

Οξεία μυελογενής λευχαιμία  
Υπολειμματική νόσος με  
κυτταρομετρία ροής:  
Πότε και υπό ποιες προϋποθέσεις;

Κατερίνα Ψαρρά  
Τμήμα Ανοσολογίας - Ιστοσυμβατότητας  
Γ.Ν.Α. «Ο Ευαγγελισμός»

# Ιδανικό σύστημα MRD

- 1) εφαρμόσιμο στα περισσότερα περιστατικά της υπό διερεύνηση νόσου
- 2) ειδικό για το νεοπλασματικό κυτταρικό τύπο
- 3) ευαίσθητο
- 4) επιτρέπει την ποσοτική εκτίμηση του φορτίου της νόσου

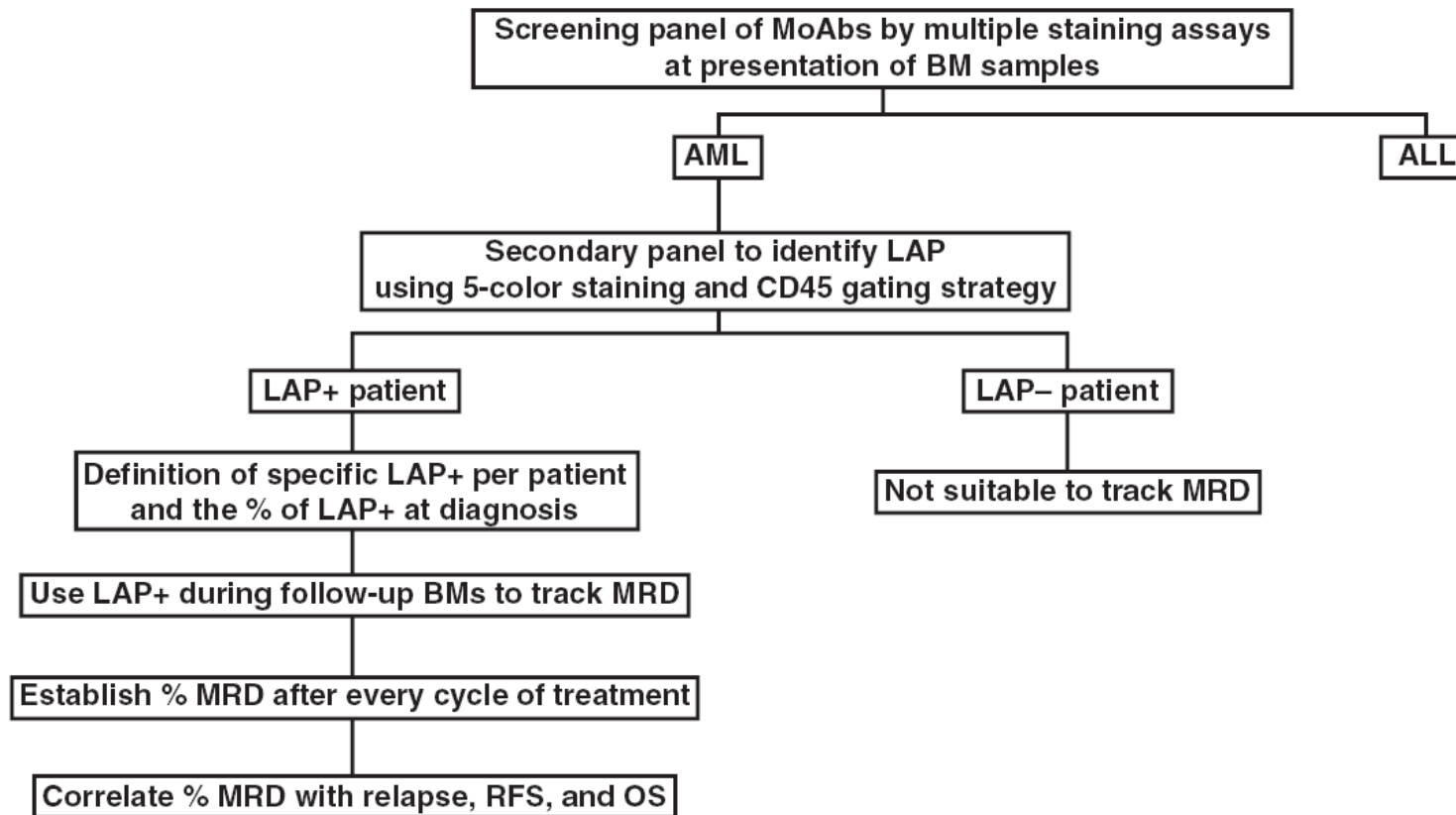
# Μέθοδοι για την ανίχνευση της MRD στην AML

**Table 1**  
Methods for Detection of Minimal Residual Disease in AML

Technique	Advantages	Disadvantages	Sensitivity
Standard morphologic studies	—	Low sensitivity; not suitable for low level of leukemic cells	1%-5%
Cytogenetics	—	Labor-intensive; slow; requires metaphase chromosome preparations	5%
FISH	Dividing cells not required; large number of cells can be analyzed in a short time; interphase FISH precludes need for high-quality metaphases (cf standard cytogenetics)	Labor-intensive; limited sensitivity	0.3%-5%
Gene rearrangements by Southern blotting	Low risk of contamination; patient-specific	Labor-intensive; slow; limited sensitivity	1%-5%
PCR analysis	Can be identified with limited set of primers; high stability of DNA; relatively easy; rapid (1-3 d); no (or very low $<10^{-6}$ ) background in normal cells; sensitive; patient specific	False-positive results; applied in $<50\%$ of AML cases; relatively expensive	$10^{-4}$ to $10^{-5}$
Flow cytometric immunophenotyping	Applicable for most cases ( $>80\%$ ); quantification simple; single cell analysis; cell viability can be determined; information on normal cells; relatively easy; cheap; rapid (1-2 d); relatively patient-specific	Not as specific as PCR; presence of subpopulation in AML; immunophenotypic shifts can occur between diagnosis and relapse	$10^{-4}$

AML, acute myeloid leukemia; FISH, fluorescence in situ hybridization; PCR, polymerase chain reaction.

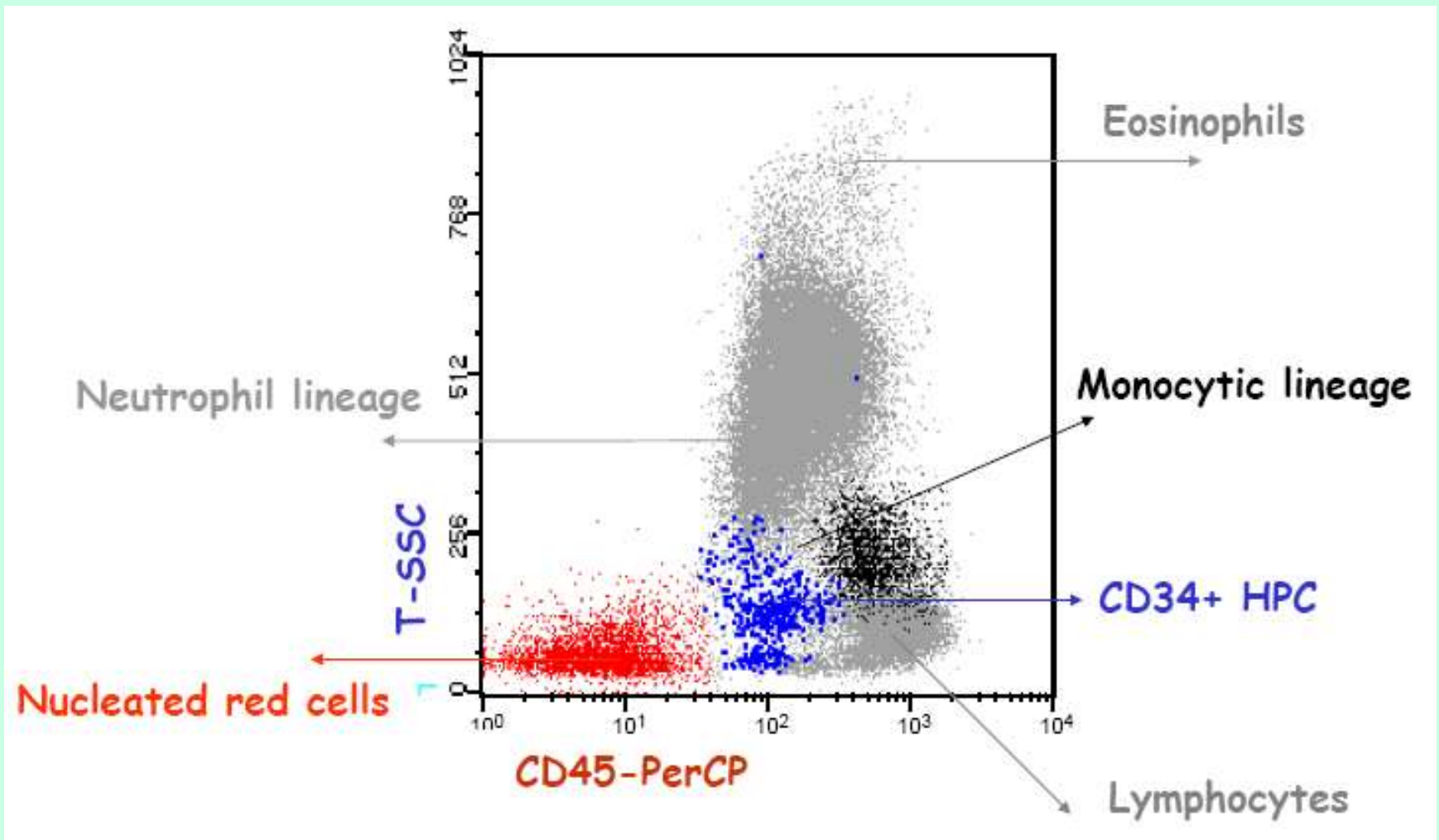
# Αλγόριθμος για την ανίχνευση της MRD στην AML



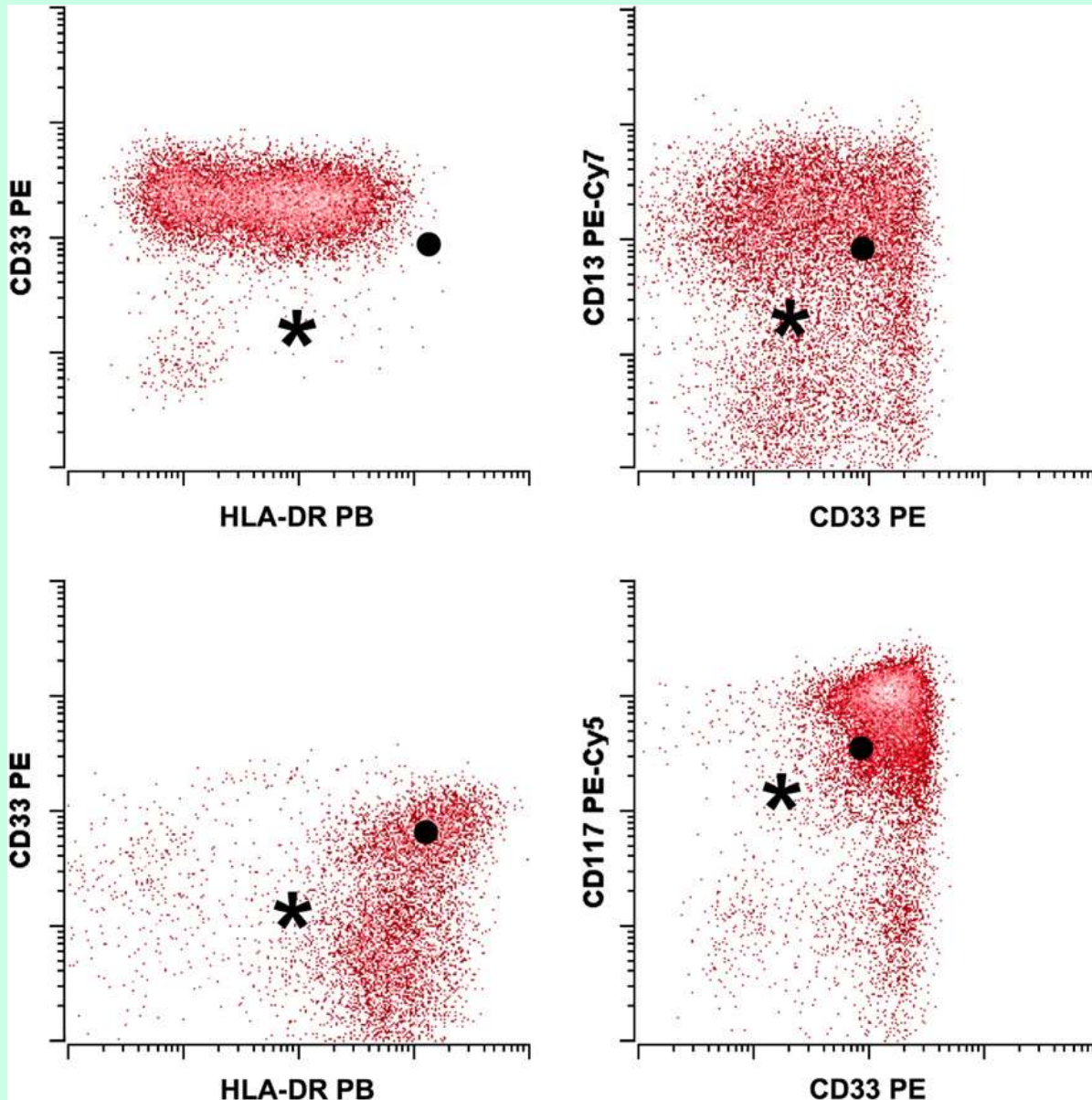
# Άτυπη έκφραση -Leukemia associated immunophenotype - LAIP

- 1) ασύγχρονη αντιγονική έκφραση δηλ. ταυτόχρονη έκφραση αώρων και ωρίμων δεικτών στο ίδιο κύτταρο, όπως η συνέκφραση του CD34 και του CD15.
- 2) έκφραση δείκτη άλλης κυτταρικής σειράς, δηλ. έκφραση δεικτών της λεμφικής σειράς και πιο συγκεκριμένα των CD2, CD5, CD7, CD10, CD19 στους βλάστες μυελικής σειράς
- 3) υπερέκφραση αντιγόνου, δηλ. παθολογικά αυξημένη έκφραση συγκεκριμένου αντιγόνου ανά κύτταρο
- 4) μη αναμενόμενες ιδιότητες σκέδασης, που περιλαμβάνουν την έκφραση λεμφικών αντιγόνων σε βλαστικά κύτταρα με υψηλή ευθεία και πλάγια σκέδαση, που αντιστοιχούν στα φυσιολογικά μυελοειδή κύτταρα
- 5) απουσία έκφρασης ειδικών για την κυτταρική σειρά αντιγόνων, που περιλαμβάνει απουσία των αναμενόμενων αντιγόνων, όπως τα CD13, CD33 στους μυελικούς βλάστες.

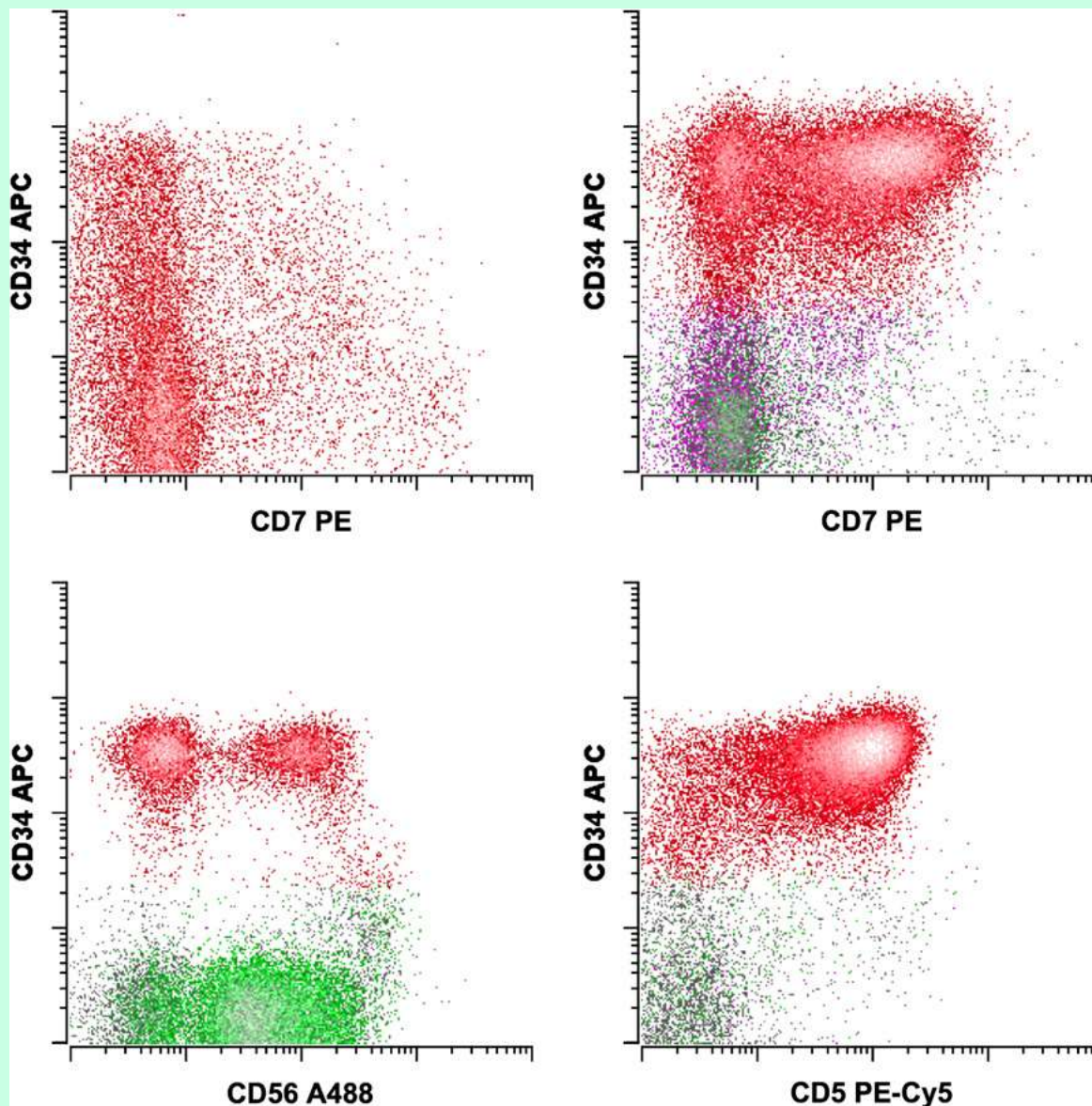
# ΣΤΙΚΤΟΓΡΑΜΜΑ (dot-plot) φυσιολογικού ΒΜ



# Παθολογική ένταση φθορισμού

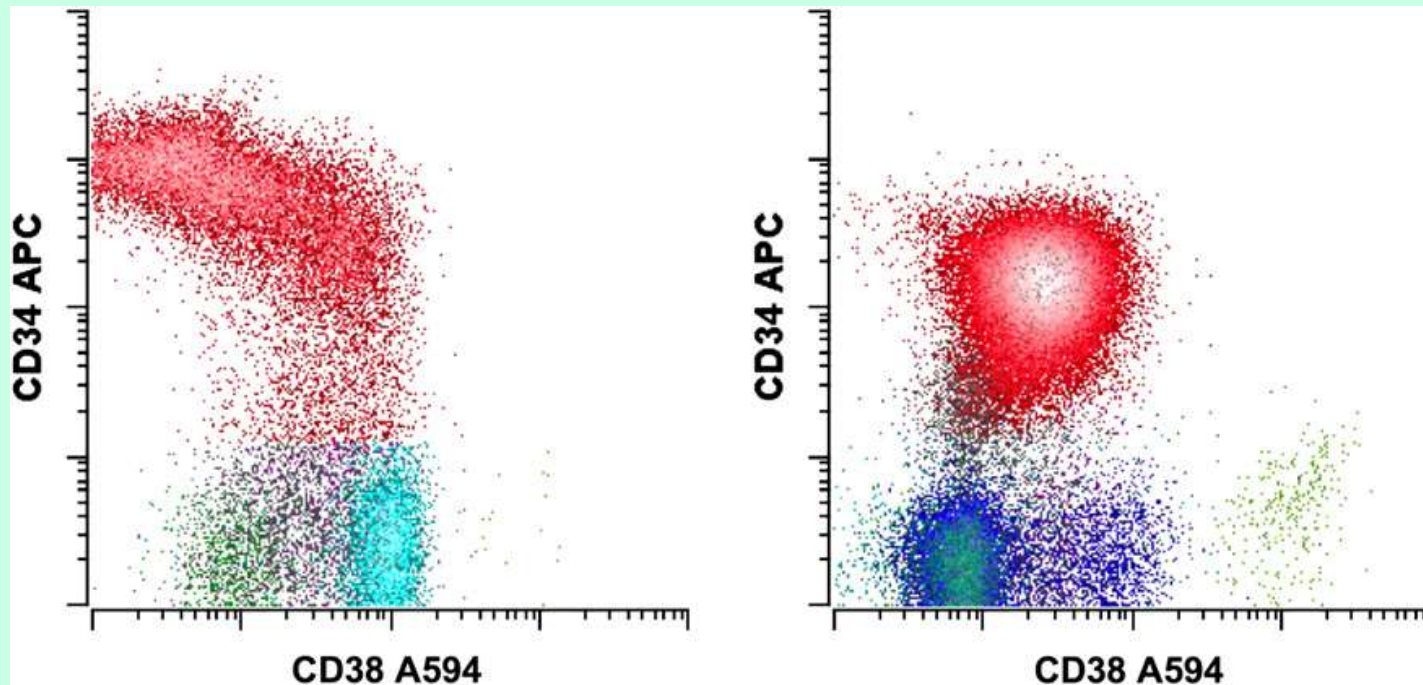


# Έκτοπη έκφραση λεμφικών αντιγόνων





# Ομοιογένεια έκφρασης αντιγόνων και παθολογική ωρίμανση



# Στρατηγική

- Ταυτοποίηση του μοναδικού ανοσοφαινότυπου με πολυχρωματική χρώση
- Καθορισμός του/των ειδικών για τον ασθενή LAIPs
- Ιχνηλάτηση της MRD αφού επιτευχθεί η CR και κατά την παρακολούθηση (θεραπεία εφόδου, εδραίωσης, παρακολούθηση)

# Ταυτοποίηση ανοσοφαινότυπου

- Μεγάλος αριθμός φθοριζουσών ουσιών
- Κοινά αντιγόνα CD34, CD45, CD117
- Κατευθυντήριες οδηγίες

# Καθορισμός LAIPs

- Θεωρία
- ❖ Ειδικότητα: ποσοστό σε φυσιολογικό ΒΜ  
προσθήκη δεικτών αωρότητας
- ❖ Ευαισθησία: ποσοστό έκφρασης LAIP στο  
βλαστικό πληθυσμό  
Υψηλή >50%, ενδιάμεση 20-50%, χαμηλή 10-  
20%
- ❖ Σταθερότητα: εμπειρία

# Συχνότερες LAIPs σε AML, φυσιολογικό και αναγεννώμενο ΒΜ

Frequencies of LAPs in 51 AML Samples, 10 Normal BM Samples, and 5 Regenerating BM Samples

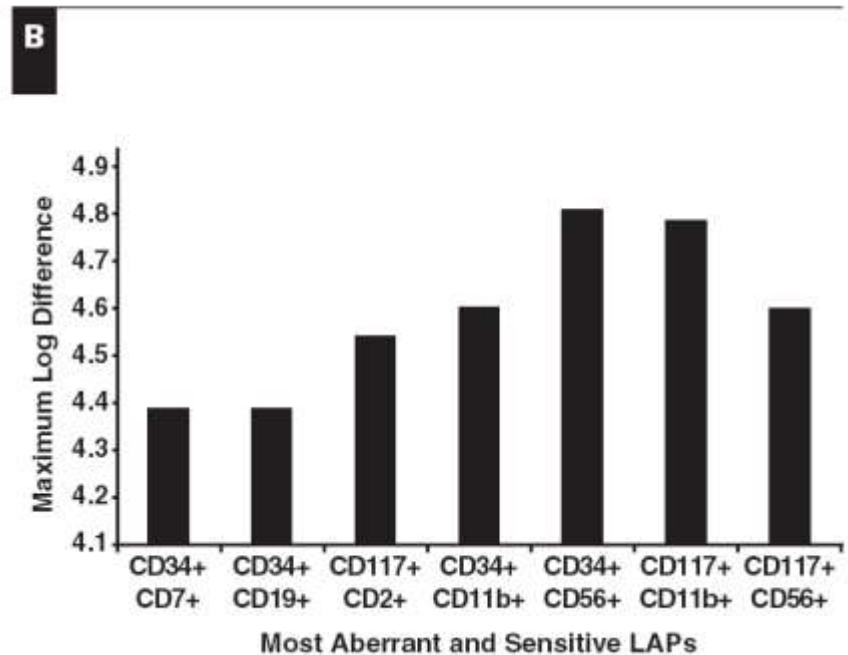
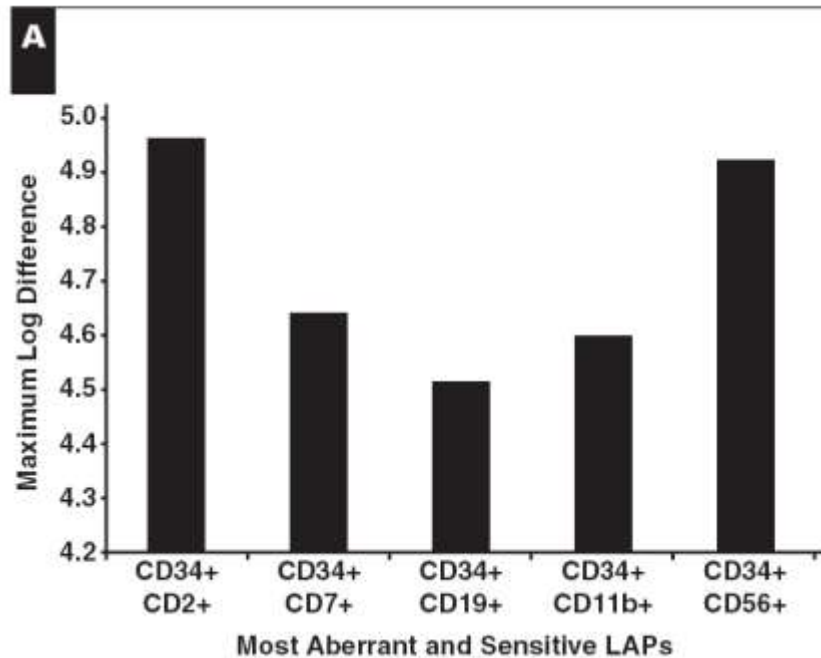
LAP	No. of Cases With AML*	LAPs in AML (%)		Positive Cells in Normal BM (%)			Log Difference		Positive Cells in Regenerating BM (%)			Log Difference	
		Min	Max	Median	Min	Max	Min	Max	Median	Min	Max	Min	Max
CD34+/CD2+	5	26	92	0.001	0.000	0.030	4.41	4.96	0.004	0.000	0.030	3.81	4.36
CD34+/CD7+	12	11	88	0.002	0.000	0.009	3.74	4.64	0.004	0.000	0.005	3.49	4.39
CD34+/CD10+	1	22	22	0.012	0.000	0.185	3.26	3.26	0.035	0.002	0.072	2.79	2.79
CD34+/CD19+	2	24	65	0.002	0.000	0.007	4.08	4.51	0.003	0.000	0.015	3.96	4.39
CD117+/CD2+	5	13	91	0.003	0.000	0.010	3.64	4.48	0.003	0.000	0.019	3.70	4.54
CD117+/CD7+	11	18	90	0.003	0.000	0.033	3.78	4.48	0.006	0.001	0.017	3.48	4.18
CD117+/CD10+	1	17	17	0.001	0.000	0.014	4.23	4.23	0.003	0.001	0.050	3.75	3.75
CD117+/CD19+	2	15	53	0.002	0.000	0.011	3.88	4.42	0.004	0.000	0.004	3.63	4.18
CD34+/CD235+	0	0	0	0.000	0.000	0.006	NC	NC	0.053	0.002	0.237	NC	NC
CD117+/CD235+	1	30	30	0.001	0.000	0.008	4.48	4.48	0.015	0.003	0.443	3.31	3.31
CD34+/CD11b+	11	11	80	0.002	0.000	0.022	3.74	4.60	0.002	0.001	0.095	3.74	4.60
CD34+/CD14+	0	0	0	0.000	0.000	0.001	NC	NC	0.002	0.001	0.005	NC	NC
CD34+/CD15+†	20	10	36	0.004	0.000	0.024	3.40	3.95	0.012	0.002	0.014	2.92	3.48
CD34+/CD56+	5	29	84	0.001	0.000	0.039	4.46	4.92	0.001	0.000	0.024	4.35	4.81
CD34+/CD64+	6	10	49	0.051	0.000	0.160	2.29	2.98	0.086	0.000	0.105	2.06	2.75
CD34+/CD65+	16	11	63	0.013	0.005	0.047	2.93	3.69	0.057	0.003	0.106	2.29	3.05
CD117+/CD11b+	10	12	62	0.002	0.000	0.048	3.78	4.49	0.001	0.000	0.026	4.08	4.79
CD117+/CD14+	0	0	0	0.000	0.000	0.010	NC	NC	0.001	0.000	0.011	NC	NC
CD117+/CD15+	26	10	55	0.010	0.000	0.039	3.00	3.74	0.017	0.005	0.093	2.76	3.50
CD117+/CD56+	6	11	80	0.003	0.000	0.037	3.56	4.43	0.002	0.000	0.025	3.74	4.60
CD117+/CD64+	9	11	70	0.067	0.001	0.127	2.22	3.02	0.040	0.002	0.247	2.44	3.24
CD117+/CD65+	22	10	62	0.007	0.001	0.042	3.15	3.95	0.028	0.023	0.266	2.55	3.34
Median		11	62	0.002	0.000	0.027	3.74	4.43	0.004	0.001	0.028	3.48	4.18
Minimum		0	0	0	0.000	0.001	2.22	2.98	0.001	0.000	0.004	2.06	2.75
Maximum		30	92	0.067	0.005	0.185	4.48	4.96	0.086	0.023	0.443	4.35	4.81

AML, acute myeloid leukemia; BM, bone marrow; LAP, leukemia-associated phenotype; Max, maximum; Min, minimum; NC, no cases found for the defined aberrant immunophenotype.

\* Some cases have more than 1 LAP.

† CD34+/CD15+/CD33<sup>dim</sup> was defined.

Οι συχνότεροι και πλέον ευαίσθητοι LAIPs με βάση τη μέγιστη log διαφορά των ποσοστών των θετικών κυττάρων στην AML σε σχέση με φυσιολογικό (A) και αναγεννώμενο (B) ΒΜ



# Καθορισμός LAIPs

- Σχηματισμός
- ❖ 1 δείκτης προγονικών κυττάρων (CD133, CD34, CD117)
- ❖ 1 μυελικός δείκτης (CD33, CD13)
- ❖ άτυπος δείκτης
  
- ❖ Αν 1 LAIP σχηματισμός και δεύτερου με άλλο προγονικό και άλλο μυελικό

# LAP REPORT form

	number	registration number	measured by centrum	judged by centrum
AML				

Populations (see commentary 1)	%	remarks
Immature leukaemic blasts		
Mature leumaemic blasts		
Leukaemic blasts (CD45aberrant)		
Lymfocytes		
Monocytes		
Granulocytes		

LAPS (see commentary 2)				Judgement of the quality of LAPS				
LAPs	aberrancy	% aberrancy	LAP	% LAP	specificity	sensitivity	stability	quality
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
number of aberrancies								

Remarks



# Ιχνηλάτηση MRD

- Ποσοστό LAIP+ κυττάρων
- MRD αν > ποσοστού σε φυσιολογικό ή αναγεννώμενο ΒΜ
- Αναφορά ευαισθησίας για το συγκεκριμένο κέντρο

# Στρατηγική οριοθέτησης για ανίχνευση MRD

	De novo AML	BM after 1st cycle	BM after 2nd cycle	
Defining of CD45dim blasts in WBC compartment				No gate Characterization of WBC compartment (R1) <b>1</b>
				In R1 Exclusion of cell fragments and/or dead cells (R2) <b>2</b>
				In R1+R2 Identification of CD45 dim / SSC blasts (R3) <b>3</b>
Defining of LAP+ cells in WBC compartment				In R1+R2+R3 Gate on CD117+ cells (R4) <b>4</b>
				In R1+R2 Gate on CD117+ cells which are CD45dim (R5) <b>5</b>
				In R1+R2+R3+R4+R5 Gate on CD33+CD7+ cells, which are CD117+ CD45dim : LAP+ cells (R6) <b>6</b>
Backgating of LAP+ cells				In R1+R2+R3+R4+R5+R6 Backgating of LAP+ cells in a CD117/SSC plot <b>7</b>
				In R1+R2+R3+R4+R5+R6 Backgating of LAP+ cells in a SSC/FSC plot <b>8</b>
				In R1+R2+R3+R4+R5+R6 Backgating of LAP+ cells in a CD45/SSC plot <b>9</b>

# MRD report form

	number	registration number	cycle/day	measured by center	judged by center
AML					

Cell populations	%	Remarks
Blasts		
Lymfocytes		
monocytes		
granulocytes		

LAPS in WBC compartment			quality of the LAP				
no	LAP	LAP% at diagnosis	specificity	sensitivity	stability	% LAP in WBC	% MRD in WBC

**MRD**                      yes / no /not evaluable

**Comment**

## Commentary

### Cell populations

Percentages of blasts, lymphocytes, monocytes en granulocytes are established in the white blood cell compartment (WBC, i.e. CD45-FSC)

### LAPS in WBC compartment

LAP% at diagnosis	Note in the column "LAP% at diagnosis" the LAP as percentage of the blasts as established in newly diagnosed material.
quality of LAPs:	Establish the specificity,sensitivity and stability of the LAPs according to the definitions as described below
specificity	as defined in the SOP " Defining Leukaemia Associated Phenotypes in newly diagnosed Acute Myeloid Leukaemia"
sensitivity	as defined in the SOP " Defining Leukaemia Associated Phenotypes in newly diagnosed Acute Myeloid Leukaemia"
stability	as defined in the SOP " Defining Leukaemia Associated Phenotypes in newly diagnosed Acute Myeloid Leukaemia"
% LAP in WBC	Note the percentage of LAP as found according to the analyses
% MRD in WBC	Note the percentage of MRD

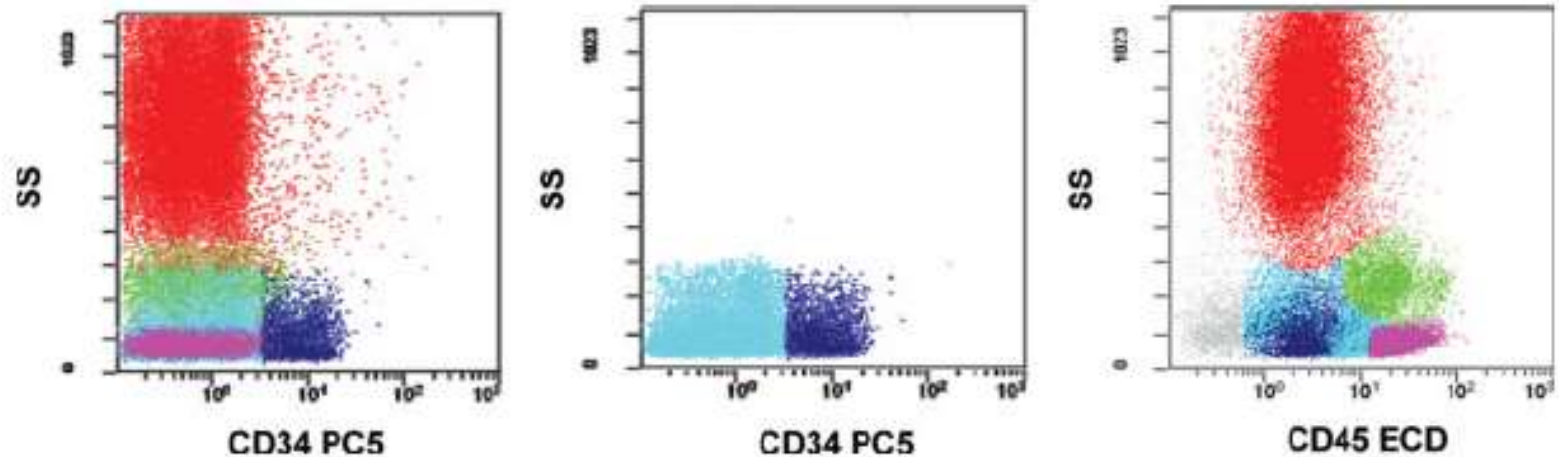
**MRD**                      yes /no / not evaluable                      Encircle the right result

**Comment**                      Explain the result

# Ιδιαιτερότητες της MRD στην AML

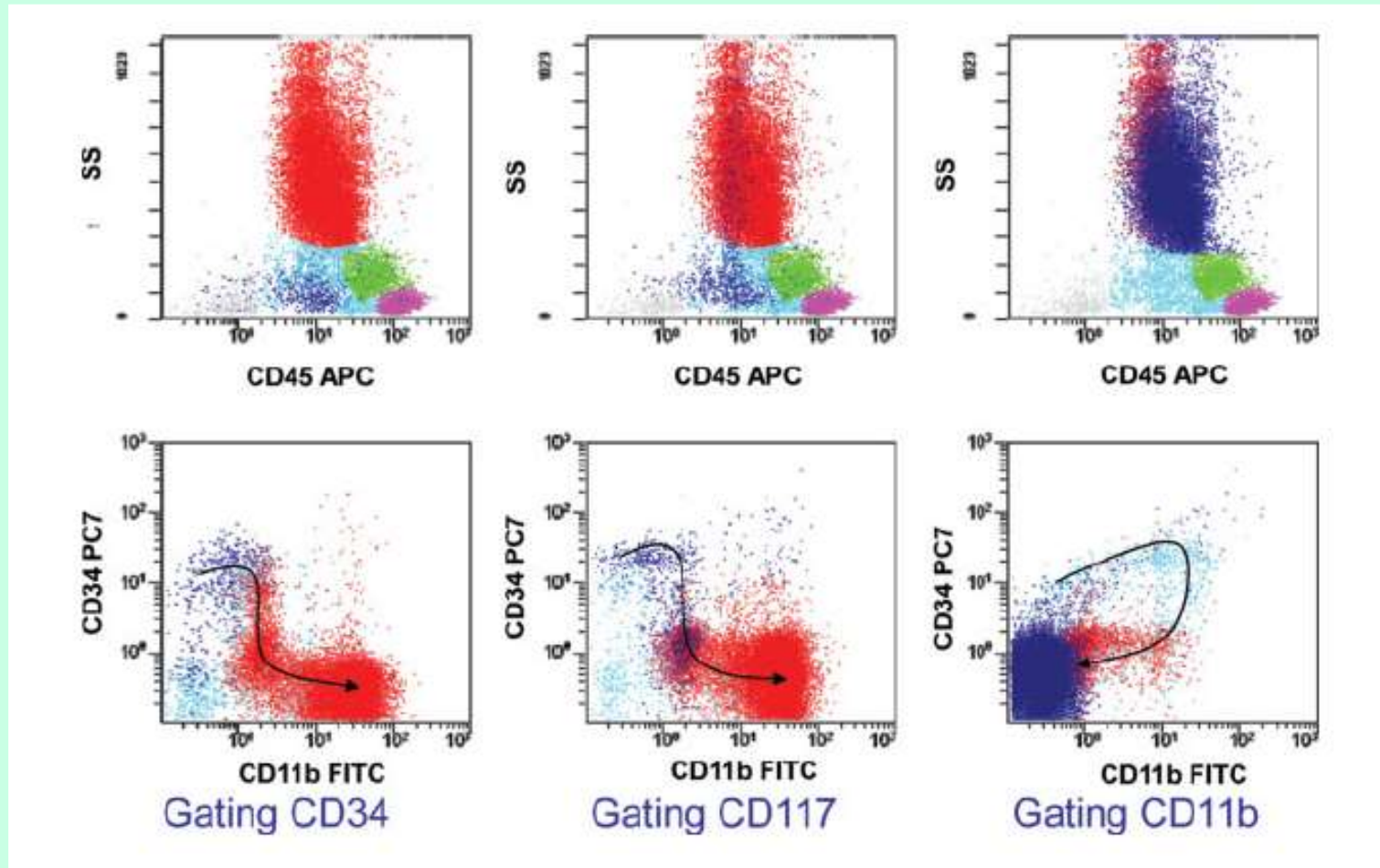
- AML ανοσοφαινοτυπική ετερογένεια
- Στικτογράμματα απλωμένα σε ευρεία περιοχή
- Όχι cluster όπως στην ALL

# Έκφραση CD34 στην περιοχή των αώρων κυττάρων (CD45 weak)



*Amoulet C et al, 2010*

# Συστηματικό cross-gating στις περιοχές των αώρων και ωρίμων κυττάρων της μυελικής σειράς



# Περιορισμοί

- Έλλειψη προτύπωσης
- Αδυναμία ταυτοποίησης τροποποίησης
- Δυσκολία σε CD34-CD117- περιστατικά και σε M4, M5



---

**Table 1. Aberrant phenotypes used in MRD studies.**

---

<i>Aberrant phenotype</i>	<i>No (%)</i>
Cross-lineage infidelity	32 (34)
CD2	5
CD7	14
CD19	5
CD56	8
Antigen over-expression	9 (10)
CD34 <sup>+</sup>	9
Antigen under-expression	5 (5)
CD33 <sup>-</sup>	5
Asynchronous antigen expression	48 (51)
CD34 <sup>+</sup> /CD38 <sup>-</sup> /My <sup>+</sup>	1
TdT <sup>+</sup> /My <sup>+</sup>	6
CD34 <sup>+</sup> /CD11b <sup>+</sup>	11
(CD34 <sup>+</sup> ,CD117 <sup>+</sup> )/HLA-DR <sup>-</sup> /My <sup>+</sup>	5
(CD34 <sup>+</sup> ,CD117 <sup>+</sup> )/CD4 <sup>+</sup> /My <sup>+</sup>	5
(CD34 <sup>+</sup> ,CD117 <sup>+</sup> )/CD15 <sup>+</sup> /My <sup>+</sup>	15
(CD34 <sup>+</sup> ,CD117 <sup>+</sup> )/CD14 <sup>+</sup> or CD65 <sup>+</sup> /My <sup>+</sup>	5

---

*Overall, 94 aberrant phenotypes were detected in 45 patients. My: myeloid marker.*

## Frequencies of LAPs in 51 Patients With AML

LAPs (n = 200)	No. of Cases	Range of Positive Cells in AML Bone Marrow (%)
Lineage infidelity (n = 40)		
CD34+/CD2+	5	26-92
CD34+/CD7+	12	11-88
CD34+/CD10+	1	22
CD34+/CD19+	2	24-65
CD117+/CD2+	5	13-91
CD117+/CD7+	11	18-90
CD117+/CD10+	1	17
CD117+/CD19+	2	15-53
CD34+/Glycophorin A+	0	0
CD117+/Glycophorin A+	1	30
Asynchronous antigen expression (n = 146)		
CD34+/CD11b+	11	11-80
CD34+/CD14+	0	0
CD34+/CD15+	20	10-36
CD34+/CD56+	5	29-84
CD34+/CD64+	6	10-49
CD34+/CD65+	15	11-63
CD117+/CD11b+	10	12-62
CD117+/CD14+	0	0
CD117+/CD15+	25	10-55
CD117+/CD56+	6	11-80
CD117+/CD64+	9	11-70
CD117+/CD65+	22	10-62
CD33+/CD15+	2	80-94
CD33+/CD64+	5	18-97
CD33+/CD65+	5	10-99
CD33+/CD11b+	3	20-26
CD33+/CD56+	2	10-78
Lack of lineage-specific antigen (n = 14)		
CD33+/CD13-	5	93-99
CD33-/CD13++	9	25-98

AML, acute myeloid leukemia; LAPs, leukemia-associated phenotypes; +, positive; ++, strong positive; -, negative.

- Συχνότητα LAIPs σε ασθενείς με AML

# Ποσοστά ασθενών με LAIPs

Various LAPs and Their Frequencies

Report	No. of MFC Colors Used	LAPs (%)	Asynchronous Antigen Expression (%) <sup>*</sup>	Lineage Infidelity (%) <sup>*</sup>	Antigen Overexpression (%) <sup>*</sup>	Aberrant Light-Scatter Properties (%) <sup>*</sup>	Absence of Lineage-Specific Antigens (%) <sup>*</sup>
Al-Mawali et al <sup>14</sup>	3	64	52	35	ND	ND	35
Al-Mawali et al <sup>11</sup>	5	94	73 <sup>†</sup>	20 <sup>†</sup>	ND	ND	7 <sup>†</sup>
Babusiková et al <sup>‡</sup>	2	56	13	42	1	NR	NR
Bahia et al <sup>20</sup>	3	89	82.4	34.3	NR	NR	NR
Drach et al <sup>21</sup>	2	51	13	32	NR	NR	16
Macedo et al <sup>7</sup>	2 and 3	73	62.5	37.5	17.5	32.5	NR
Reading et al <sup>9</sup>	2 and 3	85	70	54	NR	NR	NR
Laane et al <sup>‡</sup>	3	93.5	83	55	16	NR	9
San Miguel et al <sup>17</sup>	3	NR	78	29	21	17	NR
Feller et al <sup>22</sup>	4	60	55	45	2.5	NR	NR
Voskova et al <sup>23</sup>	2	82	50	64.3	14.3	50	27.8
Kern et al <sup>10</sup>	3	100	14.2 <sup>†</sup>	26.4 <sup>†</sup>	32.9 <sup>†</sup>	NR	26.4 <sup>†</sup>

AML, acute myeloid leukemia; LAPs, leukemia-associated phenotypes; MFC, multiparameter flow cytometry; ND, not done; NR, not reported.

<sup>\*</sup> Percentage of total AML cases unless otherwise indicated.

<sup>†</sup> Percentage of total number of LAPs.

<sup>‡</sup> Babusiková O, Glasová M, Koníková E, et al. Leukemia-associated phenotypes: their characteristics and incidence in acute leukemia. *Neoplasma*. 1996;43:367-372. Laane E, Derolf AR, Björklund E, et al. The effect of allogeneic stem cell transplantation on outcome in younger acute myeloid leukemia patients with minimal residual disease detected by flow cytometry at the end of post-remission chemotherapy. *Haematologica*. 2006;91:833-836.

# Μελέτες MRD στην AML

RESULTS OF SELECTED MRD STUDIES IN AML

Subtype	Target gene/ control gene	Patient number	Informative timepoint	Method	Informative MRD level	Reference
Adults: t(8;21)	<i>AML1-ETO/ TBP</i> ratio	21	Post- consolidation	RQ-PCR	Transcript: control $>10^{-5}$	Leroy et al, 2005 <sup>15</sup>
All adults	<i>WT1/ABL</i>	116	61-120 days & 121-180 days post start of chemotherapy	RQ-PCR	$>0.4\%$	Weisser et al, 2005 <sup>32</sup>
Adults: inv(16)	<i>CBFB- MYH11/ABL</i>	21	Post- completion of chemotherapy	RQ-PCR	$>0.25\%$	Buonamici et al, 2002 <sup>13</sup>
Adults: t(8;21)	<i>AML1- ETO/ABL</i>	25	Post- consolidation / intensification	RT-PCR	1000 mol/mg of RNA	Tobal et al, 2000 <sup>9</sup>
Adults: t(8;21) inv(16)	<i>AML1- ETO/ABL</i>	28	Post- completion of chemotherapy	RQ-PCR	$>10$ transcript copies	Perea et al, 2006 <sup>16</sup>
	<i>CBFB- MYH11/ABL</i>	27		FC	$>0.1\%$	
All adults	Aberrant phenotypes	126	Post-first induction	FC	$>0.01\%$	San Miguel et al, 2001 <sup>17</sup>
All adults	Aberrant phenotypes	142	Post-remission	FC	$\geq 0.035\%$	Maurillo et al, 2008 <sup>20</sup>
All children	Aberrant phenotypes	252	Post-first induction	FC	$\geq 0.5\%$	Sievers et al, 2003 <sup>22</sup>
All children	Aberrant phenotypes	46	Post-first induction	FC	$\geq 0.1\%$	Coustan-Smith et al, 2003 <sup>23</sup>
All children	Aberrant phenotypes	150	Prior to second induction	FC	$>0.1\%$	Langebrake et al, 2006 <sup>24</sup>

Abbreviations: RQ-PCR, real-time polymerase chain reaction; FC, flow cytometry

# Κλινικές μελέτες

Διαδοχικά δείγματα μετά θεραπεία εφόδου: πρώιμη υποτροπή όταν MRD+ CR επί 52 εβδ. όταν MRD- (Drach et al )

Ποσοστό MRD μετά 1<sup>ο</sup> κύκλο (1%), 2<sup>ο</sup> (0,14%), 3<sup>ο</sup> (0,11%) κύκλο χημειοθεραπείας και στα συλλεγένητα PBMCs (0,13%) συσχετίζεται ισχυρά με επιβίωση ελεύθερη υποτροπής (RFS).

Απόλυτος αριθμός MRD συσχετίζεται ισχυρά με την κλινική έκβαση.

Μετά το πέρας της θεραπείας εκτίμηση κάθε 3 μήνες αύξηση MRD σημαίνει υποτροπή (Feller et al)

Ανάλυση ROC 0,15% διάκριση MRD+/MRD-

Μετά από θεραπεία εφόδου η MRD συσχετίζεται με RFS και συνολική επιβίωση (OS) (Al-Mawali et al)

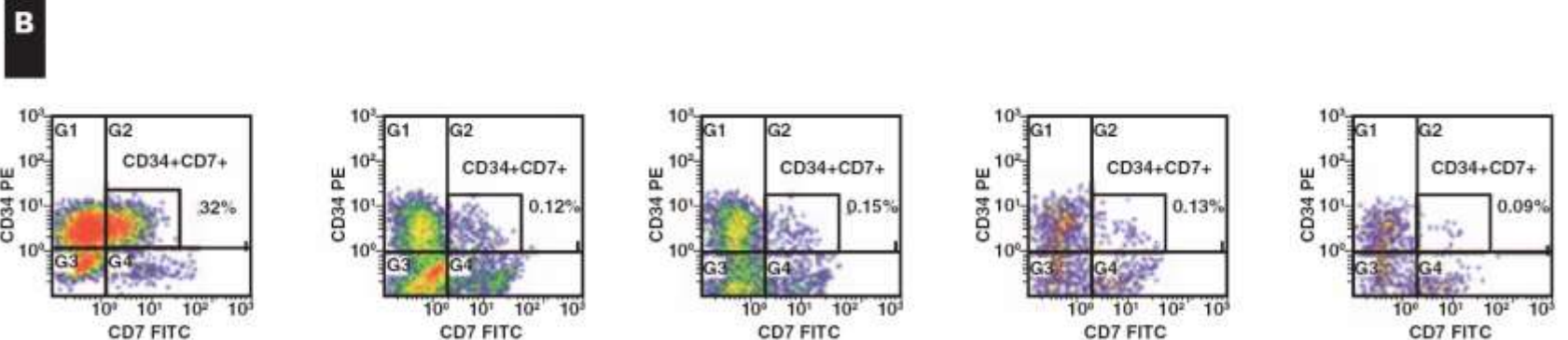
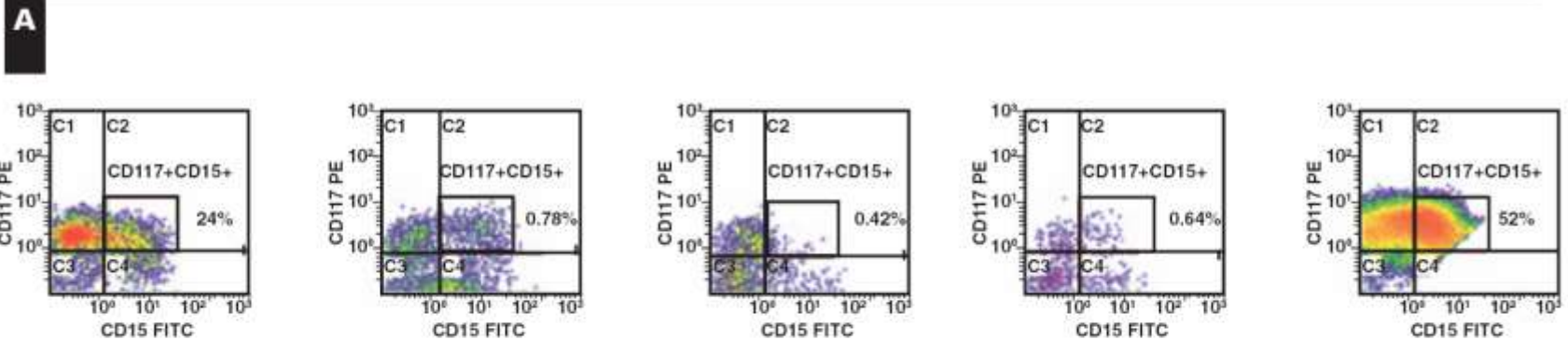
Επίπεδο MRD στο τέλος της θεραπείας εφόδου (0,5%) και εδραίωσης (0,2%) συσχετίζεται άμεσα με υποτροπή και RFS (San Miguel et al)

Επίπεδο MRD (0,035%) στο τέλος της θεραπείας εδραίωσης καλύτερος προγνωστικός δείκτης έκβασης, αλλά και συσχέτιση με κυτταρογενετική, φαινότυπο MDR1, RFS και OS και υποτροπή μετά από αυτόλογη (Venditti et al)

Επίπεδο MRD στο τέλος της θεραπείας εφόδου σε μορφολογική CR: α) ( $<10^{-4}$ ) πολύ χαμηλού κινδύνου, β) ( $10^{-4} - 10^{-3}$ ) χαμηλού κινδύνου, γ) ( $10^{-3} - 10^{-2}$ ) ενδιάμεσου κινδύνου και δ) ( $> 10^{-2}$ ) υψηλού κινδύνου (San Miguel et al)

Η ακριβής εκτίμηση της MRD με MFC έχει προγνωστική σημασία και μπορεί να παίξει ρόλο στις αποφάσεις για την κλινική αντιμετώπιση των ασθενών.

# Ανίχνευση MRD σε διαδοχικά δείγματα BM σε υποτροπή και σε ύφεση



BM: AML at Diagnosis

After Induction

After Consolidation I

After Consolidation II

Follow-up

# MRD στην AML

Πότε και υπό ποιες προϋποθέσεις;

- Όταν ανιχνεύεται LAIP στη διάγνωση - αφού διερευνηθεί με προσοχή και προσδιορισθούν τα χαρακτηριστικά του
- Προσπάθεια προτύπωσης και διατήρησης σταθερών συνθηκών κατά την παρακολούθηση
- Μετά τη θεραπεία εφόδου και εδραίωσης και κατά την παρακολούθηση ανίχνευση LAIPs αλλά και πιθανής τροποποίησης (απώλεια αλλά και ανίχνευση νέων LAIPs)