55
T-ALL	41	14,91
AML	40	14,55

BIAŁACZKA PREKURSOROWA B-ALL

Najczęstszą koekspresję stanowiła ekspresja determinant charakterystycznych dla linii mieloidalnej: CD13, CD33, CD15, które obserwowano w 28,7% przypadków spośród badanych. Koekspresję antygenów z linii limfocyta T zanotowano tylko w pojedynczych przypadkach, były to determinanty: CD1a, CD2, CD4, CD5, CD7, występujące w 4,5% wszystkich przypadków prekursorowej białaczki z linii limfocyta B. Rodzaj koekspresji, liczbę przypadków oraz odsetek ALL z linii limfocyta B przedstawiono w tabeli III.

Tabela III. Rodzaje koekspresji, liczba i odsetek przypadków ALL z linii limfocyta B
Table III. Types of coexpression, number and percentage of ALL cases from B lymphocyte line

B-ALL	Antygen	Liczba przypadków n	%	Ogółem %
Z koekspresją antygenów z linii limfocyta T	CD7	3	1,5	4,5
	CD2	3	1,5	
	CD4	1	0,5	
	CD1a	1	0,5	
	CD5	1	0,5	
Z koekspresją antygenów mieloidalnych	CD13	14	7,2	28,2
	CD33	15	7,7	
	CD15	9	4,6	
	CD13/CD33	17	8,7	

BIAŁACZKI T-ALL

W T-ALL koekspresje z innych linii komórkowych zanotowano w 26,8% przypadków, z czego większość dotyczyła antygenów mieloidalnych: CD13, CD33 oraz

CD14. Koekspresję antygeny CD19 odnotowano jedynie w 3 przypadkach. Rodzaj koekspresji, liczbę przypadków oraz odsetek ALL z linii limfocyta T przedstawiono w tabeli IV.

Tabela IV. Rodzaje koekspresji, liczba przypadków i ich odsetek dla ALL z linii limfocyta T
Table IV. Types of coexpression, number and percentage of ALL cases from T lymphocyte line

T-ALL	Antygen	Liczba przypadków n	%
Z koekspresją antygenów z linii limfocyta B	CD19	3	7,3
	CD13	7	17,0
Z koekspresją antygenów mieloidalnych	CD33	4	9,7
	CD14	1	2,4

OSTRA BIAŁACZKA NIELIMFOBLASTYCZNA

W AML stwierdzono niewielką liczbę przypadków, gdzie na komórkach białaczkowych stwierdzono koekspresję antygenów z innych

linii komórkowych. Wykryto koekspresję CD19, CD2 i CD 4. Szczegółowe dane przedstawiono w tabeli V.

Tabela V. Rodzaje koekspresji, liczba przypadków i ich odsetek dla AML
Table V. Types of coexpression, number and percentage of AML

AML	Antygen	Liczba przypadków n	%	Ogółem %
Z koekspresją antygenów z linii limfocyta B	CD19	3	7,5	7,5
Z koekspresją antygenów z linii limfocyta T	CD2	5	12,0	17,0
	CD4	2	5,0	

DYSKUSJA

Immunofenotypizacja z zastosowaniem odpowiedniego panelu przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko antygenom leukocytów jest niezbędnym narzędziem w badaniu szpiku i krwi obwodowej, gdzie w krótkim czasie możliwe jest określenie typu komórek i stadium, na którym uległy one transformacji nowotworowej. Ujawnia się także fenotypy nietypowe, jak: brak ekspresji jednej z charakterystycznych determinant (fenotyp niepełny), obecność antygenów innych linii komórkowych, np. CD19 na komórkach białaczki AML, CD33 na blastach w common ALL czy CD13 na blastach ALL-T (koekspresja) oraz asynchronicznej ekspresji determinant [9,10].

Komórki białaczkowe, których immunofenotyp odbiegał od ich odpowiedników z prawidłowej ontogenezy, były coraz częściej obserwowane w miarę rozwoju cytometrii przepływowej. Nieobecność charakterystycznej determinanty lub występowanie determinant dodatkowych, cechujących inne linie sugerowały zaburzenia w genomie komórek i określono je immunofenotypami nietypowymi [11]. Tę grupę białaczek można podzielić na białaczki limfoblastyczne z ekspresją antygenu mieloidalnego (ALL+My), białaczki limfoblastyczne z ekspresją antygeny innego niż opisana linia (ALL+Ly) oraz ostre białaczki szpikowe z ekspresją antygenów limfoidalnych (AML+Ly) [12]. Koekspresja antygenów z innych linii komórkowych jest spotykana u 15–50% dorosłych oraz 5–35% dzieci z ALL [12,13].

Przedmiotem badań było określenie częstości występowania koekspresji na komórkach białaczkowych w grupie dzieci z ALL i AML. U 70,7% dzieci w analizowanej populacji postawiono diagnozę ALL z prekursorów limfocyta B, 15% to ALL z linii limfocyta T, pozostałe 14,5% to AML. Wyniki te są zbieżne z wartościami podawanymi w piśmiennictwie [14], nieco mniejszy (53%) odsetek ALL z limfocyta B wykazano w badaniach retrospektywnych przeprowadzonych przez Wąsik i wsp. [10]. Podawana częstość występowania ALL+My mieści się w szerokim zakresie 5–50% [11]. Pituch-Noworolska [1] odnotowała 25,1% przypadków, zbliżony odsetek podaje Tong (26,6%)

[15], Ůnal podaje 13,8% [14], natomiast w grupie dzieci objętych niniejszym badaniem było to 28,9%. Sugerowano brak znaczenia prognostycznego związanego z obecnością antygenów mieloidalnych na komórkach nowotworowych w ALL, jednak jest to powiązane z określonymi genetycznymi zaburzeniami.

Dodatkową ekspresję antygenów limfoidalnych AML stwierdza się w 20–30% przypadków, w przeprowadzonej analizie koekspresję taką wykazano w 24,5% przypadków. Trzeba pamiętać o tym, że AML u dzieci stanowi 15–20% wszystkich ostrych białaczek u dzieci, w naszych badaniach ten odsetek wynosił 14,55% [1,14].

Obecność koekspresji antygenów z innych linii komórkowych nie jest uważana obecnie za zjawisko istotne klinicznie [16], jednak identyfikacja antygenów pochodzących z innych linii komórkowych na komórkach blastycznych stanowi cenną informację dla klinicysty w ocenie remisji i poszukiwania choroby resztkowej (MRD – *minimal residual disease*). Oszacowanie MRD po chemioterapii oraz we wczesnym okresie regeneracji szpiku po przeszczepie jest trudne. Zastosowanie znalazła tu strategia wykorzystująca ilościowe różnice w ekspresji antygenów liniowych na blastach białaczkowych. Analiza fenotypu i ekspresji poszczególnych determinant komórek białaczkowych w chwili rozpoznania, indywidualnie dla każdego pacjenta, pomaga w monitorowaniu MRD poprzez analizę porównawczą [17].

WNIOSKI

1. W ostrej białaczce limfoblastycznej z linii limfocyta B oraz linii limfocyta T najczęstszą formę nietypowego immunofenotypu stanowiła koekspresja antygenów mieloidalnych CD13, CD15, CD33.
2. W białaczce nielimfoblastycznej odnotowano więcej koekspresji antygenów z linii limfocyta T w porównaniu z antygenami z linii limfocyta B.
3. Obecność nietypowych immunofenotypów stanowi swoisty dla pacjenta marker diagnostyczny, pozwalający monitorować osiągnięcie remisji w trakcie leczenia oraz identyfikować białaczkowe nacieczenie płynu mózgowo-rdzeniowego.

PIŚMIENNICTWO

1. Pituch-Noworolska A. Właściwości biologicznej i wrażliwość na leczenie indukcyjne komórek rozrostowych o nietypowym immunofenotypie w ostrych białaczkach u dzieci. *Folia Med. Cracov.* 2001; 42: 35–81.
2. Pui Ch., Evans W.E. Acute lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 1998; 339: 605–615.
3. Seferyńska I., Orłowska E., Ejduk A. i wsp. Epidemiologia zachorowań na ostre białaczki u ludzi dorosłych w Polsce w latach 2004–2006. *Post. Nauk. Med.* 2007; 20: 268–275.
4. Krasowska I., Urban M., Żak J., Iwaszkiewicz-Pawłowska A., Wysocka J. Klasyfikacja ostrych białaczek u dzieci w oparciu o ocenę immunofenotypową. *Nowa Pediatr.* 2000; 2: 19.
5. Żydowicz G., Mazur B. Immunofenotyp komórek w prawidłowej hematopojezie. *Post. Biol. Komórki* 2008; 35, supl. 24: 35–44.
6. Zola H., Swart B., Nicholson I. et al. CD molecules 2005: human cell differentiation molecules. *Blood* 2005; 106, 9: 3123–3126.
7. Kussick S., Fromm J., Rossini A. et al. Four-color flow cytometry shows strong concordance with bone marrow morphology and cytogenetics in the evaluation for myelodysplasia. *Am. J. Clin. Pathol.* 2005; 124: 170–181.
8. Balana-Nowak A., Zdziłowska E. Cytometria przepływowa w diagnostyce immunofenotypowej ostrych białaczek. *Post. Biol. Komórki* 2008; 35, supl. 24: 65–102.
9. Pituch-Noworolska A., Kowalczyk J. The frequency and characteristics of aberrant immunophenotypes in acute lymphoblastic leukaemia (ALL) in children – a multicenter study. *Acta Hematol. Pol.* 2010; 41: 579–589.
10. Wąsik M., Błocka M., Górska E., Potapińska O., Demkow U. Algorytm fenotypowania blastów w ostrych białaczkach dziecięcych (streszczenie). *Diagn. Lab.* 2007; 43(3): 505.
11. Podstawy hematologii. Red. A. Dmoszyńska, T. Robak. Wydawnictwo Czelej. Lublin 2003.
12. Jemal A., Siegel R., Ward E., Murray T., Xu J., Thun M.J. Statystyka nowotworów. *Onkol. Dypl.* 2007; 4, 2: 30–55.
13. Pui Ch., Behm F., Singh B. et al. Myeloid-associated antigen expression lacks Prognostic value in childhood Acute Lymphoblastic Leukemia treated with intensive multiagent chemotherapy. *Blood* 1990; 75(1): 198–202.
14. Ünal S., Cetin M., Tuncer M., Gümrük F., Yetgin. The prognostic impact of myeloid antigen expression in pediatric acute lymphoblastic leukemia patients. *Turk. J. Pediatr.* 2008; 50: 533–536.
15. Tong H., Zhang J., LU C., Liu Z., Zheng Y. Immunophenotypic, cytogenetic and clinical features of 113 acute lymphoblastic leukemia patients in China. *Ann. Acad. Med. Singapore* 2010; 39: 49–53.
16. Szczepański T., Orfão A., van der Velden V., San Miguel J., van Dongen J. Minimal residual disease in leukaemia patients. *Lancet* 2001; 2: 409–417.
17. Dworzak M., Gaipa G., Ratei R. et al. Standardization of flow cytometric minimal residual disease evaluation in acute lymphoblastic leukemia: multicentric assessment is feasible. *Cytometry B Clin. Cytom.* 2008; 74, 6: 331–340.