



Názov:

**Štandardný diagnosticko-laboratórny
postup pre genetickú diagnostiku akútnej
myeloidnej leukémie u dospelých (AML)**

Autor:

**Ing. Martin Čermák
RNDr. Imrich Hikkel PhD.
Mgr. Lívia Rotíková
Dr. med. Veronika Urbán**

Špecializačný odbor:

Onkologická genetika

Ministerstvo zdravotníctva Slovenskej republiky podľa § 45 ods. 1 písm. c) zákona 576/2004 Z. z. o zdravotnej starostlivosti, službách súvisiacich s poskytovaním zdravotnej starostlivosti a o zmene a doplnení niektorých zákonov v znení neskorších predpisov vydáva štandardný postup:

Štandardný diagnosticko-laboratórny postup pre genetickú diagnostiku akútnej myeloidnej leukémie u dospelých (AML)

Číslo ŠP	Dátum predloženia na Komisiu MZ SR pre ŠDTP	Status	Dátum účinnosti schválenia ministrom zdravotníctva SR
0122	4. december 2020	schválené	1. február 2021

Autori štandardného postupu

Autorský kolektív:

Ing. Martin Čermák; RNDr. Imrich Hikkel PhD.; Mgr. Lívia Rotíková; Dr. med. Veronika Urbán

Odborná podpora tvorby a hodnotenia štandardného postupu

Prispievatelia a hodnotitelia: členovia odborných pracovných skupín pre tvorbu štandardných diagnostických a terapeutických postupov MZ SR (OPS Onkologická genetika: RNDr. Peter Vasovčák, PhD.); hlavní odborníci MZ SR príslušných špecializačných odborov; hodnotitelia AGREE II. (RNDr. Imrich Hikkel PhD.; Mgr. Lívia Rotíková; Dr. med. Veronika Urbán; MUDr. Natália Račeková; RNDr. Radoslava Tomášová; RNDr. Renáta Lukačková, PhD.; RNDr. Andrea Blahová); členovia multidisciplinárnych odborných spoločností; odborný projektový tím MZ SR pre ŠDTP a patientske organizácie zastrešené AOPP v Slovenskej republike; Inštitút zdravotníckej politiky; NCZI; Sekcia zdravia MZ SR, Kancelária WHO na Slovensku.

Odborní koordinátori: MUDr. Peter Bartoň; prof. MUDr. Mariana Mrázová, PhD., MHA; MUDr. Štefan Laššán, PhD.; prof. MUDr. Jozef Šuvada, PhD., MPH

Recenzenti

členovia Komisie MZ SR pre ŠDTP: MUDr. Peter Bartoň; PharmDr. Zuzana Baťová, PhD.; PharmDr. Tatiana Foltánová, PhD.; MUDr. Róbert Hill, PhD., MPH; prof. MUDr. Jozef Holomáň, CSc.; doc. MUDr. Martin Hrubíško, PhD., mim. prof.; MUDr. Jana Kelemenová; MUDr. Branislav Koreň; prof. MUDr. Ivica Lazúrová, DrSc.; PhDr. Mária Lévyová; MUDr. Jozef Kalužay, PhD.; Mgr. Katarína Mažárová; prof. MUDr. Mariana Mrázová, PhD., MHA; MUDr. Mária Murgašová; Ing. Jana Netriová, PhD., MPH; Mgr. Renáta Popundová; MUDr. Ladislav Šinkovič, PhD., MBA; prof. MUDr. Mária Šustrová, CSc.; MUDr. Martin Vochyan; MUDr. Andrej Zlatoš; prof. MUDr. Jozef Šuvada, PhD., MPH

Technická a administratívna podpora

Podpora vývoja a administrácia: Ing. Peter Čvapek, Ing. Barbora Vallová; Mgr. Ľudmila Eisnerová; Mgr. Mário Fraňo; JUDr. Marcela Virágová, MBA; Ing. Marek Matto; prof. PaedDr., PhDr. Pavol Tománek, PhD., MHA; JUDr. Ing. Zsolt Mánya, PhD., MHA; Mgr. Sabína Brédová; Ing. Mgr. Liliana Húsková; Ing. Zuzana Poláková; Mgr. Tomáš Horváth; Ing. Martin Malina; Ing. Vladislava Konečná; Ing. Katarína Krkošková; Mgr. Miroslav Hečko; Mgr. Anton Moises; PhDr. Dominik Procházka; Ing. Andrej Bóka

Podporené grantom z OP Ľudské zdroje MPSVR SR NFP s názvom: „Tvorba nových a inovovaných štandardných klinických postupov a ich zavedenie do medicínskej praxe” (kód NFP312041J193).

Kľúčové slová

Akútna myeloblastová leukémia, genetická diagnostika, genetické prognostické markery, WHO klasifikácia, hereditárna predispozícia k malignitám.

Zoznam skratiek a vymedzenie základných pojmov

AML	akútna myeloidná leukémia
APL	akútna promyelocytová leukémia
ATRA	all-trans retinová kyselina
bphs	počet prúžkov (bandov) na haploidný stav, z angl. <i>bands per haploid set</i>
DNA	deoxyribonukleová kyselina
E.C.A.	európska cytogenetická asociácia, z ang. <i>European Cytogeneticists Association</i>
EDTA	kyselina etyléndiamíntetraoctová – antikoagulant
ELN	z ang. <i>European LeukemiaNet</i>
FISH	fluorescenčná <i>in situ</i> hybridizácia
FLT3-ITD	interná tandemová duplikácia v géne <i>FLT3</i>
FLT3-TKD	mutácia tyrozínkinázovej domény génu <i>FLT3</i>
HSCT	transplantácia krvotvorných buniek, z ang. <i>Haematopoietic stem cell transplantation</i>
ISCN	medzinárodná cytogenetická nomenklatúra, z angl. <i>An International System for Human Cytogenetic Nomenclature</i>
KD	kostná dreň
KMT2A-PTD	parciálna tandemová duplikácia v géne <i>KMT2A</i>
MFC	viacfarebná prietoková cytometria, z ang. <i>mass flow cytometrie</i>
MKCH	medzinárodná klasifikácia chorôb
ml	mililiter
MRD	minimálne reziduálne ochorenie, z ang. <i>minimal residual disease</i>
PCR	polymerázová reťazová reakcia, z ang. <i>polymerase chain reaction</i>
PK	periférna krv
RNA	ribonukleová kyselina
RT-PCR	reverzná transkripčná polymerázová reťazová reakcia, z ang. <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>
RT-qPCR	kvantitatívna reverzná transkripčná polymerázová reťazová reakcia, z ang. <i>reverse transcription quantitative polymerase chain reaction</i>
WBC	biele krvinky, z ang. <i>white blood cells</i>
WHO	medzinárodná zdravotnícka organizácia

Zhrnutie a odôvodnenie štandardu

Tento diagnosticko-laboratórny štandard slúži ako odborné usmernenie a upravuje základné pravidlá genetickej diagnostiky akútnej myeloidnej leukémie (AML).

Kompetencie indikácie

Indikovať genetické vyšetrenia v prípade akútnej myeloidnej leukémie je oprávnený:

- lekár so špecializáciou v odbore hematológia a transfuziológia¹,
- lekár so špecializáciou v odbore klinická onkológia¹.

V rámci diferenciálnej diagnostiky pre potreby overenia genetického nálezu a tým potvrdenia/ vylúčenia vrodenej predispozície k nádorovému ochoreniu (vid'. 14. Doplnkové otázky manažmentu pacienta“):

- lekár so špecializáciou v odbore lekárska genetika¹.

Kompetencie realizovania testovania

Genetickú diagnostiku akútnej myeloidnej leukémie môže vykonávať len špecializované diagnostické pracovisko s oprávnením pre diagnostiku v onkologickej genetike-dbornosť lekárska genetika¹.

Personál pracoviska/laboratória, ktorý vykonáva genetickú diagnostiku biologických vzoriek, zahŕňa nasledovných odborných zdravotných pracovníkov:

1. *oprávnených vykonávať vyšetrenia a diagnostické testy:*

- laboratórny diagnostik špecialista² = laboratórny diagnostik so špecializáciou v odbore laboratórne a diagnostické metódy v klinickej genetike³, alebo rovnocenným uznaným odborným vzdelaním nadobudnutým mimo územia SR,
- laboratórny diagnostik⁴ v špecializačnej príprave vyššie uvedeného odboru pod dohľadom laboratórneho diagnostika špecialistu,
- zdravotnícky laborant so špecializáciou⁵ v špecializačnom odbore laboratórne a diagnostické metódy v klinickej genetike⁶,
- zdravotnícky laborant⁷ bez špecializácie pod dohľadom zdravotníckeho laboranta alebo laboratórneho diagnostika so špecializáciou.

2. *interpretovať a vydávať výsledky testov:*

- lekár so špecializáciou v odbore lekárska genetika¹,
- laboratórny diagnostik so špecializáciou v odbore laboratórne a diagnostické metódy v klinickej genetike³.

-
1. MU č. 1/3/2007 Kódy lekárov a poskytovateľov zdravotnej starostlivosti. In: *Vestník úradu pre dohľad nad zdravotnou starostlivosťou číslo 1/2008-marec 2008*, [online]. [cit. 2019-01-30]. URL: http://www.udzs-sk.sk/documents/14214/18168/vestnik_01_08.pdf/cd63e016-897b-4d3b-ae66-628c7af517bd.
 2. § 20 nariadenia vlády SR č. 513/2011 Z. z. o používaní profesijných titulov a ich skratiek viažucich sa na odbornú spôsobilosť na výkon zdravotníckeho povolania.
 3. § 65 ods. 2 a Príloha č. 3 časť S písm. a) bod 3 k nariadeniu vlády SR č. 296/2010 Z. z. o odbornej spôsobilosti na výkon zdravotníckeho povolania, spôsobe ďalšieho vzdelávania zdravotníckych pracovníkov, sústave špecializačných odborov a sústave certifikovaných pracovných činností v znení neskorších predpisov.

4. § 65 ods. 1 nariadenia vlády SR č. 296/2010 Z. z. o odbornej spôsobilosti na výkon zdravotníckeho povolania, spôsobe ďalšieho vzdelávania zdravotníckych pracovníkov, sústave špecializačných odborov a sústave certifikovaných pracovných činností v znení neskorších predpisov.
5. § 10 nariadenia vlády SR č. 513/2011 Z. z. o používaní profesijných titulov a ich skratiek viažucich sa na odbornú spôsobilosť na výkon zdravotníckeho povolania.
6. § 23 ods. 2 a Príloha č. 3 časť H písm. a) bod 5 k nariadeniu vlády SR č. 296/2010 Z. z. o odbornej spôsobilosti na výkon zdravotníckeho povolania, spôsobe ďalšieho vzdelávania zdravotníckych pracovníkov, sústave špecializačných odborov a sústave certifikovaných pracovných činností v znení neskorších predpisov.
7. § 23 ods. 1 nariadenia vlády SR č. 296/2010 Z. z. o odbornej spôsobilosti na výkon zdravotníckeho povolania, spôsobe ďalšieho vzdelávania zdravotníckych pracovníkov, sústave špecializačných odborov a sústave certifikovaných pracovných činností v znení neskorších predpisov.


Úvod

Akútna myeloblastová leukémia (AML), najčastejšia forma akútnej leukémie u dospelých, je heterogénna hematologická malignita charakterizovaná klonálnou expanziou myeloidných blastov v periférnej krvi, kostnej dreni a/alebo iných tkanivách. Medián veku v čase diagnózy je podľa štatistických údajov SEER 67 rokov, pričom tretina prípadov je diagnostikovaných vo veku ≥ 75 rokov (NCCN AML v.2.2020).

Pôvodný model leukemogenézy podľa Gilianda z r. 2001 zodpovedá hypotéze dvoch zásahov a zahŕňa dve triedy genetických mutácií; aby sa leukémia rozvinula, mutácie triedy I. musia vzniknúť spoločne s mutáciami triedy II. Mutácie triedy I. predstavujú pre bunky proliferačnú výhodu – patria sem napríklad mutácie génov FLT3, K/NRAS, TP53 a c-KIT (prítomné v 28%, 12%, 8%, resp. 4% prípadov AML). Mutácie triedy II. narúšajú normálnu hematopoetickú diferenciaciu – patria sem zmeny génov NPM1 a CEBPA asociované s priaznivou prognózou (prítomné v 27%, resp. 6% AML) a tiež cytogenetické aberácie t(8;21), t(15;17) a inv(16)/t(16;16) generujúce fúzne transkripty RUNX1/RUNX1T1, PML/RARA, resp. CBF β /MYH. Zmeny génov, ktoré sú súčasťou epigenetickej regulácie predstavujú podľa najnovších výskumov tretiu triedu mutácií (napr. mutácie génov asociovaných s metyláciou DNA: DNMT3A, TET2 a IDH-1/2 – prítomné vo viac ako 40% prípadov AML).


Mnohé cytogenetické aberácie/genetické mutácie majú prognostický význam a môžu usmerniť terapiu a manažment pacientov. Význam týchto genetických zmien reflektuje aj klasifikácia AML podľa WHO, ktorej aktuálna verzia obsahuje 11 podtypov AML s rekurentnými genetickými aberáciami (Tabuľka č. 1.).

Tabuľka č. 1: Klasifikácia AML s rekurentnými genetickými aberáciami podľa WHO

 Klasifikácia AML s rekurentnými genetickými aberáciami podľa WHO
Akútna myeloidná leukémia s rekurentnými genetickými aberáciami
AML s t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1 AML s inv(16)(p13.1q22) alebo t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11 APL s PML-RARA AML s t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A AML s t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214 AML s inv(3)(q21.3q26.2) alebo t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM AML (megakaryoblastická) s t(1;22)(p13.3;q13.3); RBM15-MKL1 AML s mutáciou NPM1 AML s bialelickou mutáciou CEBPA Provizórna entita: AML s mutáciou RUNX1 Provizórna entita: AML s BCR-ABL1

Táto revidovaná klasifikácia myeloidných malignít z roku 2016 obsahuje (po prvýkrát) aj samostatnú kategóriu myeloidných malignít asociovaných s hereditárnou predispozíciou (Tabuľka č. 2). Genetickej diagnostike tejto skupiny dedične podmienených ochorení sa venuje časť 14. Doplňkové otázky manažmentu pacienta“.

Tabuľka č. 2: Myeloidné neoplázie asociované s hereditárnou predispozíciou

 Myeloidné neoplázie asociované s hereditárnou predispozíciou
Myeloidné neoplázie (MN) asociované s hereditárnou predispozíciou
Predispozícia k MN bez sprievodných ochorení / orgánovej dysfunkcie AML so zárodočnou mutáciou CEBPA MN so zárodočnou mutáciou DDX41* Predispozícia k MN asociovaná s trombocytopatiou MN so zárodočnou mutáciou RUNX1* MN so zárodočnou mutáciou ETV6* MN so zárodočnou mutáciou ANKRD26* Predispozícia k MN s orgánovou dysfunkciou MN so zárodočnou mutáciou GATA2 MN asociované so syndrómami zlyhania kostnej drene MN asociované s poruchami biológie telomér JMML asociovaná s Noonan- / Noonan-like syndrómom a neurofibromatózou MN asociované s Downovým syndrómom*

* Je dokumentovaný aj výskyt lymfoidných malignít.

Klasifikácia testov

Konvenčná cytogenetika - karyotyp (G-průžkovanie)

Karyotypizácia sa vykonáva pomocou průžkovacích metód (průžkovanie), pričom štandardnou technikou pre detekciu chromozómových aberácií pri hematologických malignitách je průžkovanie pomocou Giemsovho roztoku – G-průžkovanie na úrovni minimálne 300 bphs – podľa E.C.A.

Cytogenetická analýza pri AML je významná z hľadiska stanovenia diagnózy, klasifikácie, prognostickej stratifikácie a nastavenia liečby – vid'. 10.1 Odôvodnenie testovania.

Najvhodnejším biologickým materiálom pre cytogenetické vyšetrenia pri akútnej myeloidnej leukémii je vzorka kostnej drene – kultivácia 24 hodín (KD 24h), prípadne 48 hodín (KD 48h). V prípade nedostatku alebo nízkej kvality vzorky KD je pre potreby dodiferencovania zmien aberantného karyotypu možné využiť aj vzorky 24-hodinovej kultivácie periférnej krvi (PK 24h) za predpokladu prítomnosti > 10% cirkulujúcich blastov.

Štandard: analýza 20 metafáz:

- aberantný karyotyp minimálne 10–15 metafáz,
 - klon: ≥ 2 bunky s rovnakým chromozómovým ziskom, resp. štruktúrnou zmenou,
 - klon: ≥ 3 bunky s rovnakou chromozómovou stratou (ISCN 2016),
- normálny karyotyp minimálne 15 metafáz.

Výsledok cytogenetického vyšetrenia AML by mal byť k dispozícii do 5-7 dní od prijatia vzorky.

Interfázová fluorescenčná in situ hybridizácia (FISH)

Na detekciu príslušných cytogenetických aberácií sa požívajú komerčne dostupné certifikované DNA sondy (resp. kity DNA sond). Druh, konštrukčný typ a postupnosť aplikácie DNA sondy sa volia podľa charakteru aberácie.

FISH pri AML slúži na rýchlu detekciu prítomnosti fúzných génov, ktoré vznikajú pri rekurentných cytogenetických translokáciách, prípadne na overenie a bližšiu identifikáciu nálezov konvenčného cytogenetického vyšetrenia.

Vzorka na FISH analýzu je totožná s materiálom na G-průžkovanie, t. j. štandardne KD 24h/KD 48h. V prípade potreby rýchlej informácie je možné využiť preparáty náterov, alebo preparáty priameho spracovania KD.

Štandard: analýza minimálne 100 interfázových neprekrývajúcich sa jadier hodnotených nezávisle dvomi laboratórnymi diagnostikmi.

Hraničné hodnoty pozitívneho výsledku (cut-off) má každé laboratórium stanovené na základe vlastných postupov a meraní s prihliadnutím na odporúčania výrobcov používaných DNA sond/kitov, prípadne na závery a dohovory odborných pracovných skupín.

Molekulová diagnostika

Molekulovo-genetická diagnostika u AML sa vykonáva z RNA a genomickej DNA (gDNA) izolovanej preferenčne zo vzorky kostnej dreve odobratej do skúmaviek s EDTA (v prípade nedostatku vzorky KD je možné použiť vzorku PK). Vstupné molekulárno-genetické vyšetrenie u novo diagnostikovaného ochorenia je zamerané na skríning molekulárnych markerov asociovaných s ochorením a jeho prognózou. Uvedená analýza v čase diagnózy zahŕňa:


1. Analýzu prestavieb a fúzných génov asociovaných s AML, metódou PCR využitím reverznej transkripcie RNA (RT-PCR). Primárne sa jedná o analýzu prestavieb RUNX1-RUNX1T1, BCR-ABL1, CBFB-MYH11, PML-RARA a KMT2A prestavby (minimálne MLLT3-KMT2A), vrátane parciálnej tandemovej duplikácie v géne KMT2A (KMT2A-PTD).
2. Analýzu mutačného statusu génu FLT3 vzhľadom k prítomnosti internej tandemovej duplikácie (FLT3-ITD) a mutácií v tyrozín-kinázovej doméne, konkrétne v kodónoch D835 a I836 (FLT3-TKD). Výsledok uvedenej analýzy musí zahŕňať aj údaj o alelickej záťaži identifikovanej mutácie (pomer mutovanej a nemutovanej alely). Štandardným metodickým postupom býva fluorescenčná PCR s následnou fragmentovou analýzou alebo real-time PCR. Je však možné využiť aj iné metódy umožňujúce spoľahlivo určiť alelickú záťaž ako je napríklad metóda masívne paralelného sekvenovania.
3. Analýzu mutácií v ďalších génoch okrem FLT3, a to primárne v génoch NPM1, RUNX1, TP53, ASXL1, CEBPA a KIT.

Výsledky mutácie NPM1 a FLT3 by mali byť k dispozícii v priebehu 48 až 72 hodín (aspoň u pacientov vhodných na intenzívnu chemoterapiu) a výsledky molekulárnej genetiky v rámci prvého liečebného cyklu. Skríning genetických mutácií je vyvíjajúcou sa oblasťou výskumu; skríning jednotlivých génov môže byť nahradený diagnostikou genových panelov.

Molekulovo-genetická diagnostika u AML taktiež zahŕňa aj monitorovanie minimálneho reziduálneho ochorenia (MRD) v priebehu liečby, preferenčne analýzou vzorky kostnej dreve (KD) v súlade s odporúčaniami „The European LeukemiaNet MRD Working Party“. Štandardne sa pri tejto analýze využíva metóda kvantitatívnej RT-PCR (RT-qPCR), a to hlavne v prípade fúzných génov a vybraných mutácií. Ako markery pre sledovanie MRD sa odporúčajú:

1. Prestavby RUNX1-RUNX1T1, BCR-ABL1, CBFB-MYH11, PML-RARA a KMT2A, ako samostatné MRD markery.
2. Ako samostatný MRD marker je možné tiež použiť mutáciu v géne NPM1.
3. Mutácie v génoch FLT3-ITD, FLT3-TKD, KMT2A-PTD, RUNX1, TP53, ASXL1, CEBPA, KIT, NRAS, KRAS, DNMT3A, IDH1 a IDH2 sa neodporúčajú používať ako samostatné markery MRD kvôli nestabilite mutácií v priebehu liečby, respektíve vývoja ochorenia. Môžu sa použiť prípadne ako sekundárne markery v kombinácii s vyššie uvedenými prestavbami alebo mutáciami NPM1.

Tabuľka č. 3: Proces diagnostiky – odporúčania (minimálny štandard)

 Proces diagnostiky – odporúčania (minimálny štandard)	
Štádium ochorenia	Diagnostický panel
Čas diagnózy / vstupné vyšetrenie	<p>- Karyotyp – identifikácia cytogenetických aberácií^[A]: <i>nevyvážené: del5q/-5, del7q/-7, del17p</i> <i>vyvážené rekurentné: inv(3)/t(3;3), t(6;9), t(8;21), t(9;11)/t(11;x)</i> t(9;22), t(15;17), inv(16)/t(16;16) <i>Metodika: konvenčná cytogenetika – G-prúžkovanie z KD^[B]</i></p> <p>- fúzne gény^[C] + transkripty uvedených fúznych génov^[C] <i>pri APL: PML-RARA, resp. prestavba RARA^[D]</i> RUNX1-RUNX1T1, KMT2A(MLL) prestavby^[E], BCR-ABL1, CBFB-MYH11, MECOM, DEK-NUP214 <i>Metodika: FISH, RT-PCR</i></p> <p>- mutácie génov: FLT3^{ITD,TKD} + alelická záťaž, NPM1, RUNX1, TP53, ASXL1, CEBPA, KIT, KMT2A-PTD^[F] <i>Metodika: sekvenčná analýza (metódou „Sangerovej“ sekvenácie alebo masívne paralelného sekvenovania). Pri analýze niektorých mutácií (FLT3^{ITD,TKD}, KMT2A-PTD a delečno inzerčné mutácie NPM1) sa dopĺňajú ďalšie techniky PCR techniky.^[F]</i></p>
Remisia / Sledovanie dynamiky ochorenia / minimálne reziduálne ochorenie	<p>- sledovanie pomocou multiparametrovej prietokovej cytometrie (MFC)^[G]. <i>znaky: CD17, CD11b, CD13, CD15, D19, CD33, CD34, CD45, CD56, CD117, HLA-DR^[H]</i> <i>Odporúčaná hranica pozitivity / negativity MRD: 0,1%^[I]</i></p> <p>- sledovanie molekulovou analýzou - transkripty fúznych génov a mutácií génu NPM1 cez RT-qPCR^[J] <i>Odporúčaná senzitivita MRD analýzy: 10⁻⁴^[J]</i></p> <p>Klinické odporúčania pre sledovanie MRD – vid'. Špeciálny doplnok štandardu</p>
Progresia / relaps / transformácia	<p>- karyotyp - markery z času diagnózy cytogenetické → FISH fúzne gény → PCR - mutácie génov: obdobne ako v čase diagnózy</p>

Prevzaté a modifikované.

1. Pre stratifikáciu rizika pacientov s AML je potrebné komplexné cytogenetické vyšetrenie. WHO - klasifikácia obsahuje osem vyvážených translokácií a inverzií zahrnutých v kategórii „AML s rekurentnými abnormalitami“ a deväť vyvážených zmien s mnohými nevyváženými pre kategóriu „AML s myelodysplastickými zmenami“ – ak je v kostnej dreni $\geq 20\%$ blastov.
2. Na cytogenetické vyšetrenie je možné použiť aj vzorku periférnej krvi v prípade, ak obsahuje $> 10\%$ cirkulujúcich blastov.

3. Skrining génových prestavieb a fúznych génov je dôležité zrealizovať v čo najkratšom čase ak je potrebná rýchla informácia o odporúčaní vhodnej liečby, ak je znížená kvalita analýzy G-bandu, alebo ak existuje typická morfológia, ale neexistuje podozrenie na cytogenetickú abnormalitu. V závislosti od výsledkov cytogenetických analýz sa následne vykoná analýza fúznych identifikovaných cytogenetickými technikami, minimálne v rozsahu *RUNX1-RUNX1T1*, *BCR-ABL1*, *CBFB-MYH11*, *PML-RARA* a *MLLT3-KMT2A*. Vzhľadom k vyššie popísanému je možné molekulárnu analýzu uvedených základných transkriptov fúznych génov vykonať aj paralelne s cytogenetickými analýzami. Molekulárna analýza uvedených transkriptov fúznych génov sa metódou RT-PCR vykonáva podľa postupov vytvorených v rámci „BIOMED-1 Concerted Action“ pre detekciu zostatkového ochorenia u leukémií.
4. Okrem génu *PML* (15q22) môže gén *RARA*(17q21) tvoriť fúzne gény aj s ďalšími: *ZBTB16-RARA* = t(11;17)(q13;q21), *NUMA1-RARA* = t(11;17)(q13;q21), *NPM1-RARA* = t(5;17)(q35;q21), *STAT5B-RARA* = t(17;17)(q21;q21)/dup(17)(q21q21) – cytogeneticky kryptická zmena.
5. Ďalšie fúzne gény s *KMT2A(MLL)* okrem *MLLT3-KMT2A* = t(9;11)(q21.3;q23.3): *MLLT4-KMT2A* = t(6;11)(q27;q23.3), *KMT2A-MLLT1* = t(11;19)(q23.3;p13.3), *KMT2A-ELL* = t(11;19)(q23.3;p13.1), *MLLT10-KMT2A* = t(10;11)(p12;q23,3).
6. Sekvenačná analýza mutácií jednotlivých prognosticky významných génov sa riadi pravidlami pracovných skupín „The European LeukemiaNet“, „British Society for Genetic Medicine“, „American College of Medical Genetics and Genomics“, „American Society of Clinical Oncology“ a „College of American pathologists“, pričom sa štandardne dosahuje senzitivita na úrovni minimálne 5% VAF (frekvencia variantnej alely) pri použití metódy masívne paralelného sekvenovania a maximálne 10% VAF pri štandardnom „Sangerovom“ sekvenovaní. Analýza mutácií *FLT3^{ITD,TKD}*, *KMT2A-PTD* a delečno inzerčné mutácie *NPM1* sa štandardne dopĺňa ďalšími PCR technikami ako sú analýzy metódou real-time PCR a fragmentové analýzy DNA. Alelická záťaž pri stanovení mutácií *FLT3* sa určuje semikvantitatívnym hodnotením (pomocou analýzy fragmentov DNA) alelického pomeru „mutovaného *FLT3*“ (mut.) ku „nemutovanému *FLT3*“ (wild type). Nízky alelický pomer má hodnotu < 0,5 a vysoký alelický pomer ≥ 0,5. AML s mutáciou *NPM1* a nízkym alelickým pomerom *FLT3-ITD* môže mať aj priaznivejšiu prognózu a pacienti by nemali byť rutinne priradení k alogénnej HSCT.
7. Aspirovať 5-10 ml KD a použiť prvú vzorku. Zhodnotiť kontamináciu s PK: > 90% zreých neutrofilov prítomných vo vzorke KD je znakom hemodilúcie. Vyšetriť objem 500 000–1 000 000 WBC s vylúčením buniek CD45-a degradovaných elementov. Vzhľadom na nízky záchyt MRD v PK by sa v súčasnosti PK nemala používať.


8. Ak je potrebné, doplniť monocytový panel obsahujúci: CD64/CD11b/CD14/CD4/CD34/HLA-DR/CD33/CD45.
9. Ak sa potvrdí jasná MRD < 0,1%, zhodnotiť to ako „MRD-pozitivita < 0,1%“, čo je konzistentné s reziduálnou leukémiou. Môže sa dodať „táto hranica nebola klinicky validovaná“, alternatívne možno hovoriť o „MFC-MRD detegovateľnej a kvantifikovateľnej, neurčitého významu“.
10. Pre monitorovanie MRD molekulovou analýzou sa preferenčne používa vzorka KD (prípadne PK) s antikoagulantom EDTA. Pri molekulárno-genetickom monitorovaní MRD s využitím transkriptov fúzných génov *RUNX1-RUNX1T1*, *BCR-ABL1*, *CBFB-MYH11*, *PML-RARA* a *MLLT3-KMT2A* sa postupuje podľa odporúčaní „A Europe Against Cancer Program“ pre detekciu zostatkového ochorenia u leukémií metódou RT-qPCR. Pri monitorovaní MRD s využitím delečno-inzerčných mutácií génu *NPM1* sa postupuje v súlade s vyššie pravidlami popísanými pre monitorovanie transkriptov fúzných génov.

1. Odôvodnenie testovania

Dôvodom na indikáciu vyšetrenia je:

- zaradenie do podskupín podľa WHO klasifikácie,
- prognostická stratifikácia,
- voľba terapie,
- indikácia transplantácie krvotvorných buniek,
- diagnostika hereditárnej predispozície k (myeloidným) malignitám.

Tabuľka č. 4: Stratifikácia rizika na základe genetických zmien

 Stratifikácia rizika na základe genetických zmien	
Kategória rizika	Genetická abnormalita
Priaznivá	<ul style="list-style-type: none"> - t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> - inv(16)(p13.1q22) alebo t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> - Mutácia <i>NPM1</i> bez <i>FLT3-ITD</i> alebo s <i>FLT3-ITD</i>^{low†} - Bialeická mutácia <i>CEBPA</i>
Intermediárna	<ul style="list-style-type: none"> - Mutácia <i>NPM1</i> a <i>FLT3-ITD</i>^{high†} - Wild-type <i>NPM1</i> bez <i>FLT3-ITD</i> alebo s <i>FLT3-ITD</i>^{low†} (bez nepriaznivých genetických zmien) - t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i>‡ - Cytogenetické abnormality neklasifikované, ako priaznivé alebo nepriaznivé
Nepriaznivá	<ul style="list-style-type: none"> - t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i> - t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> prestavba - t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> - inv(3)(q21.3q26.2) alebo t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2,MECOM(EVII)</i> - -5 alebo del(5q); -7; -17/abn(17p) - Komplexný karyotyp,§ monosomálny karyotyp - Wild-type <i>NPM1</i> a <i>FLT3-ITD</i>^{high†} - Mutácia <i>RUNX1</i> { - Mutácia <i>ASXL1</i> { - Mutácia <i>TP53</i>#

† nízky alelický pomer má hodnotu < 0,5 a vysoký alelický pomer ≥ 0,5,

‡ prítomnosť t(9;11)(p21.3;q23.3) má „prednosť“ pred inými, raritnými zmenami s nepriaznivou prognózou,

§ tri a viac nepříbuzných chromozómových abnormalít pri chýbaní jednej z rekurentných translokácie alebo inverzií podľa WHO: t(8;21), inv(16) alebo t(16;16), t(9;11), t(v;11)(v;q23.3), t(6;9), inv(3) alebo t(3;3); AML s *BCR-ABL1*,

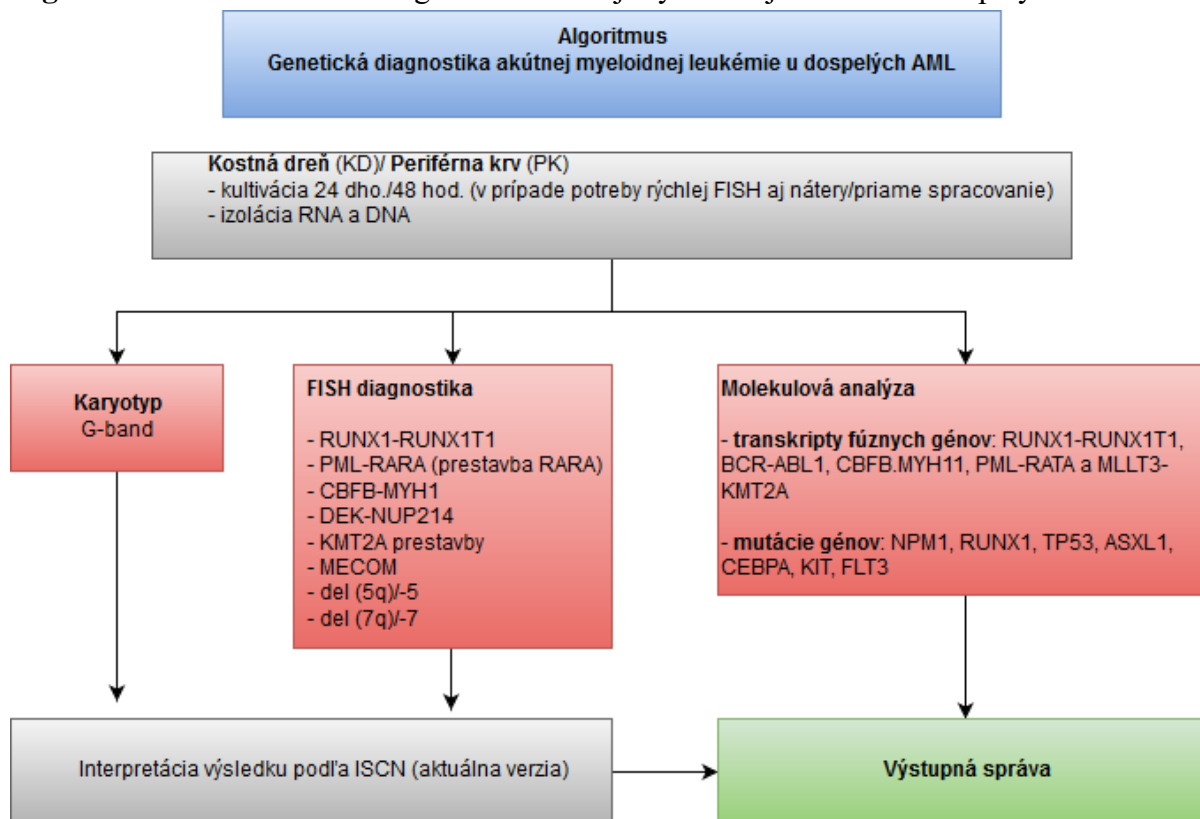
|| definovaný prítomnosťou 1 samostatnej monozómie (neráta sa strata X alebo Y) a súčasne aspoň jednej prídavnej monozómie alebo štruktúrálnej chromozómovej abnormality (neráta sa jadro-viažuci faktor „core-binding factor“ AML),

{ tento marker sa nepovažuje za nepriaznivý, ak sa vyskytuje pri AML s priaznivým rizikom,

významne sa spája s AML s komplexným a monozomálnym karyotypom.

2. Laboratórny algoritmus

Algoritmus č. 1: Genetická diagnostika akútnej myeloidnej leukémie u dospelých AML



Zdroj: autori štandardu.

3. Dokumentácia a oznamovanie výsledkov

Dokumentáciu pacienta vrátane kompletnej anamnézy je možné viesť vo fyzickej (papierovej) a/alebo elektronickej forme. Vedie sa v zmysle zákona č. 576/2004 Z. z. o zdravotnej starostlivosti. Organizácia musí zabezpečiť, aby pracovníci prichádzajúci do styku s laboratórnou dokumentáciou pacientov boli dostatočne poučení a zaškolení o jej používaní a riadili sa osobitnými predpismi podľa zákona č. 18/2018 Z. z. o ochrane osobných údajov ako aj Všeobecným nariadením o ochrane osobných údajov – GDPR.¹ Každý, komu sa poskytnú alebo sprístupnia údaje zo zdravotnej dokumentácie, je povinný zachovávať o nich mlčanlivosť a zabezpečiť ich ochranu tak, aby nedošlo k ich strate alebo zneužitiu.

¹Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (EÚ) 2016/679 z 27. apríla 2016 o ochrane fyzických osôb pri spracúvaní osobných údajov a o voľnom pohybe takýchto údajov, ktorým sa zrušuje smernica 95/46/ES (všeobecné nariadenie o ochrane údajov).

4. Minimálne materiálo-technické zabezpečenie:

- laminárny box, digester, PCR box, termostat, centrifúgy,
- mikroskopické zariadenie pre konvenčné karyotypovanie a FISH analýzu s automatickou analýzou obrazu a možnosťou jeho dokumentácie,
- elektroforetická aparátúra a fotodokumentačné zariadenie,

- zariadenie na stanovenie koncentrácie a purity DNA/ RNA,
- PCR termocyklér,
- real-time PCR termocyklér,
- genetický analyzátor.

5. Minimálne personálne zabezpečenie

Pracovisko vykonávajúce genetickú diagnostiku musí disponovať minimálne s nasledovným personálnym zabezpečením:

- kvalifikovaný laboratórny diagnostik (viď. bod 0.7),
- zdravotnícky laborant.

Interpretácia výsledkov

Výsledky genetických analýz sú interpretované v zmysle pravidiel interpretácie výstupov jednotlivých metodík:

1. **Konvenčná cytogenetika a FISH** – podľa pravidiel aktuálnej verzie medzinárodnej cytogenetickej nomenklatúry ISCN (An International System for Human Cytogenetic Nomenclature).
2. **Molekulárna diagnostika**
 - Výsledky kvalitatívnej analýzy fúzných génov sa vyhodnocujú a interpretujú v súlade s odporúčaniami „BIOMED-1 Concerted Action“ pre detekciu zostatkového ochorenia u leukémií metódou RT-PCR.
 - Výsledky kvantitatívnej analýzy fúzných génov sa vyhodnocujú a interpretujú v súlade s odporúčaniami „A Europe Against Cancer Program“ pre detekciu zostatkového ochorenia u leukémií metódou RT-qPCR.
 - Výsledky analýzy variantov génov sekvenačnými metódami sa interpretujú a vyhodnocujú v súlade s odporúčaniami „British Society for Genetic Medicine“, „American College of Medical Genetics and Genomics“, „American Society of Clinical Oncology“ a „College of American pathologists“. Nomenclatúr zápisu identifikovaných variantov sa riadi pravidlami „Human Genome Variation Society“.

Interpretácia zahŕňa aj slovné hodnotenie nálezu a záverečné zhrnutie s prípadným dopadom pre pacienta.

Výstupná správa z genetického vyšetrenia musí obsahovať:

- identifikačné údaje pacienta (meno, priezvisko, rodné číslo, ID číslo – v prípade hospitalizácie, údaje o zdravotnom poistení, diagnóza – slovne aj kódom MKCH),
- identifikačné údaje o vyšetrovanej vzorke (druh a dátum prijatia biologického materiálu, forma sekundárnej vzorky – napr. DNA, RNA, KD 24...),
- použité metodiky genetického testovania, použité referenčné sekvencie analyzovaných génov, použité genetické databázy a softvérové nástroje,
- výsledky analýz,

- záver z genetického vyšetrenia vo forme slovného hodnotenia klinického významu identifikovaných genetických zmien,
- mená a podpisy zodpovedných osôb.

Odhadované náklady

Agregovaný výkon

Mali by byť zohľadnené náklady na materiálne a prístrojové vybavenie genetického laboratória, diagnostiká a chémiu, výpočtovú techniku, prevádzkové náklady (energie) a mzdy laboratórných pracovníkov.

Doplnkové otázky manažmentu pacienta

Hereditárna predispozícia k myeloidným malignitám

Myeloidné malignity vrátane AML môžu vzniknúť v kontexte vrodenej predispozície k onkologickým ochoreniam. Spektrum monogénových onkogenetických syndrómov, ktoré zahŕňajú aj hematologické malignity, sa vďaka rapídному rozvoju genomických vyšetrovacích metód postupne rozširuje. Včasné rozpoznanie týchto vrodených chýb je klinicky relevantné z viacerých dôvodov:

- Pacienti môžu vyžadovať špecifickú observáciu zameranú na závažné, nehematologické komplikácie, resp. ďalšie hematologické malignity, nezriedka reagujú zle na imunosupresívnu liečbu, a v prípade zvažovania transplantácie krvotvorných buniek (TKB) môže byť potrebná redukcia intenzity myeloablatívneho režimu (NCCN MDS v.1.2020).
- V prípade TKB od príbuzného darcu, ktorý je nositeľom nerozpoznannej patogénnej genetickej zmeny hrozia závažné, potenciálne fatálne komplikácie.
- Zistenie predispozície k malignitám je významná aj pre pokrvné príbuzenstvo pacienta – umožňuje identifikáciu asymptomatických členov rodiny, ktorí môžu profitovať z preventívnych opatrení, zároveň otvára možnosť predimplantačnej genetickej diagnostiky pri plánovaní gravidity.

Vyšetreniam zameraným na onkogenetické syndrómy musí vždy predchádzať konzultácia s lekárskeým genetikom, počas ktorej je pacientovi/príbuzným zrozumiteľne vysvetlený charakter vrodených genetických porúch vrátane základných pojmov, ktoré sa týkajú heritability a taktiež výhody, nevýhody, významu a priebehu testovania. Pacient/zákonný zástupca, resp. príbuzní majú právo tieto vyšetrenia odmietnuť, preto je veľmi dôležitou úlohou klinického genetika dôkladné vysvetlenie možných rizík spojených s takýmto rozhodnutím.

Genetická konzultácia zahŕňa tiež podrobnú osobnú anamnézu a fyzikálne vyšetrenie, genealogickú analýzu (ideálny je aspoň trojgeneračný rodokmeň), podpísanie informovaného súhlasu s vyšetrením a následný odber biologického materiálu. Po ukončení analýzy nasleduje opätovná konzultácia a lekárskeý genetik vypracuje záverečnú správu s odporúčaniami. Vzhľadom na to, že odporúčaný manažment pri onkogenetických

syndrómoch je pravidelne revidovaný, resp. mnohé syndrómy a ich klinický prejav sú predmetom výskumov, je vhodné genetickú konzultáciu s istým časovým odstupom zopakovať (aktualizácia anamnézy, úprava odporúčaní, ak je potrebná).

Syndrómy/zárodočné mutácie predisponujúce k myeloidným malignitám sú veľmi heterogénne v zmysle expresivity, nie vždy je prítomná sugestívna rodinná anamnéza, ani iné, charakteristické sprievodné znaky/ochorenia (faciálna stigmatizácia, skeletálne deformity, kožné prejavy, zlyhanie kostnej drene, trombocytopenie...) v diagnostike je preto vhodné uprednostniť rozšírený panel relevantných génov pred sekvenčným vyšetrením, pokiaľ anamnestické údaje nie sú dostatočne špecifické.

Analýza kostnej drene/periférnej krvi v rámci diagnostiky somatických zmien môže odhaliť zárodočnú (germinálnu) mutáciu – rozlíšenie somatickej zmeny od germinálnej si v tomto prípade vyžaduje analýzu z nehematopoetického tkaniva. Za zlatý štandard sa považuje analýza DNA z kožných fibroblastov po predchádzajúcej kultivácii (NCCN MDS v.1.2020), alternatívne (najmä v časovej tiesni) je akceptovateľná vzorka steru z bukálnej sliznice, výsledok vyšetrenia sa však odporúča dodatočne overiť zo vzorky kultivovaných fibroblastov.

Hereditárne syndrómy predisponujúce k MDS/AML môžeme rozdeliť do 4 základných kategórii:

1. ochorenia asociované s numerickými chromozomálnymi anomáliami (napr. Downov syndróm),
2. klasické hereditárne syndrómy zlyhania kostnej drene (Fanconiho anémia, Dyskeratosis congenita...),
3. ďalšie syndromické predispozície k malignitám (Li-Fraumeni syndróm, Bloom syndróm...),
4. novo opísané, familiárne formy MDS/AML (GATA2-haploinsuficiencia, RUNX1-asociovaná trombocytopenia...). Detailný popis týchto ochorení presahuje rámec tohto štandardu – odkazujeme na aktuálnu smernicu National Comprehensive Cancer Network k MDS (NCCN MDS v.1.2020) a smernice Americkej hematologickej spoločnosti k diagnostike a manažmente hereditárnych hematologických malignít.

Súhrnné odporúčania – ***kedy je vhodná genetická konzultácia*** (upravené podľa NCCN MDS v.1.2020):

- rodiny s ≥ 2 príbuznými s MDS/AML/CML/CMML/MPN v jednej príbuzenskej línii (prvo-alebo druhostupňové príbuzenstvo),
- rodiny s výskytom MDS/AML a/alebo cytopéniami/aplastickou anémiou neznámej etiológie,
- rodiny s výskytom nádorov mozgu, premenopauzálnym karcinómom prsníka, sarkómami, adrenokortikálnym karcinómom, karcinómom choroideálneho plexu, hematologickými malignitami vrátane MDS/AML/ALL (Li-Fraumeni syndróm),

- pacienti/rodiny s výskytom MDS/AML s príznakmi/orgánovou dysfunkciou, ktoré môže naznačovať hereditárnu záťaž, napr.:
 - atypické mikobakteriálne infekcie, recidivujúce infekcie HPV/HSV, autoimunitné prejavy, bradavice, senzorineurálna hluchota, primárny lymfedém, pľúcna alveolárna proteínóza (GATA2),
 - predčasné šedivenie vlasov, poruchy pigmentácie kože, dystrofické nechty, fibróza pečene, pľúcna fibróza/emfyzém, karcinóm kože, hlavy, krku a anogenitálnej oblasti v mladom veku (syndrómy poruchy biológie telomér),
 - nízky vzrast, mikrocefália, skeletálne malformácie, poruchy pigmentácie kože, vrodené vývojové chyby obličiek a srdca, karcinóm kože, hlavy, krku a anogenitálnej oblasti v mladom veku, nádory pečene (Fanconiho anémia),
 - insuficiencia pankreasu, skeletálne abnormality (Shwachman-Diamond syndróm),
 - makuly café-au-lait, nádory centrálného nervového systému, ALL, lymfómy, malignity tráviaceho traktu, mnohopočetné primárne malignity v detskom veku, mikrosatelitová nestabilita v nádorovom tkanive (konštitučný mismatch-repair deficit),
- nález nasledovných genetických zmien pri rutinnej diagnostike hematologickej malignity:
 - heterozygotnej alelickej mutácie vo frekvencii 50%, resp. bialelické mutácie génov asociovaných s hereditárnou predispozíciou, ako napr. CEBPA, RUNX1, DDX41...,
 - patogénne mutácie GATA2.


Špeciálny doplnok štandardu

1. Význam a testovanie mutácií génu FLT3

FLT3 (fms-related tyrosine kinase 3–lokalizácia 13q12.2) je bunkový receptor s tyrozinkinázovou aktivitou patriaci do rovnakej skupiny receptorov ako je KIT alebo PDGFR. FLT3 proteín zohráva dôležitú úlohu v delení a diferenciácii myeloidných buniek. Najčastejšie mutácií génu FLT3 je interná tandemová duplikácia (FLT3-ITD), ktorá je preukazovaná u 20-30% prípadov AML. Mutácia vedie k trvalej aktivácii kinázovej domény FLT3 receptora a následnej poruche diferenciácie myeloidných buniek a ich leukemickej transformácii. Menej častou mutáciou génu FLT3 je bodová mutácia v aktivačnej slučke druhej tyrozinkinázové domény (FLT3-TKD) s výskytom 5-8% prípadov AML. Mutácie FLT3 sú asociované s vyšším počtom leukocytov, nižším po počtom trombocytov a zvýšeným zastúpením blastov v kostnej dreni v čase diagnózy. Mutácie FLT3 boli častejšie preukázané u akútnej monocytárnej leukémie (AML FAB M5), a to cca v 40% prípadov. Frekvencia mutácií je vyššia u AML bez cytogenetických abnormalít v porovnaní s AML s cytogenetickou abnormalitou. FLT3-ITD je tiež často asociovaná s t(6; 9) (88-90%) a KMT2A-PTD, v prípade FLT3-TKD bola identifikovaná spojitosť aj s CBFβ/MYH1. Pri mutáciách FLT3 bol preukázaný negatívny prognostický význam na celkové prežívanie pacientov (overall survival – OS), no do značnej miery to závisí od alelického pomeru mutovaného k nemutovanému génu FLT3 (a mutačného stavu génu


NPM1. FLT3–ITD je nestabilný prognostický faktor, ktorý sa v čase relapsu môže počtom duplikácií meniť od stavu v čase diagnózy.

Tabuľka č. 5: Klinické odporúčania na hodnotenie MRD podľa ELN 2017

 Klinické odporúčania na hodnotenie MRD podľa ELN 2017	
Monitoring MRD	MRD monitoring je považovaný za štandardnú starostlivosť o AML pacientov. Po dvoch rokoch observácie by mal byť monitoring založený na riziku relapsu pacienta a mal by sa posudzovať individuálne
Kompletná molekulová remisia CR _{MRD}	Odporúčania ELN 2017 definujú nové kritérium odpovede na liečbu v podobe kompletnej molekulovej remisie (CR _{MRD}) ako kompletnú morfológickú remisiu s dvomi po sebe idúcimi MRD negatívnymi vzorkami v intervale ≥ 4 týždne na úrovni citlivosti aspoň 1 v 1000. Negatívna MRD v prítomnosti blastov naznačuje molekulárnu stratu konkrétneho markera
MRD v rámci podtypov AML	Molekulovú MRD neposudzovať pri podtypoch AML iných ako APL (<i>PML-RARA</i>), AML s <i>RUNX1-RUNX1T1</i> , CBF AML (<i>CBFB-MYH11</i>) a <i>NPM1</i> mutovaná AML
	U AML pacientov, ktorí nie sú definovaní v predošlých skupinách, MRD sa má posudzovať pomocou MFC
MRD u APL	Pri APL je cieľovým bodom dosiahnutie PCR negativity <i>PML-RARA</i> na konci konsolidačnej liečby. U pacientov s fúziou <i>PML-RARA</i> a nízkym / intermediárnym rizikom podľa Sanza, ktorí sú liečení ATO+ATRA, by mala pokračovať MRD analýza, ak pacient nedosiahne CR _{MRD} v KD a potom sa má ukončiť
	Detegovateľné hladiny <i>PML-RARA</i> s PCR počas aktívnej liečby APL, by nemali meniť liečebný plán pacienta
	Zmena stavu <i>PML-RARA</i> s PCR z nedetegovateľnej na detegovateľnú a konfirmácia v opakovanej vzorke, by sa mala považovať za hroziaci relaps APL

Prevzaté a upravené.

Tabuľka č. 5: Klinické odporúčania na hodnotenie MRD podľa ELN 2017, pokračovanie

 Klinické odporúčania na hodnotenie MRD podľa ELN 2017 (pokračovanie)	
Sledovanie počas liečby	Pacienti s mutovaným <i>NPM1</i> , <i>RUNX-RUNX1T1</i> , <i>CBFB-MYH11</i> alebo <i>PML-RARA</i> , by mali mať molekulové hodnotenie MRD v pravidelných časových intervaloch počas liečby
	Odporúča sa hodnotiť MRD z KD + PK minimálne iniciálne pri diagnóze, po dvoch cykloch štandardnej indukcie / konsolidácie a na konci liečby.
	Pacienti s CBF AML , by mali mať iniciálne hodnotenie MRD po dvoch cykloch chemoterapie s nasledujúcimi meraniami každé tri mesiace, najmenej dva roky od ukončenia liečby
	Počas observácie pacientov s <i>PML-RARA</i> , <i>RUNX1-RUNX1T1</i> , <i>CBFB-MYH11</i> a ostatnými molekulovými markermi, odporúčame hodnotenie molekulovej MRD z KD a PK každé tri mesiace po dobu dvoch rokov po ukončení liečby. Alternatívne sa môže hodnotiť len PK každých 4 – 6 týždňov
	Zlyhanie dosiahnutia CR _{MRD} alebo vzostup hladín MRD počas liečby alebo po nej, sú spojené s relapsom ochorenia a horším prežívaním a malo by viesť k rýchlemu rozhodnutiu o zmene liečby.
Transplantácia	Hodnotiť MRD pred transplantáciou aj po transplantácii
Klinické štúdie	Všetky klinické štúdie by mali požadovať molekulové a/alebo MFC hodnotenie MRD v každom čase hodnotenia odpovede

Prevzaté a upravené.

2. Podmienky realizácie testovania mutácií *FLT3* génu

Pre zavedenie a realizáciu vyšetrení mutácií *FLT3* génu nie je potrebné ďalšie rozširovanie materiálo-technického zabezpečenie nad rámec definovaný v kapitole 10.4 Materiálo-technické zabezpečenie.

Odporúčania pre ďalší audit a revíziu štandardu

Odporúčaný pravidelný audit a revízia v intervale 2 roky. Indikátormi revízie sú:

- nové klinické poznatky a postupy v diagnostike AML,
- definovania nových genetických markerov s prognostickým/prediktívnym významom,
- nových účinnejších metodík a prístupov genetického testovania.

Literatúra

1. ARBER, DA.-ORAZI, A.-HASSERJIAN, R. – THIELE, J.-BOROVITZ, MJ.-LE BEAU, MM.-BLOOMFIELD, CD. – CAZZOLA, M.-VARDIMAN, JW.: The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia, Blood First Edition paper, April 11, 2016; DOI 10.1182/blood-2016-03-643544.
2. BABUSHOK, DV.-BESSLER, M.-OLSON, TS.: Genetic predisposition to myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia in children and young adults. Leuk Lymphoma. 2016;57(3):520-36. doi: 10.3109/10428194.2015.1115041. Epub 2015 Dec 23. PMID: 26693794; PMCID: PMC4798888.

3. BEILLARD, E.-PALLISGAARD, N.-van der VELDEN, V.H.J.-BI, W.-DEE, R.-van der SCHOOT, E.-DELABESSE, E.-MACINTYRE, E.-GOTTARDI, E.-SAGLIO, G.-WTZINGER, F.-LION, T.-van DONGEN, J.J.M.-HOKLAND, P.-GABERT, J. 2003. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR). In *Leukemia*. 17: 2474-2486.
4. CLOOS, J. – GOEMANS, BF.-HESS, CJ. et al. Stability and prognostic influence of FLT3 mutations in paired initial and relapsed AML samples. *Leukemia* 2006; 20(7): 1217–1220.
5. De KOUCHKOVSKY, I. – ABDUL-HAY, M.: Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update, *Blood Cancer Journal* (2016) 6, e441; DOI:10.1038/bcj.2016.50.
6. DÖHNER, H. – ESTEY, E.-GRIMWADE, D. – AMADORI, S.-APPELBAUM, FR.-BÜCHNER, T. – DOMBRET, H. – EBERT, BL.-FENAUX, P.-LARSON, RA. – LEVINE, RL.-Lo-COCO, F. – NAOE, T.-NIEDERWIESER, D. – OSSENKOPPELE, GJ. – SANZ, M. – SIERRA, J.-TALLMAN, MS.-TIEN HF.-WEI, AH.-LÖWENBERG, B.-BLOOMFIELD, CD.: Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017 Jan 26;129(4):424-447. doi: 10.1182/blood-2016-08-733196. Epub 2016 Nov 28. PMID: 27895058; PMCID: PMC5291965.
7. DÖHNER, H.-ESTEY, E.H.-AMADORI, S.-APPELBAUM, F.R.-BÜCHNER, T.-BURNETT, A.K.-DOMBERT, H., FENAUX, P.-GRIMWADE, D.-LARSON, R.A.-LO-COCO, F.-NAOE, T.-NIEDERWEISER, D.-OSSENKOPPELE, G.J.-SANZ, M.A. -SIERRA, J.-TALLMAN, M.S.-LÖWENBERG, B. -BLOOMFIELD, C.D. 2010. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European Leukemia Net. In *Blood*. 115(3): 453-474.
8. DRAZER, MW. – FEUERSTEIN, S.-WEST, AH.-JONES, MF.-CHRUPEK, JE.-GODLEY, LA.: How I diagnose and manage individuals at risk for inherited myeloid malignancies, *Blood*. 2016 Oct 6; 128(14): 1800–1813.
9. DUNNEN, JT.-DALGLEISH, R.-MAGLOTT, DR.-HART, RK.-GREENBLATT, MS.-McGOWAN-JORDAN, J.-ROUX, AF.-SMITH, T.-ANTONARAKIS, SE.-TASCHNER, PEM. 2016. HGVS Recommendations for the Description of Sequence variants: 2016 Update. In *Human Mutation*. 37(6): 564-569.
10. ELLARD, S., CHARLTON, R.-YAU, S.-GOKHALE, D.-TAYLOR, G.R.-WALLACE, A.-RAMSDEN, S.C.-BERRY, I.R. 2016. Practice guidelines for Sanger Sequencing Analysis and Interpretation. In Association for Clinical Genetic Science (ACGS). URL:<http://www.acgs.uk.com/media/1025065/acgs_sanger_sequencing_bpg_update_2016.pdf>.
11. GABERT, J.-BEILLARD, E.-van der VELDEN, V.H.J.-GRIMWADE, D.-PALLISGAARD, N.-BARBANY, G.-CAZZANIGA, G.-CAYUELA, JM.-CAVÉ, H.-PANE, F.-AERTS, JLE.-De MICHELI, D.-THIRION, X.-PRADEL, V.-GONZÁLEZ DÍAZ, M.-VIEHMANN, S.-MALEC, M.-SAGLIO, G.-van DONGEN, J.J.M. 2003. 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. In *Leukemia*. 17: 2318-2357.
12. GALE, R.E.-GREEN C.-ALLEN C.-MEAD A.J.-BURNETT A.K.-HILLS R.K.-LINCH D.C. 2008. Medical research Council Adult Leukemia Working Party. The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. In *Blood*. 111(5): 2776-2784.
13. GILLILAND, DG. – GRIFFIN, JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood* 2002; 100(5): 1532–1542.
14. HAFERLACH, C. – RIEDER, H. – LILLINGTON, D.M. – DASTUGUE, N. – HAGEMEIJER, A. – HARBOTT, J. – STILGENBAUER, S. – KNUUTILA, S. – JOHANSSON, B. – FONATSCH, C. 2007. Proposals for standardized protocols for cytogenetic analyses of acute leukemias, chronic lymphocytic leukemia, chronic myeloid leukemia, chronic myeloproliferative disorders, and

- myelodysplastic syndromes. In *Genes Chromosomes Cancer*. 46(5):494–499. DOI 10.1002/gcc.20433. URL:<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/gcc.20433>>.
15. HASTINGS, R. – HOWELL, R.-BRICARELLI, F.D.-KRISTOFFERSSON, U. – CAVANI, S. 2012. A common European framework for quality assessment for constitutional, acquired and molecular cytogenetic investigations: General Guidelines and Quality Assurance for Cytogenetics. In *E.C.A. (European Cytogeneticists Association) Newsletter*. 29:7-25.
 16. JULIUSSON, G. – ANTUNOVIC, P. – DEROLF, A. et al. Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry, *Blood*. 2009;113(18):4179-4187.
 17. MARILIN, M.L.-DATTO, M.-DUNCAVAGE, E.J.-KULKARNI, S.-LINDEMAN, N.I.-ROY, S.-TSIMBERIDOU, A.M.-VNENCAK-JONES, C.L.-WOLFF, D.J.-YOUNES, A.-NIKIFOROVA, M.N. 2017. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer. A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. In *The Journal of Molecular Diagnostics*. 19(1): 4-23.
 18. MORENO, I. – MARTIN, G. – BOLUFER, P. et al. Incidence and prognostic value of FLT3 internal tandem duplication and D835 mutations in acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2003;88(1):19-24.
 19. National Comprehensive Cancer Network Clinical Practice Guidelines in Oncology – Acute Myeloid Leukemia, V.2.2020, https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/aml.pdf.
 20. National Comprehensive Cancer Network Clinical Practice Guidelines in Oncology – Myelodysplastic Syndromes, V.1.2020, https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/mds.pdf.
 21. REHM, H.L.-BALLE, J.S.-BAYRAK-TOYDEMIR, P.-BERG, J.S.-BROWN, K.K.-DIEGNAN, J.L.-FRIEZ, M.J.-FUNKE, B.H.-HEDGE, M.R. -LYON, E. 2013. ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. In *Genetics in Medicine*. 15(4): 733-747.
 22. SCHLENK R.F.-KAYSER, S.-BULLINGER, L.-KOBBE, G.-CASPER, J.-RINGHOFFER, M.-HELD, G.-BROSSART, P.-LÜBBERT, M.-SALIH, H.R.-KINDLER, T.-HORST, H.A.-WULF, G.-NACHBAUR, D.-GÖTZE, K.-LAMPARTER, A.-PASCHKA, P. GAIDZIK, V.I.-TELEANU, V.-SPÄTH, D.-BENNER, A.-KRAUTER, J.-GANSER, A.-DÖHNER, H.-DÖHNER, K. 2014. German-Austrian AML Study Group. differential impact of allelic ratio and insertion site in FLT3-ITD-positive AML with respect to allogeneic transplantation. In *Blood*. 124(23): 3441-3449.
 23. SCHNITTGER, S.-KERN, W.-TSCHULIK, C.-WEISS, T.-DICKER, F.-FALINI, B.-HAFERLACH, T. 2009. Minimal residual disease levels assessment by NPM1 mutation-specific RQ-PCR provide important prognostic information in AML. In *Blood*. 114(11): 2220-2231.
 24. SCHNITTGER, S.-KINKELIN, U.-SCHOC, C.-HEINECKE, A.-HAASE, D.-HAFERLACH, T.-BÜCHNER, T.-WÖRMANN, B.-HIDDEMANN, W.-GIRESINGER, F. 2000. Screening for MLL tandem duplication in 387 unselected patients with AML identify a prognostically unfavorable subset of AML. In *Leukemia*. 14(5):796-804.
 25. SCHUURHUIS, G.J.-HEUSER, M.-FREEMAN, S.-BÉNÉ, M.C.-BUCCISANO, F. -CLOOS, J.-GRIMWADE, D.-HAFERLACH, T.-HILLS, R.K.-HOURIGAN, C.S.-JORGENSEN, J.L.-KERN, W.-LACOMBE, F.-MAURILLO, L.-PREUDHOMME, C.-van der REIJDEN, B.A.-THIEDE, C.-VENDITTI, A.-VYAS, P.-WOOD, B.L.-WALTER, R.B.-DÖHNER, H.-ROBOZ, G.J.-OSSENKOPPELE, G.J. 2018. Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party, In *Blood*. 131(22): 12756-1291.
 26. STROM, S.P. 2016. Current practices and guidelines for clinical next-generation sequencing oncology testing. In *Cancer Biological Medicine*. 13(1): 2-11.
 27. TAKAHASHI, S. Current findings for recurring mutations in acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol* 2011; 4: 36. doi: 10.1186/1756-8722-4-36.
 28. The Surveillance, Epidemiology, and End Results Program USA: Cancer Stat Facts. Available from: <<https://seer.cancer.gov/statfacts/html/aml.html>>.
 29. THIEDE, C.-STEUDEL, C.-MOHR, B. et al. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood* 2002; 99(12): 4326–4335.

31. van DONGEN, J.J.M.-MACINTYRE, E.A.-GABERT, J.A.-DELABESSE, E. -ROSSI, V.-SAGLIO, G.-GOTTARDI, E. -RAMBALDI, A.-DOTTI, G.-GRIESINGER, F.-PARREIRA, A.-GAMEIRO, P.-GONZÁLEZ DÍAZ, M.-MALEC, M.-LANGERAK, A.W.-SAN MIGUEL, J.F.-BIONDI, A. 1999. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. In Leukemia. 13: 1901-1928.
32. YAMAMOTO, Y. – KIYOI, H. – NAKANO, Y. et al. Activating mutation of d835 in the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. Blood 2001; 97(8): 2434–2439.

Poznámka:

Ak klinický stav a osobitné okolnosti vyžadujú iný prístup k prevencii, diagnostike alebo liečbe ako uvádza tento štandardný postup, je možný aj alternatívny postup, ak sa vezmú do úvahy ďalšie vyšetrenia, komorbidity alebo liečba, teda prístup založený na dôkazoch alebo na základe klinickej konzultácie alebo klinického konzília.

Takýto klinický postup má byť jasne zaznamenaný v zdravotnej dokumentácii pacienta.

Účinnosť

Tento štandardný postup nadobúda účinnosť od 1. februára 2021.

Marek Krajčí
minister