

**Zápis z AML CELL WORKSHOPu konaného dne 5. 1. 2012
na Interní Hematoonkologické klinice Fakultní nemocnice Brno,
pracoviště CMBGT, Černopolní 9, 625 00 Brno**

I.

Účast (abecedně, bez titulů): Cetkovský (ÚHKT Praha), Dvořáková (FN Brno), Hardekopf (Chambon), Horáček (FN Hradec Králové), Ježíšková (FN Brno), Nekvindová (FN Hradec Králové), Peková (Chambon), Plachý (Chambon), Polívka (FNKV Praha), Procházková (FN Brno), Ráčil (FN Brno), Rázga (FN Brno), Tošková (FN Brno), Voglová (FN Hradec Králové), Vrbecký (FN Hradec Králové), Žák (FN Hradec Králové).

II.

Workshop na téma „AML MRD“ zahájil doc. Ráčil a přednesl úvodní slovo.

III.

Formou krátkých prezentací byly představeny přístupy jednotlivých pracovišť ke sledování MRD u AML pacientů, a to z pohledu klinika (indikace, interpretace, léčba molekulárního relapsu), a poté z pohledu molekulárního biologa (metodologie, materiál, senzitivita, mezilaboratorní kontroly). K dané problematice bylo následně diskutováno.

IV.

Dr. Tošková představila protokol ETAL s cílem najít společné stanovisko k tomuto protokolu.

V.

Závěry:

1. Byl sestaven návrh protokolu pro banking AML vzorků (viz. příloha 1).
2. Byl sestaven návrh protokolu definice molekulárního relapsu a molekulárních léčebných odpovědí na iniciální léčbu AML a léčbu molekulárního relapsu (viz. příloha 2) a byl domluven společný postup při léčbě molekulárního relapsu (viz. příloha 2)
3. Pro potřeby příští schůzky (pravděpodobný termín konání: květen 2012) si jednotlivé laboratoře domluvily srovnání senzitivit laboratorních metod pro monitorování MRD u rutinně používaných molekulárních markerů AML pacientů (formou desítkového ředění diagnostického vzorku). Pro účely srovnání jsou navrhovány tyto markery: AML1/ETO, CBFβ/MYH11 – typ A, fúzní transkripty MLL genu, NPM1 – mutace A. Výsledky srovnání senzitivit laboratorních metod budou zaslány ing. Rážgovi

(filip.razga@fnbrno.cz) ke zpracování nejpozději do konce dubna 2012. Ing. Rázga provede vzájemné porovnání dat mezi jednotlivými laboratořemi.

Jednotlivá klinická pracoviště zpracují literární data a klinické zkušenosti s danými molekulárními markery.

4. Padl návrh na další CELL workshopy – FLOW MRD, transplantační režimy a jejich výsledky – AML a léčba relapsu po alo HSCT
5. Stanovisko k protokolu ETAL: protokol bude dále diskutován v rámci jednotlivých center a stanovisko k protokolu bude sděleno dodatečně.

VI.

Kontaktní emaily na zúčastněné:

petr.cetkovsky@uhkt.cz

ddvorak@fnbrno.cz

dhardekopf@gmail.com

jan.hor@post.cz

ivana.jeziskova@fnbrno.cz

nekvindova@fnhk.cz

pekovas@post.cz

plachy.r@centrum.cz

jinpole@gmail.com

prochazkovaj@fnbrno.cz

zracil@fnbrno.cz

filip.razga@fnbrno.cz

mtoskova@fnbrno.cz

voglova@fnhk.cz

vrbecky@fnhk.cz

zakpavelHK@seznam.cz

VII.

Workshop zakončil doc. Ráčil poděkováním všem přítomným za účast a spolupráci.

V Brně dne 6. 1. 2012

Zapsala: Ježíšková

Návrh protokolu pro banking vzorků AML pacientů pro potřeby projektů CELL

1. Uchování vstupních vzorků nových AML pacientů:

Vstupní materiál	Izolovaná NK	Forma skladování	Minimální množství NK
PB	DNA	Izolovaná DNA	2 µg
	RNA	RNA lyzát	2 µg
BM	DNA	Izolovaná DNA	2 µg
	RNA	RNA lyzát	2 µg

Uchovávání DNA a RNA lyzátů při teplotě -20°C. Uchování RNA při -70°C.

V případě, kdy laboratoř nemůže zajistit minimální množství NK pro archivaci, lze alternativně použít metodu vitálního zamrazování buněk (viz. bod. 3) a uchování v tekutém dusíku.

2. Součástí zaslaných záchyťových odběrů u nového pacienta s AML bude jako další materiál ke zpracování (s cílem využít DNA pro metody next generation sequencing) odebrán kousek nehtu (dodán na sucho v 1,5 ml mikrozkuřavce).

Uchování: pouze shromažďování mikrozkuřavek (bez izolace), možno skladovat při laboratorní teplotě.

3. Uchování všech následných odběrů AML pacientů (bez ohledu na to, zda-li byl či nebyl v záchyťu detekován pozitivní marker):

Vstupní materiál	Izolovaná NK	Forma skladování
PB	DNA	Vitálně zamražené buňky
	RNA	
BM	DNA	Vitálně zamražené buňky
	RNA	

Uchovávání buněk v tekutém dusíku.

4. Odběry vzorků AML pacientů (bez ohledu na to, zda-li při záchyťu měli či neměli pozitivní nějaký molekulární marker) budou kliniky odebírány a zasílány v těchto časových intervalech:

- po indukci
- po poslední konsolidaci
- po transplantaci (alo i auto – logní) + štěp u autologní transplantace

- „extra vzorek“ při relapsu během léčby
- a dále v průběhu prvního roku každé 2-3 měsíce
- v průběhu druhého roku pouze vzorek v případě relapsu pacienta (molekulárního či hematologického)

Návrh definice molekulární odpovědi na léčbu

1. **odpověď na iniciální léčbu** – srovnání se vstupní hodnotou před léčbou
 - kompletní molekulární remise – redukce molekulárního markeru v PK a KD na hodnotu 0
 - parciální molekulární remise – pokles detekce molekulárního markeru v PK a KD minimálně o 1 řád
 - „stable disease“ – detekce molekulárního markeru v PK a KD v tom jistém řádu jako při zahájení terapie
 - molekulární progrese – zvýšení hodnot molekulárního markeru v PK nebo KD minimálně o 1 řád (nutnost confirmace za 7-14 dní)
2. **odpověď na léčbu molekulárního relapsu** – srovnání s hodnotou při molekulárním relapsu
 - kompletní molekulární remise – redukce molekulárního markeru v PK a KD na hodnotu 0
 - parciální molekulární remise – pokles detekce molekulárního markeru v PK a KD minimálně o 1 řád
 - „stable disease“ – detekce molekulárního markeru v PK a KD v tom jistém řádu jako při zahájení terapie
 - molekulární progrese – zvýšení hodnot molekulárního markeru v PK nebo KD minimálně o 1 řád (nutnost confirmace za 7-14 dní)

Návrh definice molekulárního relapsu

konfirmované znovu se objevení molekulárního markeru v PK nebo KD, anebo jeho 10násobný vzestup u pacientů s perzistentní pozitivitou, a současně negativita KD v cytologickém, flowcytometrickém (v rozsahu 10^{-3}) a cytogenetickém vyšetření a nepřítomnost extramedulárního postižení

Návrh terapie molekulárního relapsu – postup u každého pacienta přísně individuální!

1. netransplantovaní pacienti:
 - konvenční chemoterapie (typu „3+7“, „5+2“) s cílem urgentní alogenní HSCT
 - low dose cytarabine
 - clofarabine
2. transplantovaní pacienti
 - nárazové vysazení imunosupresivní terapie
 - podání dárcovských lymfocytů ± chemoterapie
 - low dose cytarabine