

Mesureable residual disease (MRD)

SK-kurs i AML 2021

Linda Fogelstrand

Klinisk kemi & Centrum för medicinsk genomik

Sahlgrenska Universitetssjukhuset, Göteborg

MRD-analys

**MRD = Measurable (tid: minimal)
residual disease**

Leukemiceller i en frekvens som är under
mikroskopet detektionsgräns

**SKILJ LEUKEMICELLER
FRÅN NORMALA CELLER**



Mikroskopi

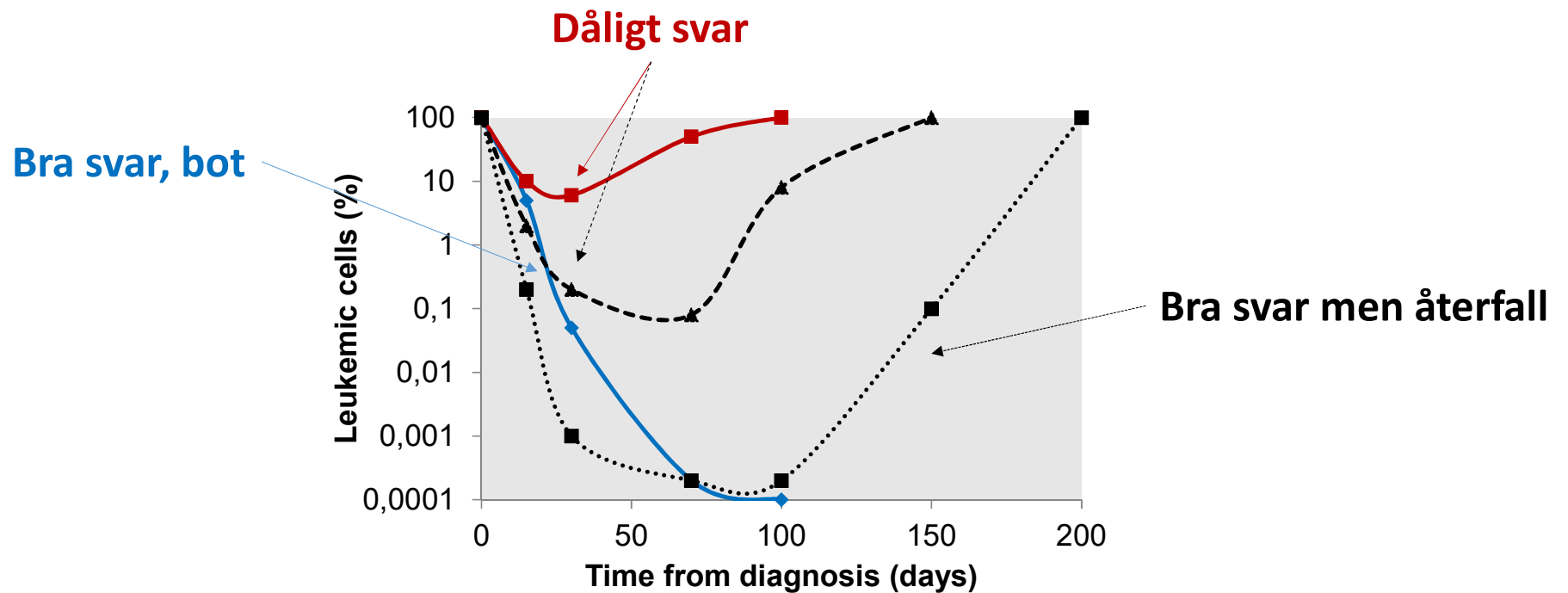


European Leukemia Net:

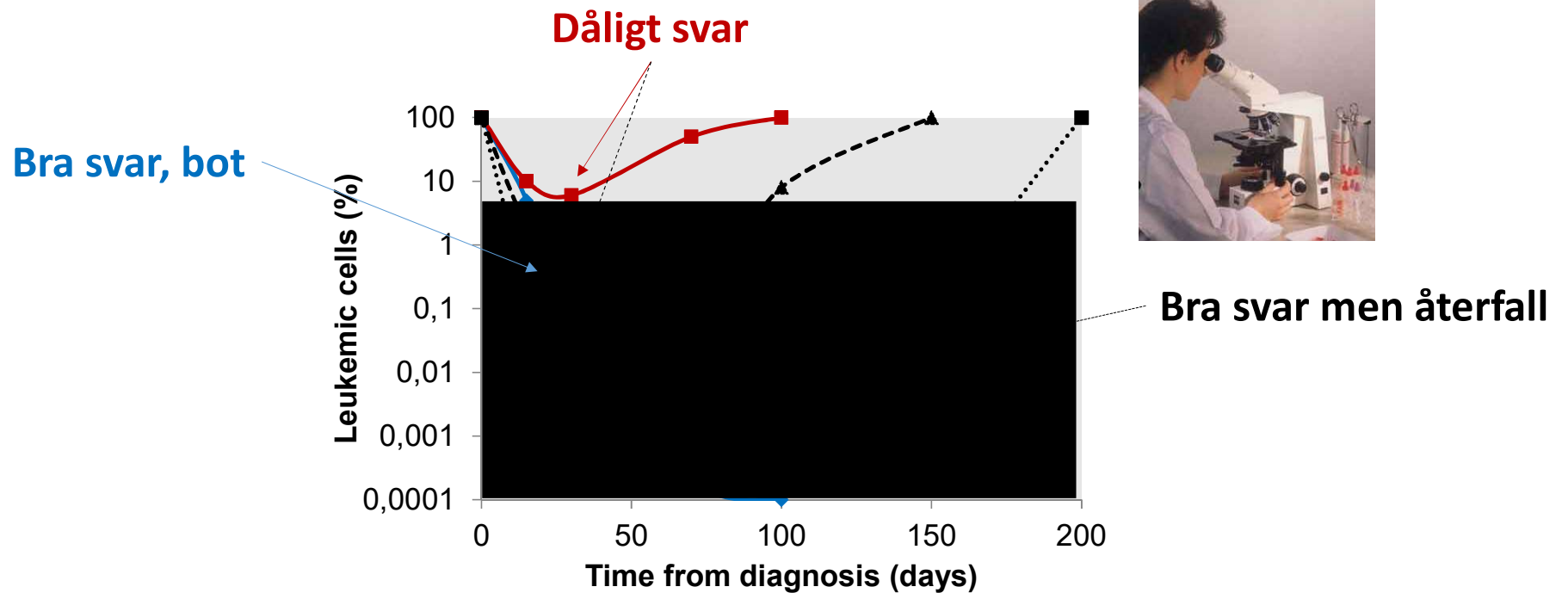
1 leukemicell /
1.000 normala
celler

MRD-analys

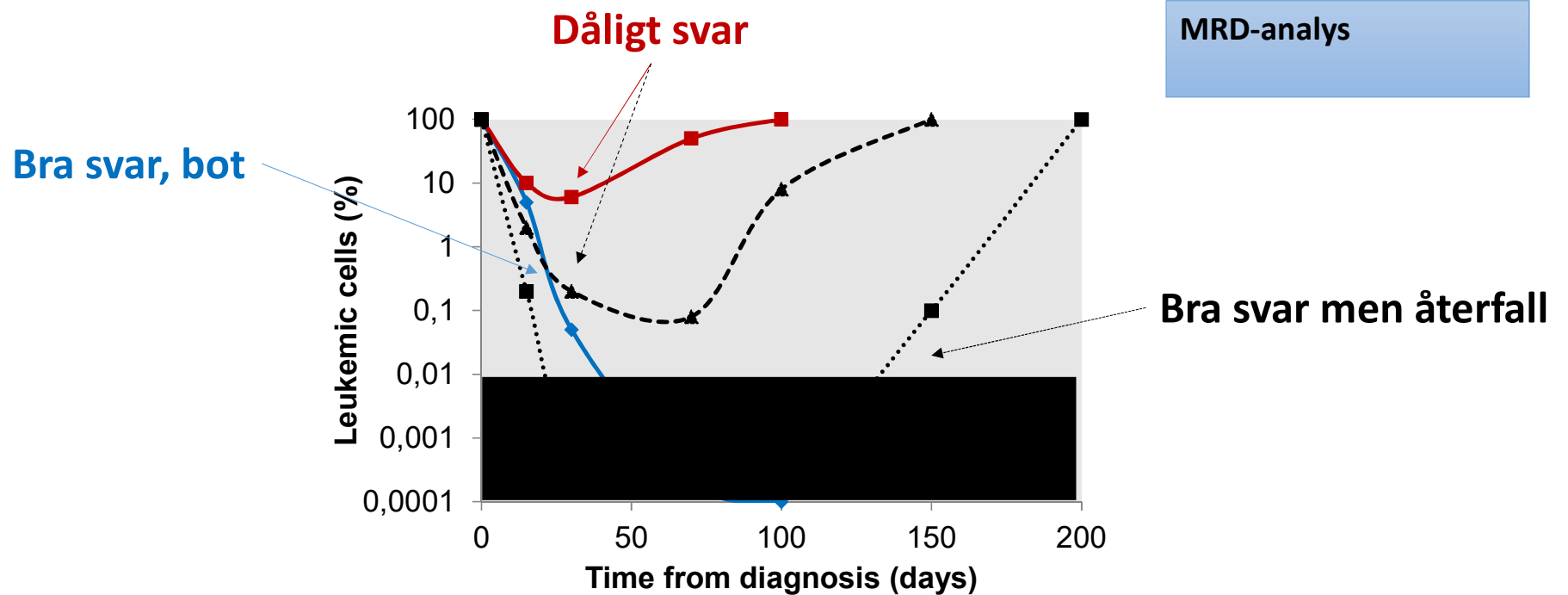
MRD-analys vs mikroskopi



MRD-analys vs mikroskopi



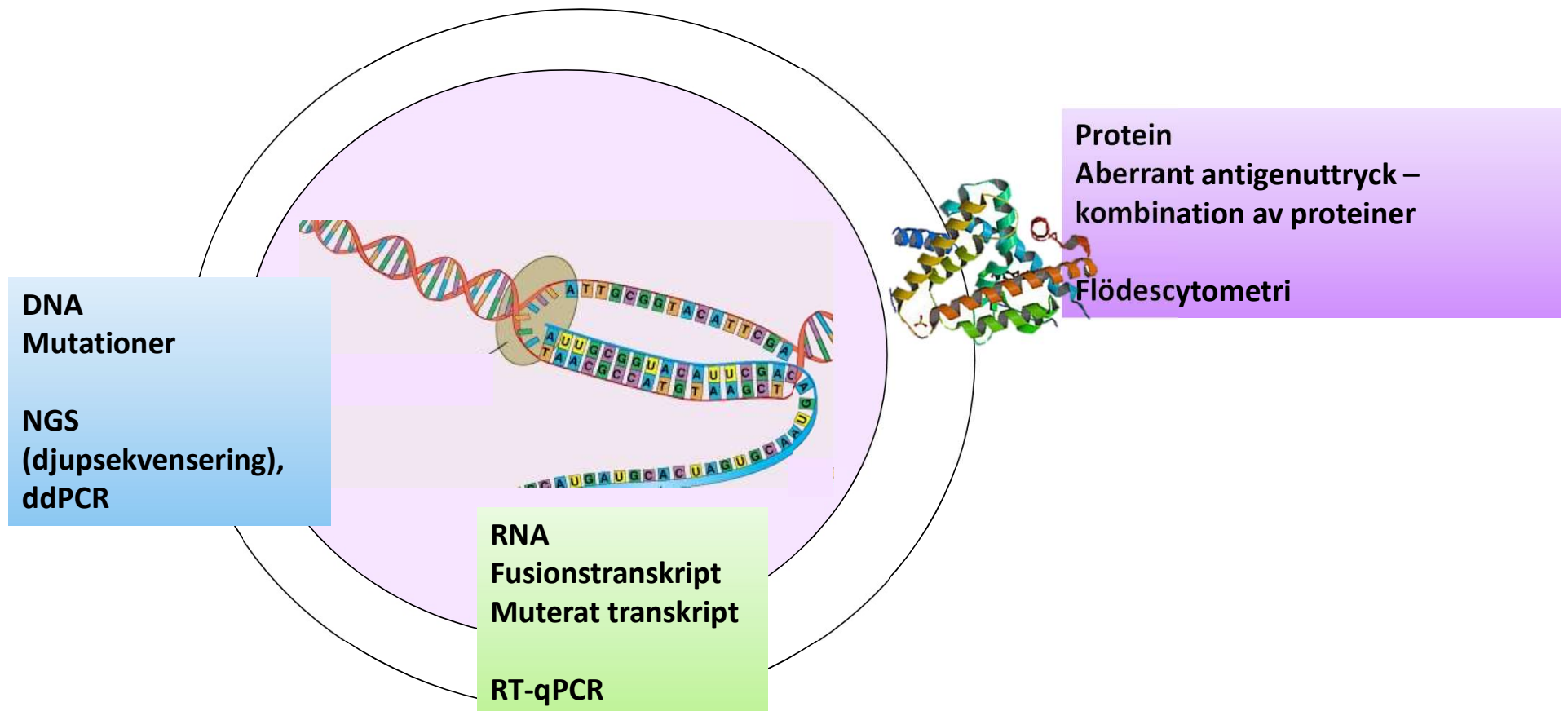
MRD-analys vs mikroskopi



Syften med att analysera förekomst av MRD

1. Identifiera de patienter med genetisk lågriskgenetik som har hög recidivrisk och därmed kan ha nytta av alloHCT
2. Identifiera patienter med genetisk intermediärrisk som har en relativ liten recidivrisk
3. Identifiera patienter med ökad recidivrisk efter alloHCT
4. Följa patienter för att identifiera ett molekylärt recidiv och kunna vidta åtgärder för att förhindra kliniskt recidiv

MRD-analys går ut på att skilja leukemiceller från normala celler



MRD-analys med flödescytometri

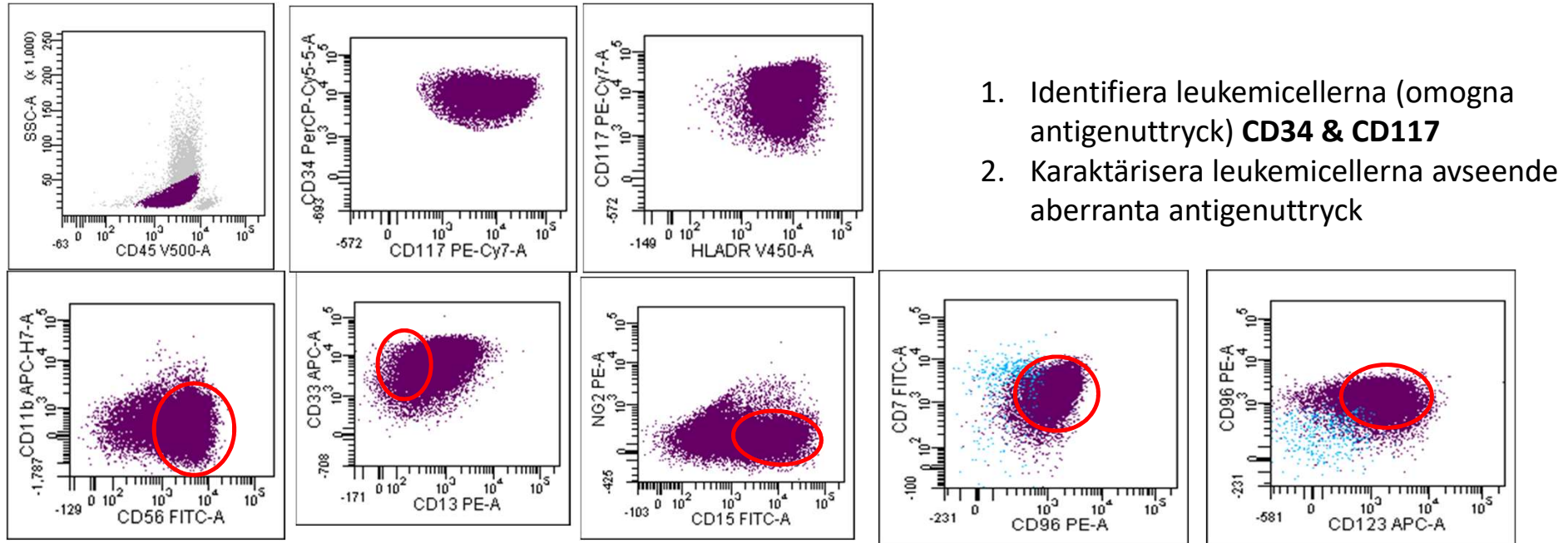
- Leukemiceller har aberranta antigenuttryck → kan skiljas från normala prekursorer i benmärgen
- Vid diagnos → definiera leukemicellernas LAIP = leukemia-associated immunophenotype
- Vid MRD-analys → kvantifiera LAIP + 'different from normal'
- Svaras ut som % av alla celler (leukocyter)
- Känslighet: 50 celler kan detekteras, helst analyseras 500.000-1 milj celler
- Känsligheten beror ffa på bakgrund (0,1% vid AML – inte lika känsligt som vid ALL)

MRD-analys med flödescytometri

- Standardisering enligt NOPHO-DBH AML-2012 guidelines

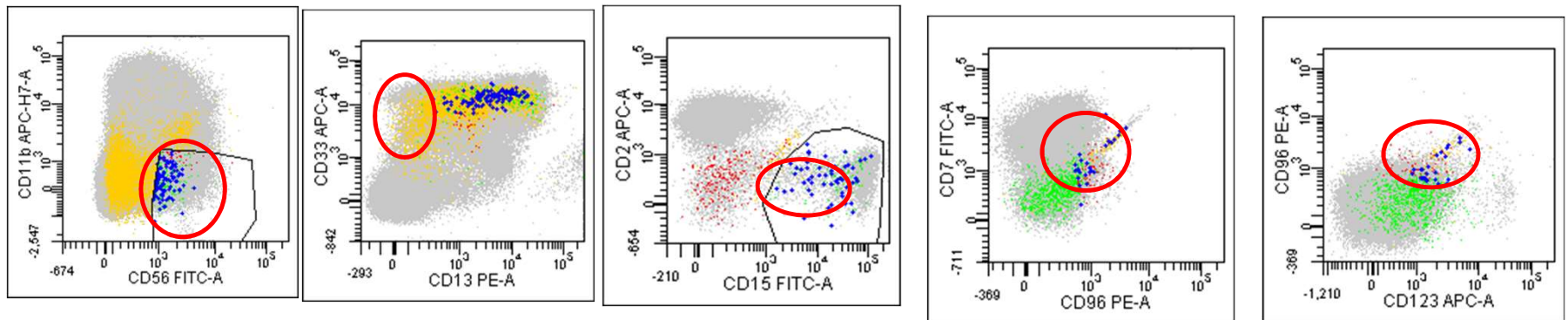
	Horizon V450	Horizon V500	FITC	PE	PerCPy5 .5	PE-Cy7	APC	APC-H7 APC-Cy7
1	HLA-DR	CD45	CD56	CD13	CD34	CD117	CD33	CD11b
2	HLA-DR	CD45	CD36	CD64	CD34	CD117	CD33	CD14
3	HLA-DR	CD45	CD15	NG2	CD34	CD117	CD2	CD19
4	HLA-DR	CD45	CD7	CD96	CD34	CD117	CD123	CD38
5	HLA-DR	CD45	CD99	CD11a	CD34	CD117	CD133	CD4

DIAGNOS AML



MRD-ANALYS

Leta efter omogna celler med leukemicellernas antigenkombination



MRD-analys med flödescytometri

STYRKOR:

- "Enkelt att förstå", cellandelar
- Kan appliceras på majoriteten av fall med AML
- Hög specificitet & högt positivt prediktionsvärde

SVAGHETER:

- Svårt att utföra, kräver mycket erfaren personal samt tar mycket tid i laboratoriet
- Ofta kan bara delar av leukemin skiljas från normala celler
- Låg sensitivitet och lågt negativt prediktionsvärde
- Värdefullt för bedömning av behandlingssvar samt inför alloSCT, men inte för monitorering för tidig upptäckt av återfall

MRD-analys med RT-qPCR

Fusion transcripts

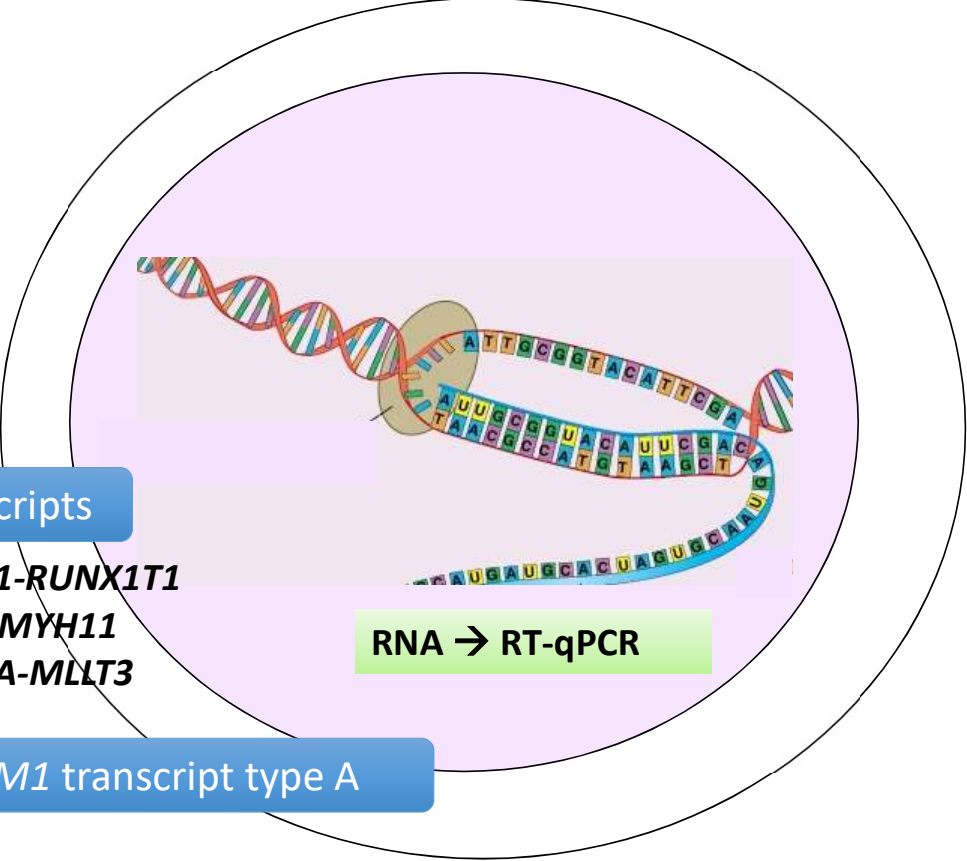
t(8;21): *RUNX1-RUNX1T1*

Inv(16): *CBFB-MYH11*

t(9;11): *KMT2A-MLLT3*

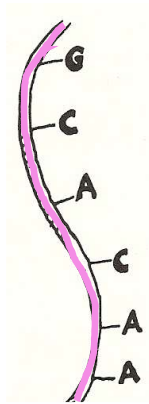
Mutated *NPM1* transcript type A

RNA → RT-qPCR

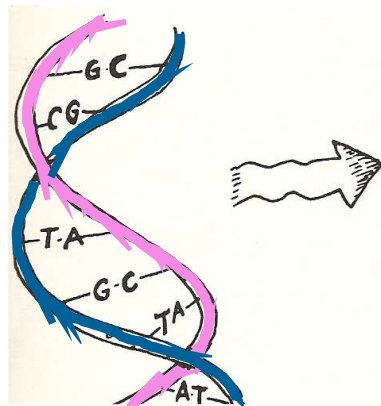


RT-qPCR

RNA



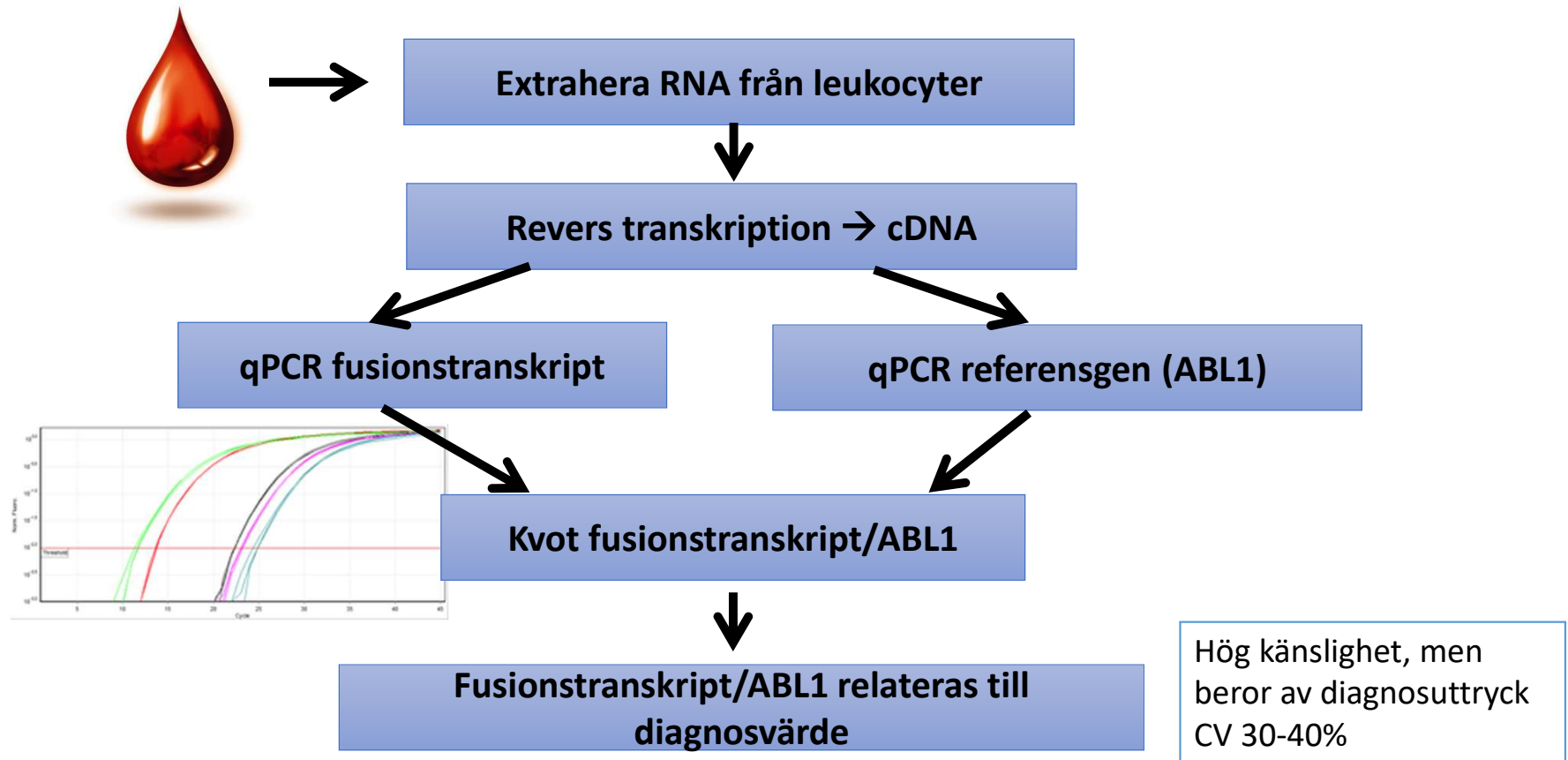
cDNA



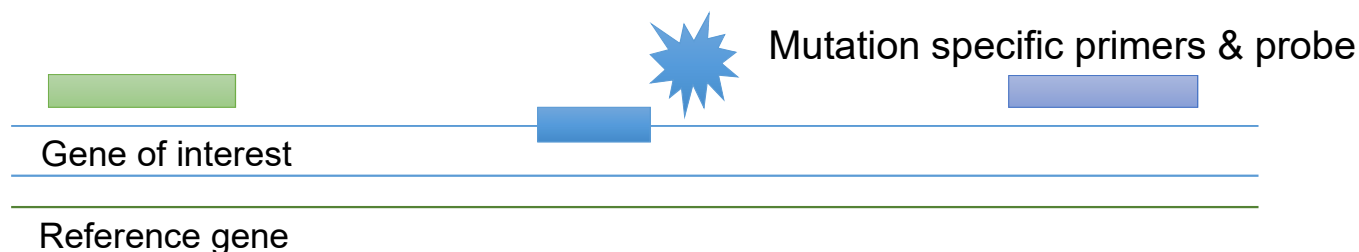
Amplifiziert cDNA



MRD-analys med RT-qPCR



MRD-analys med RT-qPCR



Calibration curve

Specifik RT-qPCR assay för

- t(8;21) – samma för alla *RUNX1-RUNX1T1*
- inv(16) – beroende på isoform av *CBFB-MYH11*
- t(15;17) – beroende på isoform av *PML-RARA*
- *NPM1* – mutationsspecifik (tex typ A)

Type	Sequence	No. of Patients	Percent
A	GCTATTCAAGATCTCTG TCTG GCAGTGGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAAATAG	257	74
B	GCTATTCAAGATCTCTG CATG GCAGTGGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAAATAG	22	6
D	GCTATTCAAGATCTCTG CCTG GCAGTGGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAAATAG	31	9
	GCTATTCAAGATCTCTG CTTG GCAGTGGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAAATAG	5	
	GCTATTCAAGATCTCTG TATG GCAGTGGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAAATAG	5	
	GCTATTCAAGATCTCTG TCGG GCAGTGGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAAATAG	3	
	GCTATTCAAGATCTCTG CAGG GCAGTGGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAAATAG	2	
	GCTATTCAAGATCTCTG TAGG GCAGTGGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAAATAG	2	
	GCTATTCAAGATCTCTG CGTG GCAGTGGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAAATAG	1	
	GCTATTCAAGATCTCTG TTGG GCAGTGGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAAATAG	1	
	GCTATTCAAGATCTCTG CAAAG GCAGTGGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAAATAG	1	
	GCTATTCAAGATCTCTG TAGG GCAGTGGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAAATAG	1	
	GCTATTCAAGATCTCTG CTCG GCAGTGGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAAATAG	1	
	GCTATTCAAGATCTCTG CAGA GCAGTGGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAAATAG	1	
	GCTATTCAAGATCTCTG CCGG GCAGTGGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAAATAG	1	
	GCTATTCAAGATCTCTG TCAG GCAGTGGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAAATAG	1	10
	GCTATTCAAGATCTCTG TTCG GCAGTGGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAAATAG	1	
	GCTATTCAAGATCTCTG CCGTT GCAGTGGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAAATAG	1	
	GCTATTCAAGATCTCTG TCAAGACTTCTTA AGTCTCTTTAAGAAAAATAG	1	
	GCTATTCAAGATCTCTG TCGGAGTCTGGCGGAC TCCTTTAAGAAAAATAG	1	
	GCTATTCAAGATCTC ACAA TGGCAGTGGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAAATAG	1	
	GCTATTCAAGATCTC TCCATGCTCC TGGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAAATAG	1	
	GCTATTCAAGATCTCTGGCAG CGGA TGGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAAATAG	1	
	GCTATTCAAGATCTCTGGCAG AGGC TGGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAAATAG	1	
	GCTATTCAAGATCTCTGGCAGT CTTTGCTCAC GTCTCTTTAAGAAAAATAG	1	
	GCTATTCAAGATCTCTGGCAGT TTTTGCTC AAGTCTCTTTAAGAAAAATAG	1	
	GCTATTCAAGATCTCTGGCAGT TTTTCCC AAGTCTCTTTAAGAAAAATAG	1	

346 Total No. of Patients

MRD-analys med RT-qPCR

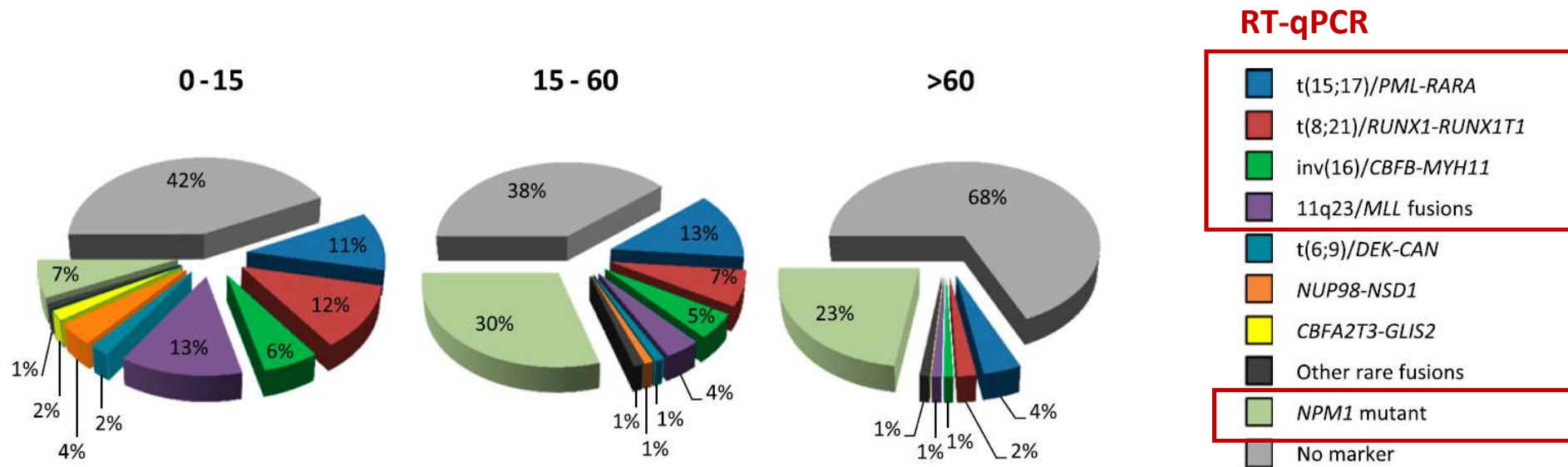
STYRKOR:

- Enklare för laboratoriet än flödescytometri (objektiv analys, inte subjektiv)
- Hög sensitivitet & högt negativt prediktionsvärde
- Kan användas för både behandlingsrespons och monitorering för tidig upptäckt av återfall

SVAGHETER:

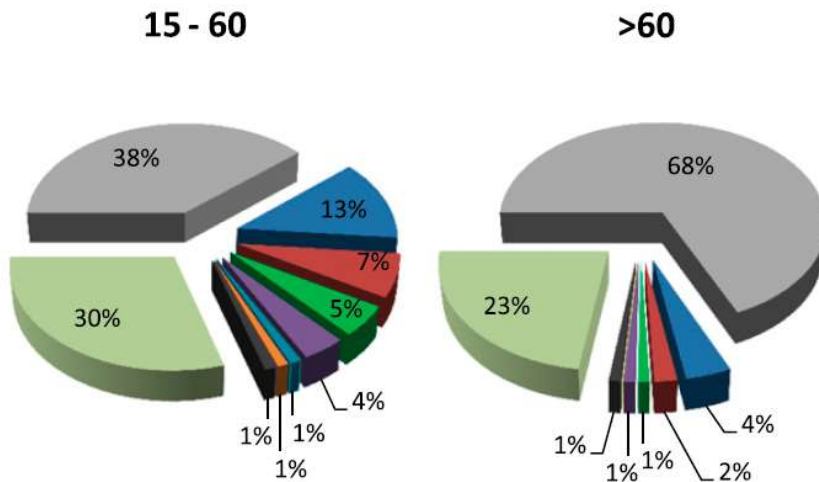
- Svårare att förstå – en cell med högt uttryck av fusionsgen eller många celler med lågt uttryck? Är cellerna som uttrycker fusionsgenen omogna eller mogna?
- Kvarvarande låga nivåer i benmärg kan oroa
- Kan bara appliceras på patienter med kvantifierbar markör (t(8;21), inv(16), NPM1 typ A, t(15;17))
- Svårtolkat inför alloSCT

Molekylärgenetiska markörer vid AML



Review on MRD analysis in AML - Grimwade & Freeman, Blood 2014

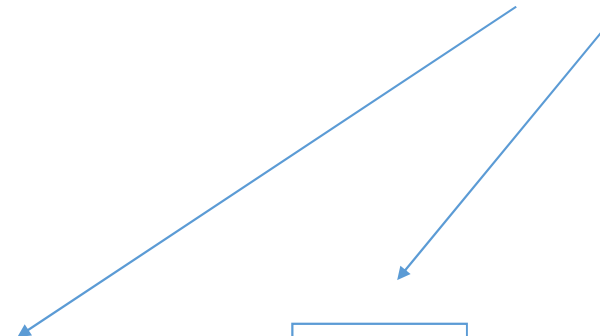
NGS kan identifiera nya molekyllära markörer



- Riktad panel (NGS myeloid panel)
- Helgenomsekvensering



**Mutationer
(ffa SNVs)**

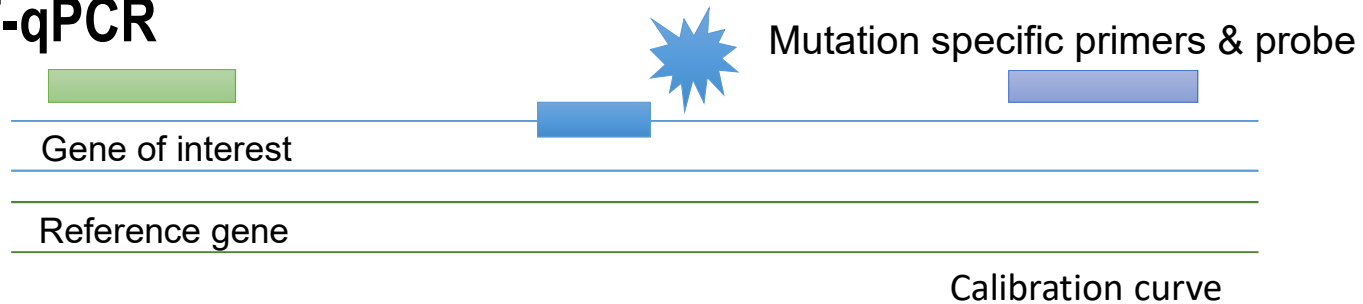


**RIKTAD
DJUPSEKVENSERING**

ddPCR

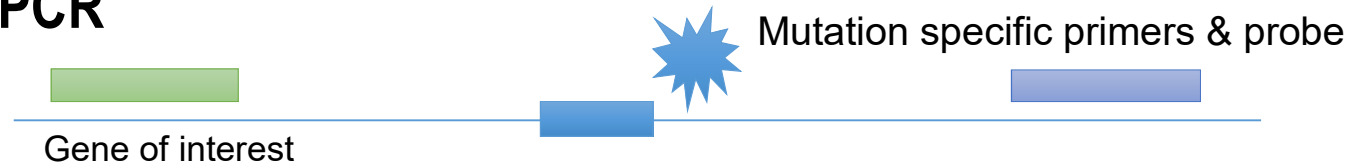
Kvantifiering av molekylära markörer

RT-qPCR



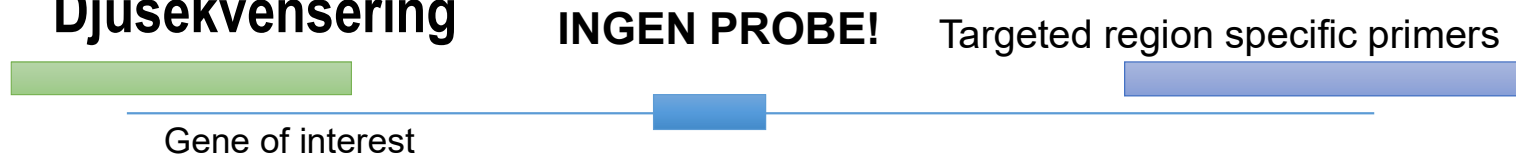
% target
gene/
reference
gene

ddPCR



% muterade
alleler

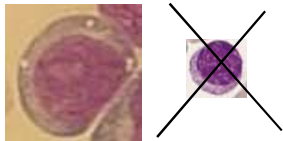
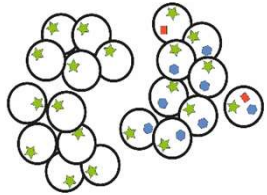
Djusekvensering



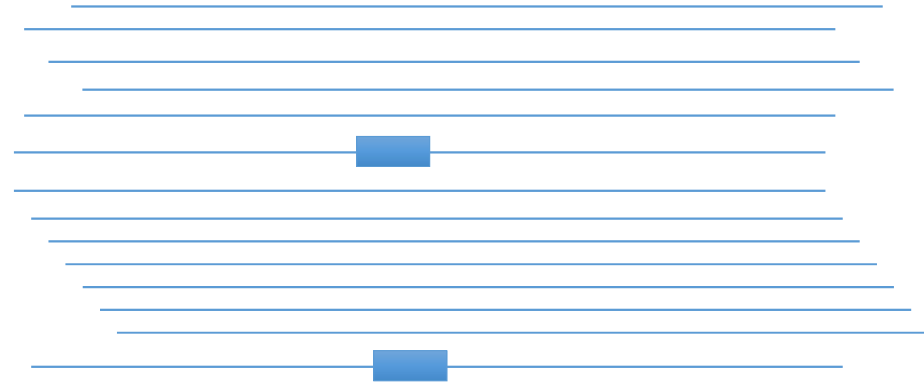
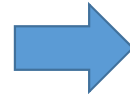
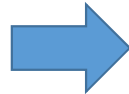
% muterade
alleler

Djupsekvensering för MRD-analys vid AML

IDENTIFIERING AV
LEUKEMISPECIFIK
MUTATION(ER)



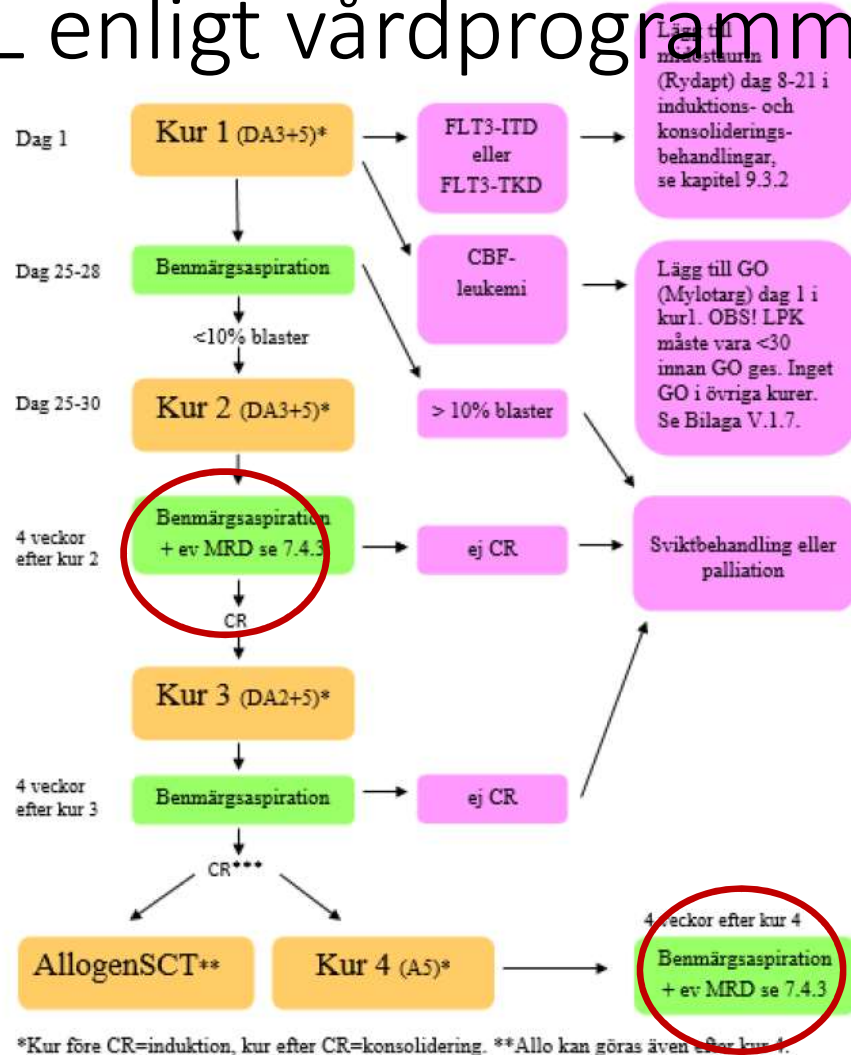
RIKTAD
DJUPSEKVENSERING



Andel muterade alleler = variantallelfrekvens
(VAF)
 $VAF \times 2 \rightarrow$ andel leukemiceller

Används idag för *NPM1* – andra mutationer än typ A.
Sannolikt framtid för andra mutationer

MRD vid AML enligt vårdprogrammet



MRD vid AML enligt vårdprogrammet

t(8;21) / inv(16) / mut *NPM1*
→ molekulärgenetik

Övriga
→ flödescytometri

E. 2 kurer

BM

Blod

BM

E. Sista kuren

BM

Blod

BM

Monito-
ring

BM var 3:e mån* i två år
Plus 2 mån efter (om pos och
därefter neg)

BM var 3:e mån* i två år
Om pat ej genomgår alloSCT

*Alternativt blod var 4-6 vecka

Monitorering av en patient med mutation i *NPM1*

66 year-old man

AML with mutated *NPM1*

No *FLT3*-ITD

(no NGS analysis performed)

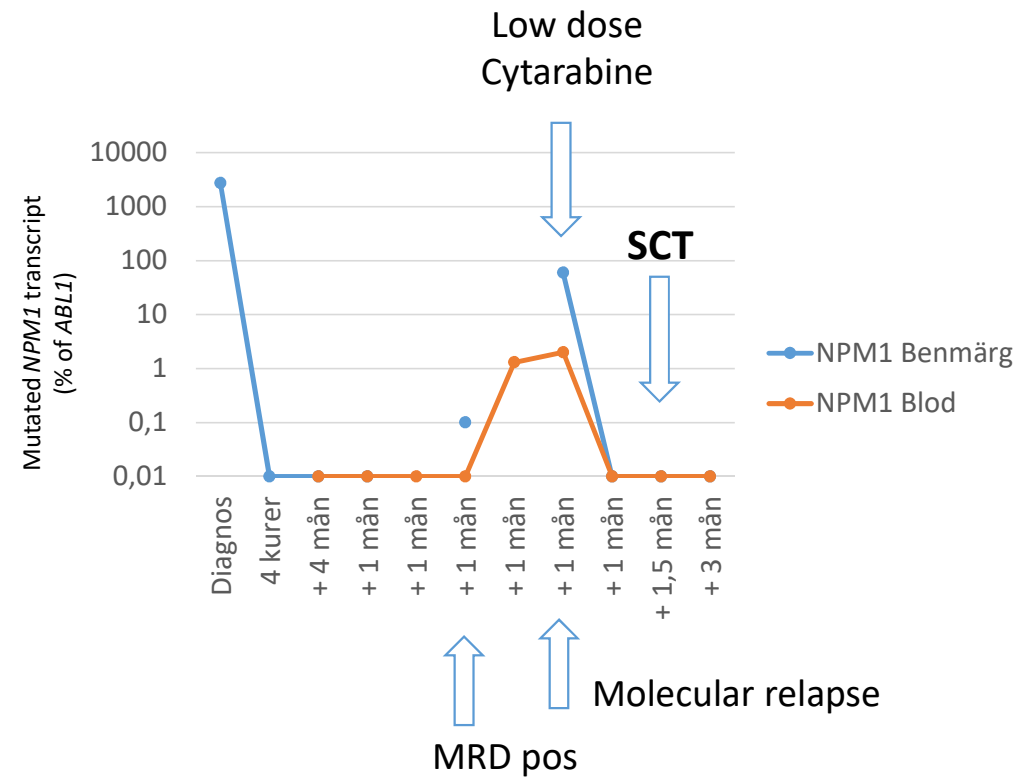
Low risk genetics



No SCT

Good response after 4 courses
(RT-qPCR mutated *NPM1*)

Monitored after end of treatment



MRD vid AML enligt vårdprogrammet

t(8;21) / inv(16) / mut *NPM1*
→ molekulärgenetik

Kan leda till SCT trots lågrisk

Möjliggör tidig detektion av
återfall

Övriga
→ flödescytometri

Kan användas som hjälp i fall med
flera faktorer mot SCT

Kan påverka handläggning i
samband med SCT

Vissa saknar "LAIP" → MRD-
analys med flöde meningslös

Sammanfattning

- MRD-analys rekommenderas idag för alla patienter som kan vara aktuella för alloSCT
- Rekommenderas efter 2 kurer, efter avslutad behandling, inför alloSCT, monitorering efter avslutad behandling (2 år)
- Metod beror på vilken typ av AML det är
 - t(8;21)/inv(16)/NPM1 mut → molekulärgenetisk
 - Övriga → flödescytometri
- Fält i utveckling → håll er uppdaterade 😊