

·标准与讨论·

急性髓系白血病微小残留病检测与临床解读 中国专家共识(2021年版)

中华医学会血液学分会实验诊断学组

通信作者:吴德沛,苏州大学附属第一医院,国家血液系统疾病临床医学研究中心
215006, Email: wudepei@suda.edu.cn; 黄晓军,北京大学人民医院,北京大学血液病研究所,
国家血液系统疾病临床医学研究中心,造血干细胞移植治疗血液病北京市重点实验室
100044, Email: huangxiaojun@bjmu.edu.cn

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2021.11.002

Chinese consensus on minimal residual disease detection and interpretation of patients with acute myeloid leukemia (2021)

Laboratory Diagnosis Group, Chinese Society of Hematology, Chinese Medical Association

Corresponding author: Wu Depei, the First Affiliated Hospital of Soochow University,
National Clinical Research Center for Hematologic Diseases, Jiangsu Institute of
Hematology, Suzhou 215006, China. Email: wudepei@suda.edu.cn; Huang Xiaojun, Peking
University People's Hospital, Peking University, Institute of Hematology, National Clinical
Research Center for Blood Diseases, Beijing 100044, China. Email: huangxiaojun@bjmu.
edu.cn

急性髓系白血病(AML)是一种来源于造血干细胞的血液系统恶性疾病,以髓系来源的异常分化原始细胞克隆性扩增为特征,年龄<60岁的患者长期生存率为35%~45%,年龄≥60岁的患者长期生存率仅为10%~15%^[1-3]。白血病复发是提高AML疗效的主要瓶颈。国内外的研究表明微小残留病(MRD)检测不仅可用于疗效评估、复发预警,还可用于指导治疗方法的选择以及抢先干预^[4-15]。因此,MRD检测已成为降低白血病复发、提高疗效的关键环节之一。AML患者的MRD检测方法包括多参数流式细胞术(MFC)、实时定量聚合酶链反应(RQ-PCR)技术以及数字PCR(dd-PCR)和二代测序技术(NGS)等,其中dd-PCR和NGS尚处于临床研究阶段,未被常规用于MRD评估^[10,16-18]。目前,我国尚缺乏针对AML患者MRD检测以及如何将MRD检测结果应用于临床的指南或共识。为推动MRD在AML诊疗中的规范化应用、提高诊治水平,中华医学会血液学分会实验诊断学组组织国内AML诊疗领域的相关专家,结合国内外相关研究进展,制定了AML患者MRD检测与临床解读的中国专家共

识。该共识包括:MRD的概念和检测方法、MFC和分子生物学方法检测MRD、检测结果的临床解读等部分,具体如下。

一、MRD的概念和检测方法

就AML而言,MRD是指初诊或难治/复发状态的患者经化疗、靶向治疗、嵌合抗原受体T细胞和(或)异基因造血干细胞移植(allo-HSCT)等治疗获得血液学完全缓解(CHR,骨髓涂片经瑞特-吉姆萨染色,光学显微镜检测原始细胞<5%)后体内残存的少量白血病细胞^[19-21]。健康成人骨髓有核细胞数为 $(10 \sim 13) \times 10^9/\text{kg}$;一个体重70 kg的患者骨髓有核细胞数量为 $(0.7 \sim 0.9) \times 10^{12}$,如果以骨髓细胞形态学的5%为阈值,那么AML患者获得CHR时,体内还剩余 10^{10} 左右的白血病细胞^[19-20];与CHR相比,MRD检测的敏感性为 $10^{-2} \sim 10^{-6}$ (图1)。AML患者获得CHR并继续接受治疗后的转归如下:①极少数患者发生早期复发;②部分患者呈MRD持续阳性状态,最终发生晚期复发;③部分患者由MRD阳性进入MRD阴性状态,即用现有的MFC、RQ-PCR和NGS等方法在患者体内检测不到白血病细胞;部分

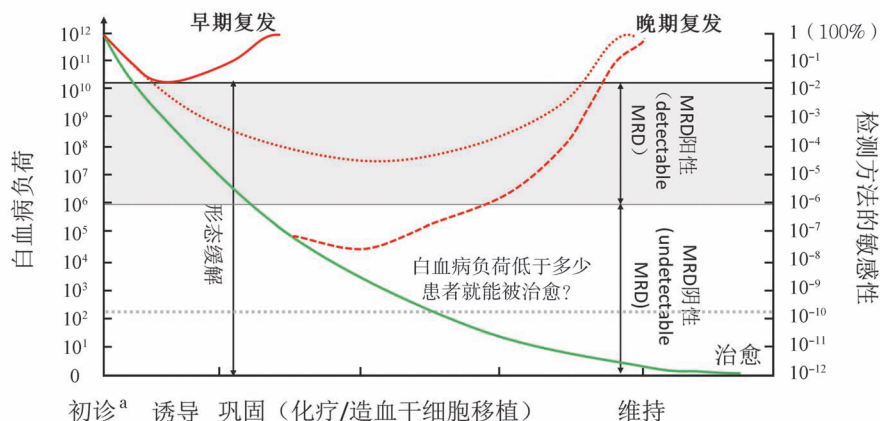
MRD 阴性患者可再次转为 MRD 阳性导致晚期复发;部分患者获得临床治愈(图 1)。现今,国内外学者尚不清楚 AML 患者经过诱导治疗、巩固治疗后体内的白血病负荷低于哪个“阈值”就可停止治疗,最终达到治愈的目标。

关于 MRD 有两个英文名词,即 minimal residual disease(微小残留病)和 measurable residual disease(可检测到的残留病),前者和上面所述的概念一致^[10,22];后者是指 AML 患者经过治疗后,无论获得 CHR 与否,体内可检测到的白血病细胞。迄今为止,在已经发表的国内外文献中,多数作者通过确定阈值将 MRD 分为阳性和阴性两种状态^[5,8-9,11-15];然而,由于敏感性所限,文献中所描述的 MRD 阴性是指用现有方法检测不到患者体内存在白血病细

胞,即 MRD 阴性可以是体内存在白血病细胞但检测不到,也可以是体内已不存在白血病细胞。因此,部分学者提出将 MRD 阳性和 MRD 阴性分别称为“detectable MRD(可检测到 MRD)”和“undetectable MRD(未检测到 MRD)”^[23]。目前,临床常规应用和正在临床研究阶段的 AML MRD 检测方法见表 1。

(一)MFC 检测 MRD

临床实践中,用于 MFC 评估表型异常白血病细胞的单克隆免疫荧光抗体包括 CD34、CD117、CD13 和 CD33,跨系表达抗原 CD2、CD7、CD19 和 CD56 等^[6-7,9-11,13,15];需要注意的是,以 CD7 等标志进行 MRD 检测和分析时应考虑其在正常造血细胞上的表达情况。利用 MFC 检测 MRD 的方法包括白血病



AML:急性髓系白血病;MRD:微小残留病;detectable MRD:可检测到的MRD;undetectable MRD:不能检测到的MRD。^a除初诊患者以外,难治/复发AML治疗后也需进行MRD评估

图1 AML患者治疗后MRD检测与疗效/预后模式图

表1 不同方法检测AML患者MRD的比较

检测方法	敏感性	常规应用	评价
MFC	$10^{-3} \sim 10^{-5}$	是	优点:简便快捷、费用低,适用90%以上的AML人群 缺点:抗原漂移;不能确定特定白血病亚群;分析过程复杂
RQ-PCR			
融合基因/NPM1突变	$10^{-4} \sim 10^{-6}$	是	优点:特异性好,敏感性高,相对便宜,易标准化 缺点:耗时间、要求靶基因在疾病治疗过程中稳定表达、适用部分、RNA不稳定;仅适用30%~60%的人群
WT1	10^{-2}	是	优点:适用80%~90%的AML人群 缺点:敏感性低、缺乏疾病特异性
dd-PCR	$10^{-4} \sim 10^{-6}$	否	优点:绝对定量,不需要标准化曲线 缺点:同RQ-PCR
二代测序技术	$10^{-3} \sim 10^{-6}$	否	优点:可以同时检测多种突变位点,可观察克隆演变,高通量 缺点:费用高、结果易受背景噪音影响、无标准化

注:AML:急性髓系白血病;MRD:微小残留病;MFC:多参数流式细胞术;RQ-PCR:实时定量聚合酶链反应;dd-PCR:数字聚合酶链反应

相关异常表型(LAIP)以及与正常骨髓细胞表型相鉴别(D-F-N, different from normal),前者是指初诊时确定患者的 LAIP,在随后的治疗过程中利用 LAIP 进行 MRD 检测;后者可用于缺乏初诊 LAIP 的患者,也可检测治疗过程中出现的抗原漂移(Antigen shift)。LAIP 和 D-F-N 相结合既适用于缺乏初诊 LAIP 的患者,又可检测新出现的表型异常或 LAIP 发生的抗原漂移^[10, 16, 24-29]。本专家共识推荐:联合应用 LAIP 与 D-F-N 两种方法检测已知和(或)验证未知的、具有预后意义的白血病细胞表型异常。

1. 检测技术要求:

(1)流式细胞仪:诊断学组专家推荐应用至少八色荧光标记的 MFC 对本标本进行 MRD 检测以提高特异性。不同实验室或同一实验室不同仪器应遵循标准化操作流程,参见《多参数流式细胞术检测急性白血病及浆细胞肿瘤微小残留病中国专家共识(2017 年版)》^[30]。

(2)抗体组合和荧光标记:用于 MRD 检测抗体组合^[6-7,9-11,13,15,30-31]包括:①骨干抗体有 CD45、CD117、CD34、CD13 以及 CD33;②其他抗体:例如借助 CD4、CD11b、CD14、CD64 和 HLA-DR 等评估单核、粒-单核 AML 的 MRD,利用 CD7、CD19、CD56 等评估跨系抗原表达,应用 CD133、CD38 和 CD123 等检测白血病干/祖细胞。

专家组推荐的八色 MFC 抗体组合如下:CD38-FITC/CD33- PE- Cy5.5/CD34- PE- Cy7/CD13- APC/HLA- DR- APC- H7 (或 APC- Cy7 或 APC-AlexaFluor750)/CD117-Bv421/CD45-Pacific Orange, PE 通道可选择的抗体包括 CD56、CD19、CD2、CD4、CD5、CD7、CD11b、CD64、CD15、CD123、NG2 (anti-7.1)、CD10 等;对于配备十色 MFC 的中心,可针对 PE、Bv605/ECD 或 APC-R700 三个检测通道从可选择抗体中调配 MRD 检测十色抗体组合^[10,30-31];各中心应根据 AML 亚型,可选择 1 管或多管抗体组合进行 MRD 检测。专家组建议运用典型 LAIP 与 D-F-N 方法检测所有异常表达(包括诊断时和治疗后新增的异常表达),在诊断和随访中应用完整的抗体组合方案。

(3)标本采集储存:①MFC 检测 MRD 所需标本可采用乙二胺四乙酸或肝素抗凝,二者无显著区别。②利用外周血(PB)标本比骨髓(BM)标本检测到的 MRD 低 1 个数量级,因此,专家组不推荐应用

MFC 检测 PB 标本中的 MRD。③为了确保 MFC 检测的敏感性,避免 PB 稀释 BM 标本,专家组建议使用抽取的第一管骨髓液(3~5 ml)进行 MRD 评估,因为标本中 PB 含量随 BM 抽取量增加而增加,易导致 BM 有核细胞被稀释。如果 BM 标本中成熟中性粒细胞大于 90%,则提示所采集的标本被 PB 稀释。针对不同的 AML 患者和治疗的不同的时间点,骨髓穿刺操作者采集的 BM 标本体积应该保持一致。④BM 标本运输条件:临床常规检测和(或)多中心协作检测时,在室温条件下 BM 样本应于 3 d 内完成抗体标记和检测^[10,30]。

(4)样本抗体标记与检测:MRD 检测前的标本准备工作包括:①先行荧光抗体标记,再裂解红细胞,清洗过程中尽最大可能减少细胞丢失;②先裂解红细胞,清洗后再行荧光抗体标记,优点是所有标记的流式管采用相同的操作流程。专家组推荐避光孵育条件下进行抗体标记。

MFC 检测 MRD 的方法参见《多参数流式细胞术检测急性白血病及浆细胞肿瘤微小残留病中国专家共识(2017 年版)》的“MRD 检测质控和标准化”部分^[30]。

2. MRD 的识别和评估:关于 MFC 检测的 MRD 识别和评估问题,专家组建议使用商用程序,同时确保仪器、设备、抗体组合等的标准化^[10,26-28,30],本共识具体推荐如下:①如初诊时 LAIP 明确,则用 LAIP 测定 MRD;如初诊时 LAIP 不明确,则采用 D-F-N 方法确定新的 LAIP;注意患者之间 LAIP 的个体化差异。②计算 LAIP 和(或)D-F-N 方法检测的 MRD 细胞占 CD45⁺细胞的比例。③获取有核细胞数量 50 万~100 万(除外 CD45⁺细胞和碎片),除在标本获取过程中看到明确的 MRD 细胞群以外,其他残留白血病细胞亚群需由技术熟练的操作者/具备流式细胞术专业知识的人员来确定。

3. MFC 检测的 MRD 报告方式:MFC 检测的 MRD 出具报告时应注意以下事项^[10,30-31]:① LAIP 细胞的免疫表型特征及其占 BM 或 PB 有核细胞的比例,有条件的单位可报告有核细胞和 LAIP 的绝对数量。②对于初诊时的 LAIP,应计算其占初诊白血病原始细胞的百分比。③临床医师和实验室应协商是否需要确定 MRD 的阈值,如果没有利用 MFC 检测到确定的 MRD 细胞,应该在报告上写明 MRD 检测阴性。④报告还应包括细胞活性、BM 标本的增生程度、是否被 PB 稀释;如果可检测的细胞数量

少,则在报告 LAIP 时给出检测到的总有核细胞数量。此外,欧洲白血病网(ELN)MRD 工作组的共识推荐^[10]:如果 MFC 检测到的 MRD < 0.1%,应该在报告中写明“利用 MFC 可定量检测到 MRD,但其临床意义不明”。然而,国内多数学者的研究表明 MRD 阳性(即 MRD > 0)和阴性(即 MRD 为 0)二分类划分即可很好地预测预后^[5,8-9,11-15]。因此,本共识建议在报告中清晰描述 MFC 检测到的 MRD 水平即可。

4. MFC 检测的 MRD 临床解读:

(1)MRD 阈值的确定:ELN MRD 共识推荐 MFC 检测 AML 患者 MRD 的阈值为 0.1%^[10]。然而,由于阈值受到治疗方法、检测时间点以及标本类型等多种因素的影响,MRD 的最佳阈值确定尚存争议。本共识建议国内学者积极开展前瞻性、多中心研究确定不同治疗场景下 MFC 检测到的 MRD 阈值,以实现阈值个体化。

(2)临床预后和指导治疗:①诱导和巩固治疗后 MFC 检测 MRD 阳性提示复发率高、预后不良;对于无 NPM1 突变的成年 AML 患者,第 2 个疗程诱导治疗后 MFC 检测 MRD 阳性的患者可考虑选择 allo-HSCT 以改善预后^[15]。②allo-HSCT 前 MFC 检测到的 MRD 阳性也提示复发率高、预后不良;我国学者的研究结果提示对于移植前 MFC 检测 MRD 阳性的 AML,单倍型相合移植的疗效优于 HLA 相合同胞供者移植^[5,13]。③移植后 MRD 不仅预测复发,而且指导的抢先干预(例如供者淋巴细胞输注)可以降低血液学复发率,改善移植预后^[32]。

此外,专家组的推荐还包括:①不建议缺乏经验的中心开展 MFC 检测 MRD 项目;②未来 AML 患者 MFC 检测 MRD 的自动化分析方法很重要,值得研究;③白血病干细胞(LSC)是 AML 复发的根源^[33],应开展临床试验评估 LSC 在 AML 患者 MRD 检测中的价值。

(二)分子学方法检测 MRD

MRD 的分子学检测方法有 PCR 和测序技术:PCR 包括定性 PCR、RQ-PCR、dd-PCR 等;测序技术包括 Sanger 测序和 NGS 等。虽然 RQ-PCR 具有较高敏感性,但仅有不足 40% 的 AML 患者携带白血病特异性分子标志^[16-18,34-38]。随着生物信息学等技术的进步,我们极有可能利用 NGS 等方法解决其他 60% 左右 AML 患者的 MRD 检测问题。专家组推荐 RQ-PCR 常规用于 AML 患者的 MRD 评估;

dd-PCR 和 NGS 是否常规用于 AML 患者 MRD 的评估尚待今后的研究验证。

1. MRD 评估的分子标志:

(1)确定的分子标志:白血病融合基因 RUNX1-RUNX1T1、CBFβ-MYH11 和 PML-RARα 以及 NPM1 突变在治疗后的持续存在是预测 AML 复发的可靠分子标志,RQ-PCR 检测上述标志的敏感性为 $10^{-4} \sim 10^{-6}$ ^[4,12,14,34-38]。获得 CHR 的 AML 患者体内可检测到 DNMT3A、ASXL1 和 TET2 等前白血病克隆相关突变,由于这些突变也可见于健康人群,且发生率随年龄增大而增加,也被称为年龄相关的克隆造血或意义未明的克隆性造血(CHIP)^[39-41],因此,这些突变的复发预测意义仍待证实。在 AML 患者中,上述突变常发生在恶性转化的极早期阶段,对一些晚期发生的获得性突变,目前还不能确定其能否作为 AML MRD 检测的可靠标志。

对于更多的 AML 患者来说,泛白血病基因——WT1 可作为缺乏特异性基因的 AML 患者的 MRD 标志^[7]。在中国,尚缺乏条件对每例初治患者进行全基因组测序来找到个体特异性分子标志,因此,WT1 成为实用、快捷的 MRD 监测指标。初诊时,80%~90% 的 AML 患者伴 WT1 表达升高;对缺乏特异性基因标志的患者而言,可在诱导缓解后、巩固治疗和结束治疗后以及移植前后单独利用 WT1,或联合 MFC 评估 MRD 水平^[42]。

(2)其他分子标志:由于 FLT3-ITD、FLT3-TKD、NRAS、KRAS、IDH1 和 IDH2 等部分基因突变在 AML 患者复发时存在不稳定现象(如初诊阳性突变,复发时可阴性,或初诊阴性而复发时新出现),这些分子标志不适合作为单独的 MRD 标志;但上述分子异常与其他 MRD 标志物联合应用时,可明显降低假阳性和假阴性率^[10,16-18,34-38]。此外,包括 RUNX1、GATA2、CEBPA、DDX41 和 ANKRD26 在内的某些胚系基因突变与 AML 发生风险相关^[10],如果把这些基因突变作为 MRD 评估的标志,就需要应用 DNA 测序的方法除外它们是胚系组织(皮肤组织、毛囊或颊黏膜)来源的突变^[43]。如果治疗后原始细胞数量下降,但基因突变的等位基因变异频率(VAF)并未随肿瘤负荷平行下降,应根据基因的种类考虑胚系基因突变或 CHIP 的可能性。

多个 MRD 分子标志物组合应用可克服单个分子标志物评估 MRD 的缺陷,该缺陷包括 AML 亚克隆的异质性和 CHIP 的存在对 MRD 的影响

等^[10,44-45]。NGS 检测 MRD 的进展使借助组合标记检测 MRD 变得切实可行^[16-18]。例如,AML 患者可存在 TP53、ASXL1 和 PTPN11 突变;在患者获得 CHR 状态后,高 VAF 的 ASXL1 突变可能由克隆造血所致,不能被用来评估 MRD;PTPN11 突变克隆可被化疗成功清除;此时,TP53 克隆的持续存在可能是复发的根源^[10]。因此,同时分析数个分子标志有助于提早预测分子复发。在接受 allo-HSCT 的患者中,受者造血系统肿瘤相关的胚系突变和 CHIP 相关突变未来也可能成为移植后 MRD 评估的标志^[40]。

2. 分子标志检测 MRD 的技术要求:专家组推荐 cDNA 而非 DNA 用于基因检测;RUNX1-RUNX1T1、CBFβ-MYH11 和 PML-RARα 融合基因的具体检测方法参见文献^[34-35]。根据欧洲抗癌计划标准^[34-35],每个样本应同时进行 3 个反应,PCR 结果阳性定义为 3 个重复反应中至少 2 个反应 Ct 值 ≤40 [循环阈值(CT)为 0.1]。作为对照,专家组建议同时包括野生型样品(正常对照),以及至少 2 个覆盖所需灵敏度范围的阳性对照和非目标对照(水对照)。如果阳性对照是从质粒产生的,则定期监测质粒稳定性。

PCR 方法检测 MRD 时,推荐应用 1 μg RNA 逆转录为 cDNA,每次反应的 cDNA 相当于 100 ng RNA (约为 200 000 个细胞,如果基因表达水平高则需要的细胞数量少)。对于基于 DNA 的方法,每次反应需要至少 100 ng DNA (约为 15 000 个细胞),理想目标是每次反应达到 1000 ng (约为 150 000 个细胞)。管家基因 ABL 的拷贝数至少应该为 10 000 拷贝(无论是基于 RNA 还是 DNA 的方法)。1000~9999 ABL 拷贝数的管家基因数量也可以报告 MRD 结果,但需要特别标明管家基因拷贝数低于理想值^[34-35]。

MRD 从阴性转为阳性后,应使用 2 种方法来控制重复样品中的检测变异性:其一,在复核检测的样本中,应包括可疑分子复发的初始样本;其二,如果 MRD 检测采用 RQ-PCR 方法,标准曲线应覆盖到患者样本可能的 CT 值范围,以确保检测的 MRD 水平在此线性范围内。如果 MRD 结果为阴性,确认检测的敏感性至关重要^[34-35]。在计算单独一次 RQ-PCR 结果的敏感性时建议应用下面的公式,它可用于绝对定量,即利用外源性质粒标准品估计目标分子的个数,和相对定量一样。

$$X = [(CT_{\text{目标基因}} - CT_{\text{ABL}})_{\text{FU}} - (CT_{\text{目标基因}} - CT_{\text{ABL}})_{\text{诊断}}] / \text{斜率}$$

方法的敏感性 = 10^X

公式中 ABL 指管家基因 ABL;诊断指诊断时进行 MRD 检测;FU 指随访时进行 MRD 检测;斜率指标准曲线的斜率,如果方法的效率为 100%,则斜率为 -3.32;目标基因指 MRD 检测的目标基因。

3. 分子学 MRD 结果报告方式:各临床中心血液诊断实验室出具分子学 MRD 报告时应注意以下事项^[10]:①写明 MRD 检测的靶基因,如 NPM1、CBFβ-MYH11 等;②标明所应用的技术,如 RQ-PCR;③标明标本来源,如 BM 或 PB 等;④标本质量是否适合行 MRD 检测;⑤靶基因的定量,如 CBFβ-MYH11 基因的拷贝数和 CT 值;⑥对照基因,如 ABL 和其 CT 值以及定量;⑦标明检测方法的敏感性等。此外,有条件的单位可以给出所检测基因预测 AML 患者治疗后复发的阈值,并就下次复查的时间给出建议。

4. 分子学 MRD 的临床解读:

(1)分子学 MRD 的概念^[10]:①完全分子学缓解(CR_{MMRD}):定义 CR_{MMRD}的前提是患者必须获得 CHR,连续两次分子学 MRD 阴性,标本采集间隔时间 ≥4 周,检测方法敏感性至少为 10^{-3} 。②低水平分子标志持续存在:指患者处于 CHR,分子生物学 MRD 标志持续低水平存在和治疗结束后任何两份阳性标本之间基因检测的拷贝数相对上升 < 1 个数量级。③分子学进展:低水平分子标志持续存在患者,任何两份阳性标本之间 MRD 标志基因检测拷贝数升高 ≥ 1 个数量级。④分子学复发:患者处于 CHR 且 CR_{MMRD}后,再次出现 MRD 阳性,两份阳性标本之间 MRD 水平上升 ≥ 1 个数量级。

(2)临床解读:

①急性早幼粒细胞白血病(APL):对于 APL 患者而言,最重要的 MRD 终点是巩固治疗后 RQ-PCR 检测 PML-RARα 融合基因为阴性;治疗过程中 PML-RARα 阳性不是更换治疗方案的指征;治疗结束后,PML-RARα 从检测不到至可检测到(PB/BM 作为标本,重复两次检测阳性)预警 APL 血液学复发^[37,46-48]。

对于 Sanz 积分为低、中危,并接受全反式维甲酸(ATRA)联合蒽环类药物治疗的患者,临床医师应在诱导治疗后检测 BM MRD;在缓解后的 2 年内每 3 个月检测 1 次 BM 或 PB 中的 MRD。如果患者接受 ATRA+砷剂治疗,临床医师就要持续检测 BM

MRD 直到患者获得 CR_{MMRD}-, 然后停止检测。对于 Sanz 积分高危患者而言, 临床医师应在治疗期间每 3 个月检测 1 次 PB 或 BM 的 MRD, 持续至少 2 年^[46-49]。大约 1/3 的 APL 患者可检出 FLT3 突变, 但不影响 APL 治疗, 也无需对该突变进行持续检测。

②CBFβ-MYH11 阳性 AML: 该亚型 AML 患者 2 个疗程巩固治疗后和化疗结束后 CBFβ-MYH11 检测水平与疾病复发相关。对于巩固治疗 2 个疗程后 CBFβ-MYH11/ABL 水平 > 0.1% 的 AML 患者而言, allo-HSCT 可使他们获益^[50]。值得注意的是该亚型患者巩固治疗过程中可能持续检测到 CBFβ-MYH11 转录本的低水平、稳定存在, 但并不一定提示疾病复发^[51]。

③RUNX1-RUNX1T1 阳性 AML: 对于伴 t(8;21) 的 AML 患者而言, 巩固治疗 2 个疗程后 RUNX1-RUNX1T1 转录本下降 > 3 个数量级是预后良好的标志, 复发率明显低于下降 ≤ 3 个数量级的患者^[12,52]。由于 RUNX1-RUNX1T1 转录本由阴性转为阳性至血液学复发时间较短, 建议治疗过程中及结束治疗后早期每月检测 1 次。北京大学血液病研究所的前瞻性临床研究结果显示对于巩固治疗 2 个疗程后转录本下降 < 3 个数量级的患者, 后续接受 allo-HSCT 可以改善预后^[12]。

④伴有 NPM1 突变的 AML: 诱导治疗 2 个疗程后 PB 标本中 NPM1 突变的存在提示复发率高, 预后不良^[14,38]。如果治疗结束后 PB NPM1 突变阴性, 但 BM 阳性, 专家组建议每 4 周检测 PB/BM NPM1 突变 1 次, 至少持续 3 个月。如果 NPM1 突变水平上升 1 个数量级, 就应该启动挽救治疗。如果 NPM1 突变水平检测不到, 则应该在治疗结束后的 2 年内, 每 3 个月评估 1 次 MRD^[45,53]。

⑤其他分子标志: 关于其他分子标志物 (如 BCR-ABL1、WT1、FLT3-ITD、RUNX1、KMT2A-MLLT3 或 KMT2A-ELL 等) 的阈值和检测的时间点还没有形成共识^[54-55]。

二、AML 患者 MRD 检测的其他推荐

(一) 推荐临床试验中的 MRD 检测

无论是化疗还是 allo-HSCT 场景下, 获得 CHR 后 MRD 阳性的 AML 患者都是复发高危人群, 这些患者应该考虑进入临床试验^[56-58], 并以明确现有方法或试验性方法能否改善 MRD 阳性患者的预后作为临床试验的目标。专家组建议对于纳入临床试验的患者, 应遵循本共识的推荐方法在疗效评估的

每个时间点进行 MRD 检测。

(二) 以 MRD 作为替代终点加速药物获批

MRD 在临床实践中预警复发、指导治疗方案选择的价值已经很明显, 但是在 AML 临床试验中将 MRD 作为替代研究终点还需更多的证据^[59-60]。如果 MRD 阴性作为生存的替代终点, 对新药评价极有帮助, 可能加速有效药物获批, 提前终止疗效不佳药物的临床试验。目前 2 项研究强烈提示 MRD 可以作为生存的替代终点, 在核心结合因子相关 AML (CBF-AML) 临床研究中, 大剂量柔红霉素改善临床预后与 MRD 水平密切相关^[59]; 另一项研究中, 初诊 AML 患者的诱导方案中加入维奈克拉改善预后也与 MRD 状态密切相关^[60]。

三、MRD 检测的标本和时间点

在 AML 治疗期间, MFC 以及分子生物学 MRD 评估的时间点包括初诊、2 个疗程标准诱导治疗后、巩固治疗后和治疗结束后^[6-7,9-11,13,15,30-31]。对于接受 allo-HSCT 的患者而言, 应在末次化疗结束后 (或在预处理前的 4 周内) 采集 BM 和 (或) PB 行 MRD 检测。建议有条件的中心可在患者诱导、巩固治疗的每个疗程结束后评估 1 次 MRD; 移植后半年内每个月评估 1 次 MRD, 移植后半年到 2 年内每 3~6 个月评估 1 次。此外, 对于结合临床表现怀疑患者疾病的任意时间点均推荐进行 MRD 的检测。

推荐应用 BM 标本进行 MFC 检测 MRD; 推荐应用 BM (首选) 或 PB (次选) 标本进行分子学 MRD 检测。

四、小结

总之, 在过去的十年余中, MRD 检测在 AML 患者疗效评估、复发预警以及指导干预和治疗方法选择等方面取得很大进展, 但白血病复发仍然是 AML 患者治疗后最主要的死亡原因之一。规范 MRD 检测、准确解读 MRD 的临床意义并指导个体化治疗对降低 AML 治疗后的复发率、改善生存至关重要。随着今后在 AML 诊疗领域 MRD 研究和临床实践的进展, 本共识将不断更新、逐步完善。

(执笔: 常英军、陈苏宁、赵晓魁、徐杨)

参与共识制定和讨论的专家 (以专家所在单位的首字母排序, 同一单位多个专家按照姓氏首字母排序): 安徽省立医院 (孙自敏); 北京大学人民医院、北京大学血液病研究所 (常英军、黄晓军、赵晓魁); 第四军医大学附属西京医院 (高广勋); 大连大学附属中山医院 (方美云); 广西医科大学附属第一医院 (赖永榕); 广东省人民医院 (杜欣); 贵州医科大学附属医院 (王季石); 哈尔滨血液病肿瘤研究

所(马军);华中科技大学同济医学院附属协和医院(胡豫、梅恒);华中科技大学同济医学院附属同济医院(周剑峰);河北医科大学第二医院(任金海);河南省肿瘤医院(宋永平);海南省肿瘤医院(姚红霞);解放军总医院第一医学中心(刘代红);吉林大学第一医院(高素君);兰州大学第二医院(张连生);陆军军医大学新桥医院(张曦);同济大学附属同济医院(梁爱斌);南方医科大学南方医院(刘启发、张钰);南昌大学第一附属医院(李菲);南京医科大学第一附属医院(李建勇);内蒙古医科大学附属医院(韩艳秋);宁夏医科大学附属医院(崔丽娟);青海省人民医院(李文倩);苏州大学附属第一医院(陈苏宁、吴德沛、徐杨);上海交通大学附属瑞金医院(李军民、沈扬、赵维莅);上海交通大学附属上海市第一医院(宋献民);四川大学华西医院(牛挺);山西医科大学第二医院(杨林花);山东大学齐鲁医院(侯明、纪春岩);山东省立医院(王欣);新疆医科大学附属第一医院(江明);第二军医大学长海医院(杨建民);云南省人民医院(杨同华);中国医学科学院血液病医院、血液学研究所(王建祥、魏辉、肖志坚);浙江大学附属第一医院(金洁);中国医学科学院北京协和医院(李剑、周道斌);中南大学湘雅医院(徐雅靖);中国医科大学附属第一医院(颜晓菁);郑州大学第一附属医院(姜中兴)

参考文献

- [1] Short NJ, Rytting ME, Cortes JE. Acute myeloid leukaemia [J]. *Lancet*, 2018, 392 (10147):593-606. DOI:10.1016/S0140-6736 (18)31041-9.
- [2] Döhner H, Estey E, Grimwade D, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel [J]. *Blood*, 2017, 129(4):424-447. DOI: 10.1182/blood-2016-08-733196.
- [3] 中华医学会血液学分会白血病淋巴瘤学组. 成人急性髓系白血病(非急性早幼粒细胞白血病)中国诊疗指南(2017年版) [J]. *中华血液学杂志*, 2017, 38 (3): 177-182. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2017.03.001.
- [4] Wei H, Liu X, Wang Y, et al. Optimized clinical application of minimal residual disease in acute myeloid leukemia with RUNX1-RUNX1T1 [J]. *Exp Hematol*, 2021, 96:63-72.e3. DOI: 10.1016/j.exphem.2021.01.007.
- [5] Guo H, Chang YJ, Hong Y, et al. Dynamic immune profiling identifies the stronger graft-versus-leukemia (GVL) effects with haploidentical allografts compared to HLA-matched stem cell transplantation [J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18 (5):1172-1185. DOI: 10.1038/s41423-020-00597-1.
- [6] 卢岳, 吴彤, 王卉, 等. 预处理前多参数流式细胞术监测的微小残留病对急性髓系白血病异基因造血干细胞移植预后的影响 [J]. *中华血液学杂志*, 2017, 38 (2): 118-123. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2017.02.007.
- [7] 赵晓甦, 莫晓冬, 洪艳, 等. WT1 基因和流式细胞术监测骨髓增生异常综合征造血干细胞移植后微小残留病的意义 [J]. *中华血液学杂志*, 2018, 39 (12): 998-1003. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2018.12.006.
- [8] Wang J, Lu R, Wu Y, et al. Detection of measurable residual disease may better predict outcomes than mutations based on next-generation sequencing in acute myeloid leukaemia with biallelic mutations of CEBPA [J]. *Br J Haematol*, 2020, 190(4):533-544. DOI: 10.1111/bjh.16535.
- [9] Liu J, Ma R, Liu YR, et al. The significance of peri-transplantation minimal residual disease assessed by multiparameter flow cytometry on outcomes for adult AML patients receiving haploidentical allografts [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2019, 54 (4): 567-577. DOI: 10.1038/s41409-018-0300-8.
- [10] Schuurhuis GJ, Heuser M, Freeman S, et al. Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party [J]. *Blood*, 2018, 131(12):1275-1291. DOI: 10.1182/blood-2017-09-801498.
- [11] 刘竞, 刘艳荣, 王亚哲, 等. 移植前免疫表型缓解与血液形态学缓解对急性髓系白血病患者同胞HLA相合造血干细胞移植疗效预测价值的比较 [J]. *中华血液学杂志*, 2018, 39 (8): 617-623. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2018.08.001.
- [12] Zhu HH, Zhang XH, Qin YZ, et al. MRD-directed risk stratification treatment may improve outcomes of t(8;21) AML in the first complete remission: results from the AML05 multicenter trial [J]. *Blood*, 2013, 121(20):4056-4062. DOI: 10.1182/blood-2012-11-468348.
- [13] Chang YJ, Wang Y, Liu YR, et al. Haploidentical allograft is superior to matched sibling donor allograft in eradicating pre-transplantation minimal residual disease of AML patients as determined by multiparameter flow cytometry: a retrospective and prospective analysis [J]. *J Hematol Oncol*, 2017, 10 (1):134. DOI: 10.1186/s13045-017-0502-3.
- [14] Balsat M, Renneville A, Thomas X, et al. Postinduction Minimal Residual Disease Predicts Outcome and Benefit From Allogeneic Stem Cell Transplantation in Acute Myeloid Leukemia With NPM1 Mutation: A Study by the Acute Leukemia French Association Group [J]. *J Clin Oncol*, 2017, 35 (2):185-193. DOI: 10.1200/JCO.2016.67.1875.
- [15] Freeman SD, Hills RK, Virgo P, et al. Measurable Residual Disease at Induction Redefines Partial Response in Acute Myeloid Leukemia and Stratifies Outcomes in Patients at Standard Risk Without NPM1 Mutations [J]. *J Clin Oncol*, 2018, 36(15):1486-1497. DOI: 10.1200/JCO.2017.76.3425.
- [16] Thol F, Gabdoulline R, Liebich A, et al. Measurable residual disease monitoring by NGS before allogeneic hematopoietic cell transplantation in AML [J]. *Blood*, 2018, 132(16):1703-1713. DOI: 10.1182/blood-2018-02-829911.
- [17] Parkin B, Londoño-Joshi A, Kang Q, et al. Ultrasensitive mutation detection identifies rare residual cells causing acute myelogenous leukemia relapse [J]. *J Clin Invest*, 2017, 127 (9):3484-3495. DOI: 10.1172/JCI91964.
- [18] Patkar N, Kakirde C, Shaikh AF, et al. Clinical impact of panel-based error-corrected next generation sequencing versus flow cytometry to detect measurable residual disease (MRD) in acute myeloid leukemia (AML) [J]. *Leukemia*, 2021, 35 (5):1392-1404. DOI: 10.1038/s41375-021-01131-6.
- [19] HARRISON WJ. The total cellularity of the bone marrow in man [J]. *J Clin Pathol*, 1962, 15:254-259. DOI: 10.1136/jcp.15.3.254.

- [20] Hagenbeek A, Martens AC. Minimal residual disease in acute leukaemia: preclinical studies in a relevant rat model (BNML) [J]. *Baillieres Clin Haematol*, 1991, 4 (3):609- 635. DOI: 10.1016/s0950-3536(09)90004-x.
- [21] Hourigan CS, Karp JE. Minimal residual disease in acute myeloid leukaemia [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2013, 10 (8):460-471. DOI: 10.1038/nrclinonc.2013.100.
- [22] Nagler A, Baron F, Labopin M, et al. Measurable residual disease (MRD) testing for acute leukemia in EBMT transplant centers: a survey on behalf of the ALWP of the EBMT [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2021, 56 (1):218- 224. DOI: 10.1038/s41409-020-01005-y.
- [23] Baron F, Labopin M, Ruggeri A, et al. Impact of detectable measurable residual disease on umbilical cord blood transplantation [J]. *Am J Hematol*, 2020, 95 (9):1057- 1065. DOI: 10.1002/ajh.25879.
- [24] Sui JN, Chen QS, Zhang YX, et al. Identifying leukemia-associated immunophenotype-based individualized minimal residual disease in acute myeloid leukemia and its prognostic significance [J]. *Am J Hematol*, 2019, 94 (5):528- 538. DOI: 10.1002/ajh.25431.
- [25] Olaru D, Campos L, Flandrin P, et al. Multiparametric analysis of normal and postchemotherapy bone marrow: Implication for the detection of leukemia-associated immunophenotypes [J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2008, 74 (1):17-24. DOI: 10.1002/cyto.b.20371.
- [26] Kalina T, Flores- Montero J, van der Velden VH, et al. Euro Flow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols [J]. *Leukemia*, 2012, 26 (9): 1986-2010. DOI: 10.1038/leu.2012.122.
- [27] Johansson U, Bloxham D, Couzens S, et al. Guidelines on the use of multicolour flow cytometry in the diagnosis of haematological neoplasms. British Committee for Standards in Haematology [J]. *Br J Haematol*, 2014, 165 (4):455-488. DOI: 10.1111/bjh.12789.
- [28] Lacombe F, Bernal E, Bloxham D, et al. Harmonemia: a universal strategy for flow cytometry immunophenotyping- A European LeukemiaNet WP10 study [J]. *Leukemia*, 2016, 30 (8):1769-1772. DOI: 10.1038/leu.2016.44.
- [29] Zeijlemaker W, Gratama JW, Schuurhuis GJ. Tumor heterogeneity makes AML a "moving target" for detection of residual disease [J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2014, 86 (1):3- 14. DOI: 10.1002/cyto.b.21134.
- [30] 中国免疫学会血液免疫分会临床流式细胞术学组. 多参数流式细胞术检测急性白血病及浆细胞肿瘤微小残留病中国专家共识(2017年版) [J]. *中华血液学杂志*, 2017, 38 (12): 1001-1011. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2017.12.001.
- [31] Xu J, Jorgensen JL, Wang SA. How Do We Use Multicolor Flow Cytometry to Detect Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia? [J]. *Clin Lab Med*, 2017, 37 (4):787-802. DOI: 10.1016/j.cll.2017.07.004.
- [32] Yan CH, Liu DH, Liu KY, et al. Risk stratification-directed donor lymphocyte infusion could reduce relapse of standard-risk acute leukemia patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation [J]. *Blood*, 2012, 119 (14):3256- 3262. DOI: 10.1182/blood-2011-09-380386.
- [33] Zeijlemaker W, Grob T, Meijer R, et al. CD34+CD38- leukemic stem cell frequency to predict outcome in acute myeloid leukemia [J]. *Leukemia*, 2019, 33 (5):1102- 1112. DOI: 10.1038/s41375-018-0326-3.
- [34] Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, 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 [J]. *Leukemia*, 2003, 17 (12):2318-2357. DOI: 10.1038/sj.leu.2403135.
- [35] Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VH, et al. 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) - a Europe against cancer program [J]. *Leukemia*, 2003, 17 (12):2474-2486. DOI: 10.1038/sj.leu.2403136.
- [36] Tang FF, Xu LP, Zhang XH, et al. Monitoring of post-transplant CBFB- MYH11 as minimal residual disease, rather than KIT mutations, can predict relapse after allogeneic haematopoietic cell transplantation in adults with inv (16) acute myeloid leukaemia [J]. *Br J Haematol*, 2018, 180 (3):448- 451. DOI: 10.1111/bjh.14340.
- [37] Chen L, Zhu HM, Li Y, et al. Arsenic trioxide replacing or reducing chemotherapy in consolidation therapy for acute promyelocytic leukemia (APL2012 trial) [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118 (6): e2020382118. DOI: 10.1073/pnas.2020382118.
- [38] Zhou YL, Wu LX, Peter GR, et al. Mutation topography and risk stratification for de novo acute myeloid leukaemia with normal cytogenetics and no nucleophosmin 1 (NPM1) mutation or Fms-like tyrosine kinase 3 internal tandem duplication (FLT3-ITD) [J]. *Br J Haematol*, 2020, 190 (2):274-283. DOI: 10.1111/bjh.16526.
- [39] Xie M, Lu C, Wang J, et al. Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies [J]. *Nat Med*, 2014, 20 (12):1472-1478. DOI: 10.1038/nm.3733.
- [40] Hasserjian RP, Steensma DP, Graubert TA, et al. Clonal hematopoiesis and measurable residual disease assessment in acute myeloid leukemia [J]. *Blood*, 2020, 135 (20):1729- 1738. DOI: 10.1182/blood.2019004770.
- [41] Jan M, Snyder TM, Corces-Zimmerman MR, et al. Clonal evolution of preleukemic hematopoietic stem cells precedes human acute myeloid leukemia [J]. *Sci Transl Med*, 2012, 4 (149): 149ra118. DOI: 10.1126/scitranslmed.3004315.
- [42] Zhao XS, Yan CH, Liu DH, et al. Combined use of WT1 and flow cytometry monitoring can promote sensitivity of predicting relapse after allogeneic HSCT without affecting specificity [J]. *Ann Hematol*, 2013, 92 (8):1111- 1119. DOI: 10.1007/s00277-

- 013-1733-1.
- [43] Porter CC. Germ line mutations associated with leukemias [J]. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2016, 2016(1): 302-308. DOI: 10.1182/asheducation-2016.1.302.
- [44] Shayegi N, Kramer M, Bornhäuser M, et al. The level of residual disease based on mutant NPM1 is an independent prognostic factor for relapse and survival in AML [J]. Blood, 2013, 122(1): 83-92. DOI: 10.1182/blood-2012-10-461749.
- [45] Krönke J, Schlenk RF, Jensen KO, et al. Monitoring of minimal residual disease in NPM1-mutated acute myeloid leukemia: a study from the German-Austrian acute myeloid leukemia study group [J]. J Clin Oncol, 2011, 29(19):2709-2716. DOI: 10.1200/JCO.2011.35.0371.
- [46] Grimwade D, Jovanovic JV, Hills RK, et al. Prospective minimal residual disease monitoring to predict relapse of acute promyelocytic leukemia and to direct pre-emptive arsenic trioxide therapy [J]. J Clin Oncol, 2009, 27(22):3650-3658. DOI: 10.1200/JCO.2008.20.1533.
- [47] Platzbecker U, Avvisati G, Cicconi L, et al. Improved Outcomes With Retinoic Acid and Arsenic Trioxide Compared With Retinoic Acid and Chemotherapy in Non-High-Risk Acute Promyelocytic Leukemia: Final Results of the Randomized Italian-German APL0406 Trial [J]. J Clin Oncol, 2017, 35(6): 605-612. DOI: 10.1200/JCO.2016.67.1982.
- [48] Sanz MA, Lo CF, Martín G, et al. Definition of relapse risk and role of nonanthracycline drugs for consolidation in patients with acute promyelocytic leukemia: a joint study of the PETHEMA and GIMEMA cooperative groups [J]. Blood, 2000, 96(4):1247-1253.
- [49] Platzbecker U, Avvisati G, Cicconi L, et al. Improved Outcomes With Retinoic Acid and Arsenic Trioxide Compared With Retinoic Acid and Chemotherapy in Non-High-Risk Acute Promyelocytic Leukemia: Final Results of the Randomized Italian-German APL0406 Trial [J]. J Clin Oncol, 2017, 35(6):605-612. DOI: 10.1200/JCO.2016.67.1982.
- [50] Duan W, Liu X, Jia J, et al. The loss or absence of minimal residual disease of <0.1% at any time after two cycles of consolidation chemotherapy in CBFB-MYH11-positive acute myeloid leukaemia indicates poor prognosis [J]. Br J Haematol, 2021, 192(2):265-271. DOI: 10.1111/bjh.16745.
- [51] Buonamici S, Ottaviani E, Testoni N, et al. Real-time quantitation of minimal residual disease in inv(16)-positive acute myeloid leukemia may indicate risk for clinical relapse and may identify patients in a curable state [J]. Blood, 2002, 99(2):443-449. DOI: 10.1182/blood.v99.2.443.
- [52] Willekens C, Blanchet O, Renneville A, et al. Prospective long-term minimal residual disease monitoring using RQ-PCR in RUNX1-RUNX1T1-positive acute myeloid leukemia: results of the French CBF-2006 trial [J]. Haematologica, 2016, 101(3): 328-335. DOI: 10.3324/haematol.2015.131946.
- [53] Ivey A, Hills RK, Simpson MA, et al. Assessment of Minimal Residual Disease in Standard-Risk AML [J]. N Engl J Med, 2016, 374(5): 422-433. DOI: 10.1056/NEJMoa1507471.
- [54] Thol F, Gabdoulline R, Liebich A, et al. Measurable residual disease monitoring by NGS before allogeneic hematopoietic cell transplantation in AML [J]. Blood, 2018, 132(16):1703-1713. DOI: 10.1182/blood-2018-02-829911.
- [55] Hourigan CS, Dillon LW, Gui G, et al. Impact of Conditioning Intensity of Allogeneic Transplantation for Acute Myeloid Leukemia With Genomic Evidence of Residual Disease [J]. J Clin Oncol, 2020, 38(12):1273-1283. DOI: 10.1200/JCO.19.03011.
- [56] Buccisano F, Maurillo L, Del PMI, et al. Prognostic and therapeutic implications of minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia [J]. Blood, 2012, 119(2):332-341. DOI: 10.1182/blood-2011-08-363291.
- [57] Hourigan CS, Gale RP, Gormley NJ, et al. Measurable residual disease testing in acute myeloid leukaemia [J]. Leukemia, 2017, 31(7):1482-1490. DOI: 10.1038/leu.2017.113.
- [58] Ossenkoppele G, Schuurhuis GJ. MRD in AML: does it already guide therapy decision-making? [J]. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2016, 2016(1):356-365. DOI: 10.1182/asheducation-2016.1.356.
- [59] Prebet T, Bertoli S, Delaunay J, et al. Anthracycline dose intensification improves molecular response and outcome of patients treated for core binding factor acute myeloid leukemia [J]. Haematologica, 2014, 99(10):e185-e187. DOI: 10.3324/haematol.2014.109827.
- [60] Kadia TM, Reville PK, Borthakur G, et al. Venetoclax plus intensive chemotherapy with cladribine, idarubicin, and cytarabine in patients with newly diagnosed acute myeloid leukaemia or high-risk myelodysplastic syndrome: a cohort from a single-centre, single-arm, phase 2 trial [J]. Lancet Haematol, 2021, 8(8):e552-e561. DOI: 10.1016/S2352-3026(21)00192-7.

(收稿日期:2021-09-17)

(本文编辑:王叶青)