

# ĐÁNH GIÁ CÒN BỆNH TỐI THIỂU BẰNG FLOW CYTOMETRY TRÊN BỆNH NHI BẠCH CẦU CẤP THỂ B LYMPHO TẠI BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG

Trần Thị Hồng Hà, Đặng Thị Hà, Lương Thị Nghiêm,  
Nguyễn Thị Duyên, Võ Thanh Hương  
Khoa Xét nghiệm Huyết học - Bệnh viện Nhi TW

## TÓM TẮT

Mức độ còn bệnh tối thiểu (MRD: Minimal Residual Disease) là một yếu tố tiên lượng quan trọng nhất trong quá trình điều trị cho bệnh nhi bạch cầu cấp (BCC) thể lympho. Sử dụng Flow Cytometry trong đánh giá MRD hiện nay được chấp nhận rộng rãi trên thế giới vì có độ nhạy cao nhưng còn rất mới mẻ ở Việt Nam. **Mục tiêu:** 1/Tìm những kết hợp dấu ấn miễn dịch liên quan đến BCC để đánh giá còn bệnh tối thiểu cho bệnh nhi BCC thể B lympho. 2/Bước đầu đánh giá còn bệnh tối thiểu trên những kết hợp đã tìm thấy. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** 104 bệnh nhi được chẩn đoán BCC thể B lympho dựa vào hình thái và kiểu hình miễn dịch, trong đó có 87 bệnh nhi cho mục tiêu 1 và 17 bệnh nhi cho mục tiêu 2. Phân tích kiểu hình miễn dịch trên máy Facs Calibur 3 màu. **Kết quả và bàn luận:** 1/ Những kết hợp dấu ấn miễn dịch liên quan đến BCC có thể sử dụng đánh giá MRD trên Flow Cytometry 3 màu: CD20/CD10/CD19; CD34/CD45/CD19; CD34/CD38/CD19; CD34/CD123/CD19; CD34/CD13 hoặc CD33/CD19 cho những trường hợp có CD13+ và / CD33+ lúc chẩn đoán. 2/ Có sự khác biệt rõ rệt giữa đánh giá hình thái học tủy xương và MRD trên Flow Cytometry: Các bệnh nhi lui bệnh hoàn toàn về hình thái học ngày điều trị cảm ứng thứ 14 đều có MRD.0,01%. Ngày kết thúc điều trị cảm ứng chỉ 33,3% bệnh nhi đạt lui bệnh hoàn toàn với MRD<0,01% trong khi về hình thái học đạt lui bệnh hoàn toàn 100%. Kết quả trên cho thấy đánh giá lui bệnh hoàn toàn không thể chỉ dựa vào hình thái học đơn thuần. Flow Cytometry là một phương pháp tốt để đánh giá MRD.

**Từ khóa:** Bạch cầu cấp thể B lympho, Flow Cytometry, Còn bệnh tối thiểu (Minimal Residual Disease: MRD), Kết hợp miễn dịch liên quan bạch cầu cấp.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bạch cầu cấp (BCC) thể B lympho ở trẻ em chiếm 70-80% bạch cầu cấp nói chung và có tiên lượng tốt hơn cả. Theo dõi còn bệnh tối thiểu (Minimal residual disease: MRD) là một yếu tố tiên lượng quan trọng nhất trong quá trình điều trị giúp đánh giá kết quả, dự báo tái phát sớm để có thể phân bậc điều trị sau giai đoạn tấn công [4;5;8]. Có thể xác định MRD bằng phương pháp sinh học

phân tử và tế bào dòng chảy (Flow Cytometry). Gần đây, theo dõi MRD bằng Flow Cytometry đã phát triển và được chấp nhận rộng rãi trên thế giới do có độ nhạy cao và thời gian phân tích nhanh, đặc biệt với BCC thể B lympho [4;7; 9]. Phương pháp này đòi hỏi tìm ra những dấu ấn miễn dịch có những đặc điểm khác biệt giữa tế bào bình thường và tế bào ác tính, kết hợp chúng với nhau để cùng một lúc phân tích nhằm đánh giá được số lượng tế bào ác tính ít ỏi còn lại trong quần thể

tế bào bình thường đang bắt đầu hồi phục. Panel kháng thể không giống nhau ở các trung tâm, tùy thuộc vào cấp độ máy và kinh nghiệm ở từng nơi. Ở Việt Nam, đây là một lĩnh vực khá mới hầu như chưa được áp dụng. Bệnh viện Nhi Trung ương đã có kinh nghiệm sử dụng Flow Cytometry trong xác định kiểu hình miễn dịch cho bệnh nhân bạch cầu cấp lúc chẩn đoán và để nghiên cứu đánh giá còn bệnh tối thiểu, trước hết cho bệnh nhân bạch cầu cấp thể B lympho, chúng tôi thực hiện đề tài này nhằm 2 mục tiêu :

- *Tìm những kết hợp dấu ấn miễn dịch liên quan đến BCC để đánh giá còn bệnh tối thiểu cho bệnh nhi bạch cầu cấp thể B lympho.*

- *Bước đầu đánh giá còn bệnh tối thiểu trên những kết hợp đã tìm thấy.*

## 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

**2.1. Đối tượng nghiên cứu** là tất cả những bệnh nhân được chẩn đoán bạch cầu cấp thể B lympho dựa và hình thái, hoá học tế bào theo tiêu chuẩn của FAB và kiểu hình miễn dịch theo tiêu chuẩn WHO [1;2], từ tháng 10/2011 đến thời điểm hiện tại (7/2012) bao gồm 87 bệnh nhi cho mục tiêu 1 và 17 bệnh nhi cho mục tiêu 2.

**2.2. Phương pháp nghiên cứu:** Mô tả, cắt ngang

**2.3. Phương tiện - Kỹ thuật - Tiêu chuẩn đánh giá - Nguyên tắc phân tích**

**2.3.1. Phương tiện:** Sử dụng máy Facs Calibur 3 màu với 1 đèn laser 488nm

- Panel kháng thể xác định kiểu hình miễn dịch (KHMD) khi chẩn đoán:

+ Các kháng thể với huỳnh quang màu FITC (fluorescein isothiocyanate): cytoplasmic CD3 (cCD3) (CD: Cluster of differentiation), CD5, CD7, CD20, cytoplasmic CD22, CD34, CD45, TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase), Kappa

+ Các kháng thể với huỳnh quang màu PE (phycoerythrin): CD3, cCD3, CD10, CD13, CD14, CD33, CD34, CD38, cCD79a, CD117, CD123, MPO (Myeloperoxidase), Lamda.

+ Kháng thể với màu PerCP 5.5 (peridinin

chlorophyll protein 5.5 (PerCP5.5): CD19

### 2.3.2. Kỹ thuật

- Mẫu sử dụng: Dịch tủy xương sau khi lấy được chống đông bằng EDTA, xử lý và ủ kháng thể trong vòng 24 giờ.

- Khi chẩn đoán: Mẫu tủy lấy khi bệnh nhân đến lần đầu tiên

- Phân tích MRD: Mẫu tủy lấy vào các thời điểm ngày 7, ngày 14, ngày 28 điều trị cảm ứng (induction).

### 2.3.3. Tiêu chuẩn

\* Tiêu chuẩn đạt lui bệnh hoàn toàn theo hình thái học  $\leq 5\%$  BCN trong tủy xương [8].

\* Những kháng thể được lựa chọn đánh giá MRD được gọi là kiểu hình miễn dịch liên quan bạch cầu cấp (Leukemia associated immunophenotype: LAIP) khi có "khoảng trống" (Empty space) so với mẫu tủy xương bình thường khi có một trong những biểu hiện sau:

- Biểu hiện không đồng bộ (Asynchronous Antigen Expression) giữa các dấu ấn giai đoạn sớm và giai đoạn trưởng thành: CD10+/CD20+, CD34-/CD45-; Cùng một lúc có cả dấu ấn CD34+/CD123+

- Biểu hiện quá mức hoặc dưới mức bình thường: dựa vào vị trí quần thể tế bào dương tính

- Biểu hiện dị dòng: Có dấu ấn dòng tủy (CD13 và /CD33); Có dấu ấn dòng T lympho CD5 và /CD7

- Không có biểu hiện

\* Đánh giá MRD: Chia số lượng BCN cho tổng số tế bào đếm được, tính các mức  $< 0,01\%$  được coi MRD âm tính nghĩa là đạt lui bệnh; MRD từ  $\geq 0,01\%$  là dương tính nghĩa là chưa đạt lui bệnh.

### 2.3.4. Nguyên tắc phân tích trên Flow Cytometry

- Sử dụng phần mềm CellQuest Pro (Becton Dickinson) để đếm tế bào, phân tích bằng chương trình Paint- A- Gate 3.0.2 (Becton Dickinson).

- Thời điểm đánh giá MRD, mỗi bệnh nhân đều làm kèm theo dấu ấn dòng hồng cầu glycoprotein A để khảo sát và loại những hồng cầu còn sót lại khỏi quần thể tế bào phân tích.

**2.4. Bệnh nhân được điều trị theo phác đồ Mỹ CCG 1961 (cho nhóm nguy cơ cao) và 1991 (cho nhóm nguy cơ chuẩn)**

## 3. KẾT QUẢ

**Bảng 1.** Biểu hiện CD19 khi chẩn đoán

	n	%
CD19-	4	4,6
CD19+	83	95,4
Tổng cộng	87	100

*Nhận xét:* Hầu hết các trường hợp có CD19+

**Bảng 2.** Các LAIP được lựa chọn đánh giá MRD:

Các LAIPs	n	%
<b>Biểu hiện quá mức</b>		
CD10	50	60,24
CD34	19	22,89
CD19	3	3,61
<b>Biểu hiện dưới mức</b>		
CD10	8	9,64
CD38	48	57,83
CD45	56	67,47
<b>Không biểu hiện</b>		
CD45	24	28,91
<b>Biểu hiện dị dòng</b>		
<b>1. Dòng tủy:</b>		
CD13	16	19,28
CD33	14	16,86
<b>2. Dòng T lympho</b>		
CD5	1	1,20
CD7	1	1,20
<b>Biểu hiện không đồng bộ</b>		
CD 10 / CD20	15	18,07
CD34 / CD45	2	2,41
CD34/CD123	44	53,01

*Nhận xét:* Có sự biểu hiện khác biệt rõ giữa tế bào BCC và tế bào bình thường đối với CD45 (67,47%+28,91), CD10 (60,24%+9,64%), CD38 57,83%, CD34/CD123 (53,01%).

**Bảng 3.** Các kết hợp LAIP lựa chọn để đánh giá MRD

	FITC	PE	PerCP5.5	% sử dụng
1	CD 20	CD10	CD19	69,88 (60,24+9,64)
2	CD34	CD45	CD19	22,89
3	CD34	CD38	CD19	57,83
4	CD34	CD123	CD19	53,01
5	CD34	CD13	CD19	19,28
6	CD34	CD33	CD19	16,86

*Nhận xét:* Từ các LAIP ở bảng 2 kết hợp lại thành từng cặp để phân tích cho thấy tỷ lệ CD20/CD10/CD19 là cao nhất, sau đó CD34/CD38/CD19. CD34/CD123/CD19; Thấp hơn là CD34/CD45/CD19. Những cặp kết hợp có dấu ấn dị dòng chiếm tỷ lệ thấp nhất.

**Bảng 4.** Số lượng các cặp kết hợp LAIP xác định cho từng bệnh nhân

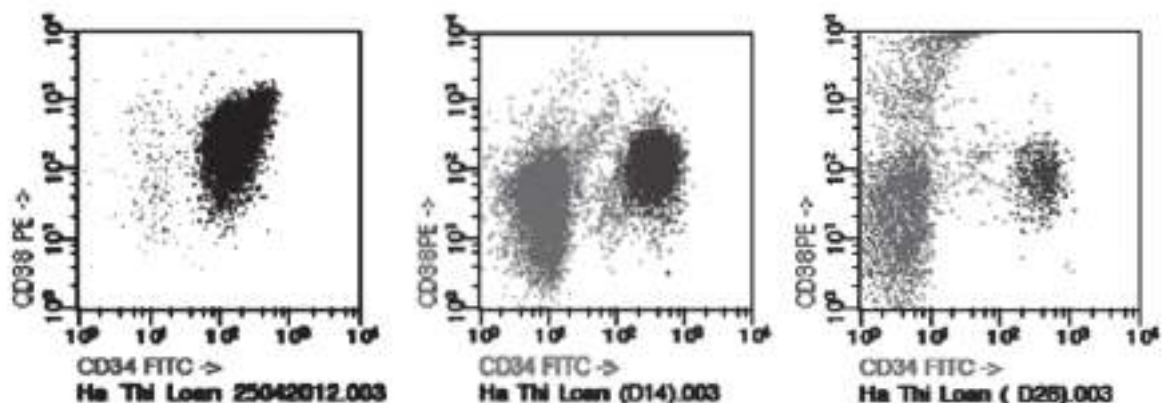
Số lượng cặp LAIP / bệnh nhân	n	%
6	3	3,62
5	7	8,43
4	32	38,55
3	20	24,10
2	15	18,07
1	6	7,23
Tổng cộng	83	100

*Nhận xét:* Tại thời điểm chẩn đoán, lựa chọn các kết hợp LAIPs ở bảng 3 trên từng bệnh nhi, Đa số bệnh nhi có 4 cặp LAIPs để đánh giá MRD, tiếp theo là 3 và 2 cặp. Bệnh nhi có đủ 6 cặp hoặc chỉ có 1 cặp chiếm tỷ lệ thấp nhất.

**Bảng 4.** Kết quả đánh giá MRD trên 17 bệnh nhân

	% BCN tùy đồ lúc chẩn đoán	Ngày 7		Ngày 14		Ngày 28				
		% BCN	MRD	% BCN	MRD	% BCN	MRD			
							<0,01	<0,1	>0,1	>1
1	55			0	1,4	0			0,2	
2	70					0	0,001			
3	68			0	0,61	0	0,002			
4	86			0	0,12	0	0,003			
5	93			5	59,3	0				1,95
6	51			0	0,24	0	0,003			
7	90			0	0,60	0			0,45	
8	94					0		0,03		
9	91			0	0,25	0		0,05		
10	72					0		0,02		
11	80	0	0,87	0	0,11	0		0,02		
12	25	0	0,36			0			0,11	
13	76	13	11	0	0,12	0		0,07		
14	93	17	42,8	0	3,12	0			0,49	
15	78	16	13	0	0,04	0	0,009			
16	76			0	2,92					
17	90			0	0,15					

*Nhận xét.* Vào thời điểm ngày 7 điều trị tấn công chỉ có 7 bệnh nhi được lấy tủy phân tích MRD cho thấy tỷ lệ MRD rất cao; Ngày 14, 100% bệnh nhi đạt lui bệnh về hình thái học nhưng tỷ lệ MRD cao; Ngày 28, chỉ có 1/3 bệnh nhi đạt lui bệnh theo MRD, 1/3 bệnh nhi MRD cao >0,1% trong khi về hình thái học đã đạt lui bệnh hoàn toàn.



Hình 1. Biểu hiện CD 38 lúc chẩn đoán, ngày 14, ngày 28

#### 4. BÀN LUẬN

Trong số 87 trường hợp nghiên cứu, chúng tôi thấy có 4 trường hợp CD19 âm tính, đây là một dấu ấn quan trọng và bền vững nên không những là chỉ tiêu để chẩn đoán BCC thể B lympho mà còn sử dụng để đánh giá MRD trong quá trình điều trị. Chen.YH. và cộng sự thấy tỷ lệ CD19+ chiếm 98,9% trong số 93 bệnh nhân BCC thể B lympho, ngoài ra có một số thông báo về những trường hợp CD19- ở bệnh nhi có calci huyết cao và tổn thương xương hoặc có những hình thái tế bào đặc biệt [3]. Chúng tôi không đánh giá MRD những trường hợp CD19- vì khi phân tích MRD CD19+ là tiêu chuẩn đầu tiên để xác định các tế bào B lympho. Như vậy số trường hợp có thể đánh giá MRD của chúng tôi chiếm 95,4%, tương tự như các tác giả khác [4;9;11;12]. Xác định kiểu hình miễn dịch tế bào ác tính lúc chẩn đoán dựa vào các dấu ấn trên bề mặt tế bào hoặc nội bào giống như các tế bào B bình thường. Ngay tại thời điểm này lựa chọn những dấu ấn có sự khác biệt (khoảng trống) giữa tế bào bình thường và tế bào BCC để theo dõi MRD. Những kiểu hình có “khoảng trống” này được gọi là kiểu hình liên quan bạch cầu cấp (LAIP) và nhờ kết hợp nhiều LAIP trong cùng một lần phân tích mà có thể phân biệt được các tế bào ác tính còn lại ít ỏi với quần thể tế bào bình thường đang ngày càng hồi phục [4;6;7;9;12]. Những LAIP mà chúng tôi nhận thấy là CD10, CD34, CD45, CD38. CD45 có sự khác biệt rất rõ giữa tế bào bình thường và

tế bào ác tính. Các tế bào lympho bình thường dương tính khá mạnh với CD45, trong nghiên cứu này có tới 67,47% có CD45+ dưới mức bình thường (từ nhẹ đến trung bình) và 28,91% âm tính hoàn toàn với CD45. Điều này cũng phù hợp với các nhận xét khác [5;8]. Hơn ½ trường hợp (60,24%) có CD10 biểu hiện quá mức bình thường và 9,64% dưới mức bình thường. Đa số các tác giả đều nhận thấy biểu hiện bất thường của CD10 là khá cao [9;12]. Tỷ lệ CD10+ ở hầu hết các bệnh nhi BCC thể B lympho ở giai đoạn chẩn đoán bệnh nên sự khác biệt này là một dấu hiệu tốt để có thể sử dụng CD10 trong đánh giá MRD. CD38 biểu hiện dưới mức bình thường đã được nhiều tác giả ghi nhận và đây cũng là một dấu ấn tốt trong theo dõi MRD vì tính bền vững của nó trong quá trình điều trị hóa chất [6]. Chúng tôi thấy CD38 có “khoảng trống” chiếm 57,83%. Ngoài ra có những dấu ấn dòng tủy như CD13 và CD33 chiếm 36,14%. Tỷ lệ này cũng khác nhau ở các nghiên cứu [4;5;7;9;12]. Đây cũng là những LAIP có thể sử dụng theo dõi MRD. Chúng tôi gặp 1 trường hợp có cả dấu ấn dòng T lympho như CD5, CD7 cũng giống như nhận xét của các tác giả khác gặp <5% [12]. Tuy nhiên nhiều tác giả cũng ít sử dụng dấu ấn này theo dõi MRD vì sự không ổn định của nó sau điều trị hóa chất. Ngoài ra chúng tôi còn gặp những biểu hiện không đồng bộ giữa CD10/ CD20 (18,07) CD34/CD45 (2,41%). N.Braham Jmili và cộng sự thấy không đồng bộ

giữa CD10/CD20 là 5,3% còn Mige Janclunione và cộng sự thấy CD10+/CD20+ là 25% và CD34-/CD45- là 15% [7;9]. Gần đây có nhiều tác giả chú ý đến CD123 và nhận thấy có biểu hiện khác biệt rõ rệt giữa tế bào bình thường và tế bào BCC, đó là: những tế bào bình thường có biểu hiện trái ngược giữa CD34 và CD123, những tế bào B chưa trưởng thành có CD34+ lại không có biểu hiện CD123 ngược lại những tế bào B trưởng thành có CD34- và CD123+, trong khi đó những tế bào ác tính cùng một lúc có CD34+/CD123+ và biểu hiện này duy trì bền vững qua điều trị hóa chất [10]. Chúng tôi nhận thấy 53,01% trường hợp có quần thể tế bào BCC có CD34+/CD123+ . Như vậy đây cũng là một dấu ấn tốt để đánh giá MRD. Để đánh giá MRD không thể chỉ dựa vào một dấu ấn đơn thuần mà phải kết hợp nhiều LAIP với nhau thành từng cặp mới có thể xác định chính xác những tế bào BCC còn lại Trong mỗi một cặp thường phải có từ một LAIP trở lên. Chúng tôi sử dụng CD19 trong tất cả các trường hợp để có thể tách riêng các tế bào B lympho. Lựa chọn kết hợp CD20/CD10/CD19 thành 1 cặp để có thể tận dụng "khoảng trống" của CD10, ngoài ra kết hợp thêm sự không đồng bộ giữa CD10/CD20 trong một số trường hợp. Cặp này chúng tôi tìm thấy có thể tìm thấy trong 69,88% trường hợp. Nhờ vào đặc điểm âm tính hoặc dương tính yếu với CD45 của tế bào BCC và "khoảng trống" của CD34 có thể kết hợp CD34/CD45/CD19 để đánh giá MRD, tuy nhiên tỷ lệ CD34 có "khoảng trống" chỉ chiếm 22,89% Trong nghiên cứu này, kết hợp CD34/CD38/CD19 tìm thấy trong 57,83% trường hợp. Những kết hợp LAIP trên cũng được hầu hết các tác giả sử dụng. Với mục đích chuẩn hóa kỹ thuật đánh giá MRD bằng Flow Cytometry, một nhóm các nhà khoa học hàng đầu châu Âu đã tổng hợp nghiên cứu ở một số trung tâm lớn như Thụy Điển, Bồ Đào Nha, Tây Ban Nha, Ý... và cho thấy tần suất tìm thấy các kết hợp LAIP: CD10/CD20/CD19 là 64%, CD34/CD45/CD19 là 22%, CD34/CD38/CD19 là 56% [12]. Như vậy tỷ lệ của chúng tôi cũng tương đương với những nghiên cứu đó. Kết hợp CD34/CD123/CD19 là một kết hợp tốt để đánh giá MRD

và chúng tôi tìm thấy trong 53,01% trường hợp. CD123 hiện được sử dụng rộng rãi trong đánh giá MRD cho BCC thể B lympho tại các nước Bắc Âu. Ngoài ra còn có thể sử dụng những kết hợp trong đó có dấu ấn khác dòng như CD34/CD13/CD19 và CD34/CD33/CD19, hai kết hợp này tìm thấy 19,28% và 16,86%. Các kết hợp LAIP để đánh giá MRD được xác định khi chẩn đoán bệnh. Trên một bệnh nhi có thể chỉ thấy 1 hoặc nhiều hơn các cặp kết hợp như trong bảng 3. Bảng 4 cho thấy tỷ lệ tìm thấy 4 cặp LAIP trên một bệnh nhân là cao nhất 38,55% sau đó đến 3 và 2 cặp, 1 và 6 cặp LAIP tìm thấy trên một bệnh nhân chiếm tỷ lệ thấp nhất. Một điều chắc chắn rằng phân tích MRD trên nhiều cặp kết hợp thì sự đánh giá MRD càng chính xác hơn. Nhiều trường hợp không đủ thông tin đánh giá MRD trên Flow cytometry cần được kết hợp kỹ thuật PCR [4;8]. Hiện nay hầu hết các trung tâm đều sử dụng máy từ 4 màu trở lên với 2 đèn laser và vì vậy có thể kết hợp nhiều hơn 3 LAIP trong 1 cặp khiến cho việc phân tích dễ dàng và chính xác hơn.

Sau khi tìm được các LAIP, tối đa hóa kỹ thuật cũng như điều chỉnh phù hợp các thông số của máy, chúng tôi tiến hành thực hiện đánh giá MRD với các cặp LAIP tìm được ở giai đoạn chẩn đoán. Một số trường hợp được đánh giá ngày thứ 7 điều trị cảm ứng cho thấy tất cả đều còn nhiều bạch cầu non (BCN) trong tủy. Có 2 trường hợp không thấy BCN trên tủy đồ nhưng MRD vẫn khá cao : 0,87 và 0,36. Một trường hợp MRD cao hơn hẳn tỷ lệ BCN đếm được trên kính hiển vi. Điều này là tất nhiên vì trên kính hiển không thể quan sát trên một quần thể hàng trăm nghìn tế bào bằng Flow Cytometry, cũng như quan sát về mặt hình thái không thể chính xác như sử dụng các kháng thể đặc hiệu. Tuy nhiên có 2 trường hợp MRD nhỏ hơn % BCN. Nhiều tác giả thường sử dụng mẫu phân tích ngày thứ 7 bằng máu ngoại vi chứ không phải dịch hút tủy xương [4] . Có thể vào thời điểm này số lượng tế bào rất thấp do phản ứng với hóa chất nên khi hút dịch tủy khó khăn có thể gây chết tế bào nhiều và sẽ có những gấn không đặc hiệu của kháng thể khiến việc phân tích có

thể không chính xác. Vào ngày điều trị cảm ứng thứ 14 nếu chỉ dựa vào hình thái học cho thấy hầu hết các bệnh nhi đã đạt lui bệnh với tỷ lệ BCN tủy xương 0% nhưng thực chất MRD cho thấy không có trường hợp nào đạt lui bệnh ở mức <0,01% (1BCN trong 10.000 tế bào có nhân), trong đó có 1 bệnh nhi tỷ lệ MRD rất cao. Vào thời điểm kết thúc điều trị cảm ứng, tức là ngày 28, có 15 trường hợp được đánh giá MRD vì 2 trường hợp chưa đến thời điểm, cho thấy về mặt hình thái học đã đạt lui bệnh 100% nhưng thực chất MRD chỉ có 5 trường hợp (33,3%) đạt lui bệnh hoàn toàn ở mức 0,01%. Ở mức MRD<0,1% cũng có 5 trường hợp (33,3%). Còn lại 1/3 số bệnh nhi MRD cao >1 %, trong đó có 1 trường hợp cao tới 1,95%. Trường hợp này không hề đáp ứng với điều trị, MRD 59,3% ngày thứ 14. Không tìm thấy sự đồng bộ giữa BCN lúc chẩn đoán với MRD. Tác giả N. Braham Jmili đánh giá MRD trên 75 bệnh nhân đạt lui bệnh hoàn toàn về hình thái học cho thấy tỷ lệ MRD <0,01% vào ngày 35 điều trị cảm ứng là 39,4%; <0,1 là 12,1%; >0,1 là 30,3 và >1 là 18,2% [9]. Như vậy tỷ lệ đạt lui bệnh sau điều trị cảm ứng với tỷ lệ MRD <0,01% cũng tương tự như nghiên cứu của chúng tôi.

## 5. KẾT LUẬN

1. Những kết hợp dấu ấn miễn dịch có thể sử dụng để đánh giá MRD trên Flow Cytometry 3 màu cho bạch cầu cấp thể B lympho gồm có:

- CD20/CD10/CD19
- CD34/CD38/CD19
- CD34/CD123/CD19
- CD34/CD45/CD19

- CD34/CD13 hoặc CD33/CD19 cho những trường hợp có CD13+ và / CD33+ lúc chẩn đoán.

2. Kết quả đánh giá MRD trên 17 bệnh nhi cho thấy:

Có sự khác biệt rõ rệt giữa hình thái học và đánh giá MRD trên Flow Cytometry:

- Các bệnh nhi lui bệnh hoàn toàn về hình thái học ngày điều trị cảm ứng thứ 14 đều có MRD>0,01%

- Ngày kết thúc điều trị cảm ứng chỉ 33,3% bệnh nhi đạt lui bệnh hoàn toàn với MRD<0,01% trong khi về hình thái học đạt lui bệnh hoàn toàn 100%.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Bene MC, 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: 1783-1786.

2. **Bennet JM, Catovsky D, Daniel MT et al.** Proposals for the classification of the acute leukemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 1976;33:451-458

3. **Chen YH, Tang YM, Shen HQ et al.** The expression of Cd4 in 210 cases of childhood acute leukemia and its significance. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*, 2004 Mar; 42(3): 188-191.

4. **Dario Campana, Elaine Coustan Smith.** Advances in the immunological monitoring of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Best Practice Research Clinical Hematology* 2002 Vol.15.No.1 : 1-19

5. **Dario Campana, Frederick G. Behm.** Immunophenotyping of leukemia. *Journal of Immunological Method* 243 2000: 59-75

6. **Kerrie Wilson, Marian Case, Lynne Minto et al.** Flow minimal residual disease monitoring of candidate leukemia stem cells defined by the immunophenotype, CD34<sup>+</sup>CD38<sup>low</sup>CD19<sup>+</sup> in B-lineage childhood acute lymphoblastic leukemia. *Hematologica* 2010 95(4) : 679-683.

7. **Migle J, Reda M, Laimonas G, Zita K.** Optimizing detection of minimal residual disease in B-precursor acute lymphoblastic leukemia by multiparameter flow cytometry. *ACTA MEDICA LITUANICA* 2007.Vol.14.No.4 : 257-266

8. **Mihaela Onclu.** Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematol Oncol Clin N Am* 23.2009: 655-674.

9. **N. Braham Jmili, M.C. Jacob, S.Yacoub et**

al. Flow Cytometry Evaluation of Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia Type B. The open Leukemia Journal, 2010,2, 47-54.

10. **Nagwa M. Hassanein, Felisa Alcancia, Kathryn R. Perkinson et al.** Distinct Expression Patterns of CD123 and CD34 on Normal Bone Marrow B-Cell Precursors ("Hematogones") and B lymphoblastic Leukemia Blast. Am J Clin Pathol 2009: 132573-580.

11. **Nina F. Obro, Lars P. Ryder, Hans O. Madsen et al.** Identification of residual leukemic

cells by flow cytometry in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: verification of leukemic state by flow –sorting and molecular/cytogenetic methods. Hematologica 2012 97(1): 137-141

12. **P Lucio, G Gaipa, EG van Lochem et al.** BIOMED-1 concerted action report : flow cytometric immunophenotyping of precursor B-ALL with standardized triple-stainings. Leukemia august 2001, Vol.15.No.8: 1185-1192.

## ABSTRACT

### FLOW CYTOMETRY EVALUATION OF MINIMAL RESIDUAL DISEASE IN CHILDREN WITH B PRECURSOR ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA AT NATIONAL HOSPITAL OF PEDIATRICS

The level of minimal residual disease (MRD) during treatment is the most important prognostic factor in children with acute lymphoblastic leukemia (ALL). Currently, Flow cytometry is acceptable in the world wide because of high sensitive but it is still very new in Vietnam. **Objective:** 1/ Detect the combinations of leukemia associated phenotype (LAIP) for MRD monitoring of children with B precursor acute lymphoblastic leukemia. 2/ Evaluate initially MRD with detected panels. **Material and method:** 104 children were diagnosed B precursor ALL by morphology and immunophenotyping including 87 patients for first objective and 17 patients for second objective. Analyse immunophenotyping on FACS Calibur 3 colors. **Results and discussion:** 1/ The combinations of LAIP for monitoring MRD on Flow Cytometry 3 colors: CD20/CD10/CD19; CD34/CD45/CD19; CD34/CD38/CD19; CD34/CD123/CD19; CD34/CD13 or CD33/CD19 for myeloid cross lineage expression CD13+ or / CD33+ at diagnosis. 2/ There were significantly different between morphology and MRD on flow cytometry: On day 14 induction, all patients have got complete remission (CR) by morphology but 100% all of them have MRD positive; Day 28 induction CR 100% by morphology but only 33,3% patients have MRD < 0,01% but all of them have complete remission by morphology. These results show that the complete remission is not only by morphology, flow cytometry is currently the best immunophenotype-based method to monitor MRD in ALL.

**Key words:** Precursor B- Acute lymphoblastic leukemia; Flow cytometry, Minimal residual disease (MRD), Leukemia associated immunophenotype.