

ΚΑΤΕΥΘΥΝΤΗΡΙΕΣ ΟΔΗΓΙΕΣ
ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΛΑΧΙΣΤΗΣ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΙΚΗΣ ΝΟΣΟΥ
ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΑΚΟΗΘΗ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

ΓΕΝΙΚΕΣ ΣΥΣΤΑΣΕΙΣ

Κατά τη διάγνωση

Φύλαξη DNA, RNA, ορού και ζωντανών κυττάρων (σε βαθιά κατάψυξη με κατάλληλο κρυοπροστατευτικό υλικό) από ιστό (αίμα, μυελό οστών, λεμφαδένα, άλλο) με σαφή διήθηση από τη νόσο.

Βασική προϋπόθεση

Έλεγχος υπολειμματικής νόσου μόνο εφόσον έχει τεκμηριωθεί πλήρης αιματολογική ύφεση με πρότυπες, καθιερωμένες τεχνικές.

ΟΞΕΙΑ ΜΥΕΛΟΓΕΝΗΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ

1. Οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία¹⁻²

Αξιολόγηση πάντοτε σε δείγμα μυελού με τεχνική RQ-PCR και εκκινήτες σύμφωνα με το πρωτόκολλο BIOMED-1³⁻⁴

- μετά την έφοδο
- μετά κάθε κύκλο σταθεροποίησης
- ανά τρίμηνο κατά τον 1^ο χρόνο
- ανά τετράμηνο κατά τον 2^ο χρόνο
- ανά εξάμηνο μετά τον 2^ο χρόνο (έως +5 έτη)

2. Οξεία μυελογενής λευχαιμία t(8;21) (RUNX1/MTG8) (+)⁶⁻⁷

Οξεία μυελογενής λευχαιμία inv(16)/t(16;16) (CBFB/MYH11) (+)⁶⁻⁷

Αξιολόγηση πάντοτε σε δείγμα μυελού με τεχνική RQ-PCR και εκκινήτες σύμφωνα με το πρωτόκολλο BIOMED-1³⁻⁴

- μετά την έφοδο
- διαφοροποίηση ανάλογα με το θεραπευτικό πρωτόκολλο (ιδίως, το είδος της θεραπείας σταθεροποίησης)

A. Μεταμόσχευση αυτόλογων αιμοποιητικών κυττάρων

- πριν τον κύκλο χημειοθεραπείας στον οποίο θα πραγματοποιηθεί συλλογή αιμοποιητικών κυττάρων
- έλεγχος αυτομοσχεύματος
- πριν τη διενέργεια αυτομεταμόσχευσης
- + 3 μήνες
- ανά τετράμηνο κατά τον 2^ο χρόνο
- ανά εξάμηνο μετά τον 2^ο χρόνο (έως +5 έτη)

B. Επανελημμένοι κύκλοι Cytarabine σε υψηλές δόσεις

- μετά τον 2^ο κύκλο σταθεροποίησης

- ανά τρίμηνο κατά τον 1^ο χρόνο
- ανά τετράμηνο κατά τον 2^ο χρόνο
- ανά εξάμηνο μετά τον 2^ο χρόνο (έως +5 έτη)

3. Οξεία μυελογενής λευχαιμία με άλλες γνωστές (recurrent) χρωμοσωμικές μεταθέσεις [π.χ. t(6;9), t(9;22)]⁶

Αξιολόγηση πάντοτε σε δείγμα μυελού με τεχνική RQ-PCR σύμφωνα με το πρωτόκολλο BIOMED I

- μετά την έφοδο
- διαφοροποίηση ανάλογα με το θεραπευτικό πρωτόκολλο (ιδίως, αν διενεργηθεί μεταμόσχευση αλλογενών αιμοποιητικών κυττάρων)

4. Οξεία μυελογενής λευχαιμία με φυσιολογικό καρυότυπο⁶⁻⁸

- Σε ασθενείς με μετάλλαξη του γονιδίου NPM1, ποσοτικοποίηση των μεταλλαγμένων αντιγράφων με real-time PCR
- Στους υπόλοιπους ασθενείς, ανοσοφαινοτυπική ανάλυση (μετά από συνεννόηση με το εργαστήριο, υπό προϋποθέσεις)

ΟΞΕΙΑ ΛΕΜΦΟΒΛΑΣΤΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ⁸

- **Μοριακή διερεύνηση κατά τη διάγνωση**

1. Οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία T κυτταρικής προέλευσης

Αναζήτηση μονοκλωνικών αναδιατάξεων γονιδίων της γ και της δ αλυσίδας του TCR

Αναζήτηση χιμαιρικού γονιδίου bcr-abl (~2%)

Κατά περίπτωση, ταυτοποίηση χιμαιρικών μεταγράφων τα οποία παράγονται από χρωμοσωμικές μεταθέσεις που ταυτοποιήθηκαν με κυτταρογενετική ανάλυση (SIL/TAL1)

2. Οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία B κυτταρικής προέλευσης

Αναζήτηση μονοκλωνικών αναδιατάξεων των γονιδίων της βαριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών

Αναζήτηση μονοκλωνικών αναδιατάξεων γονιδίων της γ και της δ αλυσίδας του TCR

Αναζήτηση χιμαιρικού γονιδίου bcr-abl

Κατά περίπτωση, ταυτοποίηση χιμαιρικών μεταγράφων τα οποία παράγονται από χρωμοσωμικές μεταθέσεις που ταυτοποιήθηκαν με κυτταρογενετική ανάλυση (BCR/ABL, E2A/PBX1, TEL/RUNX1, MLL/AF4, MLL/AF9)

- **Βασικές αρχές αναζήτησης ελάχιστης υπολειμματικής νόσου**

Υπογραμμίζεται η ανάγκη παρακολούθησης κάθε ασθενούς με την ίδια μεθοδολογία (π.χ. πολυπαραμετρική κυτταρομετρία ροής ή μοριακή ανάλυση) και όχι με εναλλαγή της μεθοδολογίας.⁹⁻¹⁰

Χρονικά στιγμιότυπα: ανάλογα με το εφαρμοζόμενο θεραπευτικό πρωτόκολλο. Σε κάθε περίπτωση, συστήνεται ο έλεγχος τουλάχιστον μετά την έφοδο και μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας σταθεροποίησης.¹¹⁻¹²

1. Οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία T κυτταρικής προέλευσης

Εξέταση σε δείγμα αίματος ή μυελού οστών¹³. Όχι εναλλαγή είδους δείγματος στον ίδιο ασθενή.^{9-10,13}

Μεθοδολογία εκλογής: “clone-specific” PCR (ειδικοί primers και probes με βάση την αλληλουχία της μεταβλητής περιοχής TCRγ, TCRδ κάθε λευχαιμικού κλώνου)^{8,14}

2. Οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία Β κυτταρικής προέλευσης

Εξέταση πάντοτε σε δείγμα μυελού οστών.

Ανάλογα με την πολιτική του κέντρου, ωστόσο προτείνεται επιλογή μεταξύ των εξής προσεγγίσεων:

- Πολυπαραμετρική κυτταρομετρία ροής: πρωτόκολλα 4-color, 6-color^{8-10,15-16}
- RQ-PCR για χιμαιρικά μετάγραφα (εφόσον έχουν ταυτοποιηθεί κατά τη διάγνωση)⁸⁻¹⁴
- Clone-specific PCR για αναδιατάξεις αντιγονικών υποδοχέων: ιδανικά, με δύο μοριακούς στόχους^{8,14,17-19}

ΧΡΟΝΙΑ ΜΥΕΛΟΓΕΝΗΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ
ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΥΠΟ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΜΕ ΤΚIs²⁰⁻²³

- **Κυτταρογενετική ανάλυση**

Δείγμα μυελού οστών.

Ανά τρίμηνο μέχρι την επίτευξη πλήρους κυτταρογενετικής ύφεσης (CCyR: 0% Ph+ μεταφάσεις).

Επί CCyR: έλεγχος ανά έτος.

- **Μοριακή ανάλυση = Ποσοτική RQ-PCR**

Δείγμα αίματος.

Έλεγχος ανά τρίμηνο.

- **Αναζήτηση μεταλλάξεων *abl***

Διαδοχική αύξηση μεταγράφων *bcr-abl* σε δύο δείγματα με μεσοδιάστημα 2 μηνών $>0.5 \log$.

ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ

ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΑΣΘΕΝΩΝ ΥΠΟ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΜΕ FCR²⁴⁻²⁵

Εφόσον τεκμηριωθεί αιματολογική ύφεση.

Έλεγχος με ΠΟΛΥΠΑΡΑΜΕΤΡΙΚΗ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ (πχ πρωτόκολλο ERIC²⁶) σε δείγματα αίματος

- μετά τον 3^ο κύκλο
- μετά τον 6^ο κύκλο
- ανά τετράμηνο για τον 1^ο-2^ο χρόνο
- ανά εξάμηνο μετά τον δεύτερο χρόνο

ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΑΣΘΕΝΩΝ ΥΠΟ ΑΛΛΑ ΣΧΗΜΑΤΑ ΜΕ RITUXIMAB

Εφόσον τεκμηριωθεί αιματολογική ύφεση.

Έλεγχος με ΠΟΛΥΠΑΡΑΜΕΤΡΙΚΗ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ (πρωτόκολλο ERIC²⁶) σε δείγματα αίματος

- μετά τον 3^ο κύκλο
- μετά τον 6^ο κύκλο
- ανά τετράμηνο
- ανά εξάμηνο

ΛΕΜΦΩΜΑ ΑΠΟ ΤΟ ΚΥΤΤΑΡΟ ΤΟΥ ΜΑΝΔΥΑ

- **Μοριακή διερεύνηση κατά τη διάγνωση**

Αναζήτηση μονοκλωνικών αναδιατάξεων των γονιδίων της βαριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών

- **Βασικές αρχές αναζήτησης ελάχιστης υπολειμματικής νόσου²⁷**

Έλεγχος δειγμάτων μυελού οστών.

Χρονικά στιγμιότυπα: ανάλογα με το εφαρμοζόμενο θεραπευτικό πρωτόκολλο.

Μεθοδολογία εκλογής: “clone-specific” PCR (ειδικοί primers και probes με βάση την αλληλουχία της μεταβλητής περιοχής της ανοσοσφαιρίνης κάθε λεμφωματικού κλώνου).

ΛΕΜΦΟΖΙΔΙΑΚΟ ΛΕΜΦΩΜΑ

- **Μοριακή διερεύνηση κατά τη διάγνωση**

Αναζήτηση χιμαιρικού γονιδίου bcl-2/IGH, προϊόντος της χρωμοσωμικής μετάθεσης t(14;18).

- **Βασικές αρχές αναζήτησης ελάχιστης υπολειμματικής νόσου²⁷**

Έλεγχος δειγμάτων αίματος ή μυελού οστών.

Χρονικά στιγμιότυπα: ανάλογα με το εφαρμοζόμενο θεραπευτικό πρωτόκολλο²⁸.

Μεθοδολογία εκλογής: ποσοτικοποίηση αντιγράφων του χιμαιρικού γονιδίου bcl-2/IGH με τεχνική real-time PCR (ειδικοί primers και probes με βάση την αλληλουχία της μεταβλητής περιοχής της ανοσοσφαιρίνης κάθε λεμφωματικού κλώνου).

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Sanz et al. Management of acute promyelocytic leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2009;113:1875-91
2. Grimwade et al. Prospective minimal residual disease monitoring to predict relapse of acute promyelocytic leukemia and to direct pre-emptive arsenic trioxide therapy. *J Clin Oncol.* 2009;27:3650-8.
3. van Dongen et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: Investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999; 13:1901-28
4. Gabert et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. *Leukemia.* 2003;17:2318-57.
5. Grimwade et al. Assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Curr Opin Oncol.* 2010;22:656-63.
6. Kern W et al. Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Cancer.* 2008;112:4-16.
7. Kern et al. The role of multiparameter flow cytometry for disease monitoring in AML. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2010;23:379-90.
8. Bruggemann et al. Standardized MRD quantification in European ALL trials: proceedings of the Second International Symposium on MRD assessment in Kiel, Germany, 18-20 September 2008. *Leukemia.* 2010;24:521-35.
9. Szczepanski et al. Why and how to quantify minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia? *Leukemia* 2007; 21:622-6
10. Coustan-Smith et al. Immunologic minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia: a comparative approach to molecular testing. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2010;23:347-58.
11. Stow et al. Clinical significance of low levels of minimal residual disease at the end of remission induction therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2010;115:4657-63.
12. Campana D. Role of minimal residual disease monitoring in adult and pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2009;23:1083-98

13. van der Velden et al. Minimal residual disease levels in bone marrow and peripheral blood are comparable in children with T cell acute lymphoblastic leukemia (ALL), but not in precursor-B ALL. *Leukemia* 2002;16:1432-6
14. van der Welden et al. Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia* 2007; 21:604-11
15. Dworzak et al. Standardization of flow cytometric minimal residual disease evaluation in acute lymphoblastic leukemia: multicentric assessment is feasible. *Cytometry B Clin Cytom* 2008; 74: 331-40
16. Irving J et al. Establishment and validation of a standard protocol for the detection of minimal residual disease in B lineage childhood acute lymphoblastic leukemia by flow cytometry in a multi-center setting. *Haematologica* 2009; 94: 870-4.
17. Evans et al. Significantly improved PCR-based clonality testing in B-cell malignancies by use of multiple immunoglobulin gene targets. Report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936. *Leukemia* 2007; 21:207-14
18. Zhou et al. Quantitative analysis of minimal residual disease predicts relapse in children with B-lineage acute lymphoblastic leukemia in DFCIALL Consortium Protocol 95-01. *Blood* 2007;110:1607-11
19. Conter et al. Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results in 3184 patients of the AIEOP-BFMALL 2000 study. *Blood* 2010;115:3206-321
20. Hughes et al. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood* 2006; 108: 28-37.
21. Branford et al. Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukaemia. *Leukemia* 2006; 20:1925-30.
22. Müller et al. Harmonization of molecular monitoring of CML therapy in Europe. *Leukemia*. 2009;23:1957-63.
23. Baccarani et al. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J Clin Oncol*. 2009;27:6041-51.

24. Hallek et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2010;376:1164-74.
25. Boettcher S et al. Quantitative MRD Assessments Predict Progression Free Survival in CLL Patients Treated with Fludarabine and Cyclophosphamide with or without Rituximab – a Prospective Analysis in 471 Patients from the Randomized GCLLSG CLL8 Trial. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 2008 112: Abstract 326*
26. Rawstron et al. International standardized approach for flow cytometric residual disease monitoring in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia*. 2007;21:956-64.
27. Pott et al. Molecular remission is an independent predictor of clinical outcome in patients with mantle cell lymphoma after combined immunochemotherapy: a European MCL intergroup study. *Blood* 2010;115:3215-23
28. Rambaldi A et al. Quantitative PCR of bone marrow BCL2/IgH+ cells at diagnosis predicts treatment response and long-term outcome in follicular non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2005 May 1;105(9):3428-33.