

Vereloome kasvajate molekulaardiagnostilised uuringud

Immuunanaluüsi osakond

Vereloome rakkude leukeemilise transformeerumise peamiseks mehhanismiks on geneetiliste muutuste teke. Kui muutused tekivad geenides, mis mõjutavad raku jagunemist või diferentseerumist, siis väljub raku areng kontrolli alt. Peamisteks muutusteks on erinevate kromosoomide vahelised translokatsioonid, kromosoomi osade deletsioonid ja inversioonid, kuid on teada ka väiksemaid mutatsioone ning muutusi geenide ekspressioonimustris. Teatud kindlate geenide muutumine põhjustab kindla fenotüübiga vähirakkude tekkimise. Geneetilise muutuse teadmine võimaldab kinnitada diagnoosi, valida ravi ning hinnata prognoosi. Kindla molekulaarse markeri olemasolul on võimalik edaspidi jälgida haiguse kulgu ning ravi efektiivsust.

PCR analüüsi näidustused:

1. Diagnoosi kinnitamine/täpsustamine
2. Remissiooni ja retsidiivi hindamine
3. Transplantatsioonieelne ning -järgne kontroll
4. Mõõdetava residuaalse haiguse (MRD) jälgimine.

PCR meetod on kõige tundlikum ja spetsiifilisem meetod mõõdetava residuaalse haiguse jälgimiseks. Reaalaja polümeraasi ahelreaktsiooni puhul kasutatakse leukeemiamarkerite suhtelist kvantiteerimist, s.t konkreetsel patsiendil määratakse leukeemiaspetsiifilise markeri hulka *house-keeping* ehk kontrollgeeni suhtes. Ühendlaboris kasutatavad meetodid on välja töötatud vastavalt rahvusvahelise *European LeukemiaNet* (ELN) standardiseeritud juhiste.

Hematoloogiliste somaatiliste mutatsioonide mRNA (paneel) (B,Bm-Hem somatic mut mRNA panel)

Immuunanaluüsi osakond

Antud analüüs on mõeldud enamlevinud leukeemiaspetsiifiliste mutatsioonide sõeluuringuks. Uuringu teostamiseks kasutatakse *HemaVision kit* analüüsikomplekti, mis võimaldab tuvastada 32 erinevat kromosomaalset aberratsiooni ning nende erinevaid murrupunkte. Erinevad aberratsioonid on seotud erinevate leukeemia vormidega (ALL, AML, KML) ning omavad nii diagnostilist kui ka prognostilist väärtust.

HemaVision kit'iga saab tuvastada järgmisi aberratsioone:

| Nimetus | Laiendatud nimetus |
|-------------------------------|--|
| del(1)(p32) <i>STIL::TAL1</i> | del(1)(p32) <i>STIL::TAL1</i> |
| inv(16) <i>CBFB::MYH11</i> | inv(16)(p13q22) <i>CBFB::MYH11</i> |
| t(1;11) <i>MLL::EPS15</i> | t(1;11)(p32;q23) <i>MLL::EPS15</i> |
| t(1;11) <i>MLL::MLLT11</i> | t(1;11)(q21;q23) <i>MLL::MLLT11</i> |
| t(1;19) <i>TCF3::PBX1</i> | t(1;19)(q23;p13) <i>TCF3::PBX1</i> |
| t(3;5) <i>NPM1::MLF1</i> | t(3;5)(q25.1;q35) <i>NPM1::MLF1</i> |
| t(3;21) <i>RUNX1::EVI1</i> | t(3;21)(q26;q22) <i>RUNX1::EVI1</i> |
| t(3;21) <i>RUNX1::MECOM</i> | t(3;21)(q26;q22) <i>RUNX1::MECOM</i> |
| t(3;21) <i>RUNX1::RPL22P1</i> | t(3;21)(q26;q22) <i>RUNX1::RPL22P1</i> |
| t(4;11) <i>MLL::AFF1</i> | t(4;11)(q21;q23) <i>MLL::AFF1</i> |
| t(5;12) <i>ETV6::PDGFRB</i> | t(5;12)(q33;p13) <i>ETV6::PDGFRB</i> |
| t(5;17) <i>NPM1::RARA</i> | t(5;17)(q35;q12) <i>NPM1::RARA</i> |
| t(6;9) <i>DEK::NUP214</i> | t(6;9)(p23;q34) <i>DEK::NUP214</i> |

| | |
|---------------------------------|---|
| t(6;11) <i>MLL::MLLT4</i> | t(6;11)(q27;q23) <i>MLL::MLLT4</i> |
| t(8;21) <i>RUNX1::RUNX1T1</i> | t(8;21)(q22;q22) <i>RUNX1::RUNX1T1</i> |
| t(9;9) <i>SET::NUP214</i> | t(9;9)(q34;q34) <i>SET::NUP214</i> |
| t(9;11) <i>MLL::MLLT3</i> | t(9;11)(p22;q23) <i>MLL::MLLT3</i> |
| t(9;12) <i>ETV6::ABL1</i> | t(9;12)(q34;p13) <i>ETV6::ABL1</i> |
| t(9;22) <i>BCR::ABL1</i> (p190) | t(9;22)(q34;q11) <i>BCR::ABL1</i> (m-bcr, p190) |
| t(9;22) <i>BCR::ABL1</i> (p230) | t(9;22)(q34;q11) <i>BCR::ABL1</i> (μ -bcr, p230) |
| t(9;22) <i>BCR::ABL1</i> (p210) | t(9;22)(q34;q31) <i>BCR::ABL1</i> (M-bcr, p210) |
| t(10;11) <i>MLL::MLLT10</i> | t(10;11)(p12;q23) <i>MLL::MLLT10</i> |
| t(11;17) <i>MLL::MLLT6</i> | t(11;17)(q23;q21) <i>MLL::MLLT6</i> |
| t(11;17) <i>ZBTB16::RARA</i> | t(11;17)(q23;q12) <i>ZBTB16::RARA</i> |
| t(11;19) <i>MLL::ELL</i> | t(11;19)(q23;p13.3) <i>MLL::ELL</i> |
| t(11;19) <i>MLL::MLLT1</i> | t(11;19)(q23;p13.3) <i>MLL::MLLT1</i> |
| t(12;21) <i>ETV6::RUNX1</i> | t(12;21)(p13;q22) <i>ETV6::RUNX1</i> |
| t(12;22) <i>ETV6::MN1</i> | t(12;22)(p13;q11/12) <i>ETV6::MN1</i> |
| t(15;17) <i>PML::RARA</i> | t(15;17)(q24;q12) <i>PML::RARA</i> |
| t(16;21) <i>FUS::ERG</i> | t(16;21)(p11;q22) <i>FUS::ERG</i> |
| t(17;19) <i>TCF3::HLF</i> | t(17;19)(q22;p13) <i>TCF3::HLF</i> |
| t(X;11) <i>MLL::FOXO4</i> | t(X;11)(q13;q23) <i>MLL::FOXO4</i> |

Kui positiivseks osutub selline aberratsioon, mida on võimalik määrata kvantitatiivse reaalaja polümeraasi ahelreaktsiooniga, siis on edaspidi võimalik teostada ka kvantitatiivne analüüs. Teisi leitud mutatsioone saab jälgida sama meetodiga. Kuna test on kvalitatiivne, siis ei sobi see mõõdetava residuaalse haiguse hindamiseks.

Uuritav materjal, selle võtmine, saatmine ja säilitamine

| | |
|-------------------|------------------------------|
| Katsuti | K2E/K3E-katsuti (lilla kork) |
| Analüüsitav kogus | Veri 6 mL, luuüdi 2 mL |
| Säilivus | 2–8 °C 48 tundi |

Analüüsimeetod: kvalitatiivne reaalaja polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)

Analüüsi tegemise aeg: tööpäeviti, vastus 5 tööpäeva jooksul

Vastuse vorm: positiivne/negatiivne (iga aberratsiooni kohta eraldi)

Näidustus ja kliiniline tähendus

Diagnoosi täpsustamine/selgitamine, prognoosi hindamine.

Müeloproliferatiivsed haigused

JAK2 geeni p.V617F mutatsiooni DNA hulk (B,Bm- JAK2 p.V617F DNA QN)

Immuunanalüüsi osakond

Müeloproliferatiivseid haigusi, nagu tõelist polütsüteemiat (PV), essentsiaalset trombotsüteemiat (ET) ja idiopaatilist müelofibroosi (IMF), iseloomustab kлонаalne ühe või mitme müeloidse rakurea proliferatsioon, mis omakorda toimub tsütokiini

hüpersensitiivsuse tõttu. *Janus*-türosiinkinaas-2 p.V617F mutatsiooni (*JAK2* p.V617F) on leitud suurel hulgal PV ja ET diagnoosiga patsientidel ning vähemal määral IMF-ga patsientidel. *JAK2* kuulub normaalselt raku signaalraja molekulide hulka ja osaleb geenide transkriptsiooni aktiveerimisel. Müeloidsetes tüvirakkudes muteerunud *JAK2* viib aga kontrollimatu müeloidse rakurea proliferatsioonini. *JAK2* mutatsiooni tuvastamine reaalaja polümeraasi ahelreaktsiooniga võimaldab kroonilisi müeloproliferatiivseid haigusi paremini diagnoosida, nt eristada primaarset polütsüteemiat ja sekundaarset erütrotsütoosi ning essentsiaalsed ja reaktiivset trombotsütoosi.

Uuritav materjal, selle võtmine, saatmine ja säilitamine

| | |
|--------------------|------------------------------|
| Katsuti | K2E/K3E-katsuti (lilla kork) |
| Analüüsitava kogus | Veri 6 mL, luuüdi 2 mL |
| Säilivus | 2–8 °C 7 päeva |

Analüüsi tegemise aeg: tööpäeviti, vastus 5 tööpäeva jooksul

Analüüsimeetod: kvantitatiivne reaalaja polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)

Vastuse vorm: *JAK2* V617F mutatsiooniga ja *wild-type* DNA koopiate arvu suhe %-des.

Näidustus ja kliiniline tähendus

Müeloproliferatiivsete haiguste diferentsiaaldiagnostika ja ravi tulemuslikkuse jälgimine.

t(9;22) *BCR::ABL1* (p210 KML) translokatsiooni mRNA (B,Bm-t(9;22) *BCR::ABL1* (p210 KML) mRNA)

Immuunanalüüsi osakond

Rohkem kui 95%-l juhtudel esineb kroonilise müeloidleukeemia (KML) patsientidel Philadelphia kromosoom ehk kromosomaalne translokatsioon t(9;22)(q34;q11).

Translokatsiooni (9;22) korral on 9. kromosoomil murd *ABL1* geeni kohalt, ühinedes 22. kromosoomiga *BCR* geeni keskelt. Selle tulemusel tekib liitgeen *BCR::ABL1*. Sellelt geenilt toodetud liitvalgu *BCR::ABL1* funktsionaalse türosiinkinaasi osa on pidevalt aktiveeritud ning omab seetõttu kriitilist rolli leukeemia patogeneesis. Sõltuvalt murdepunkti asukohast *bcr* geenis võib esineda erineva pikkusega *BCR-ABL1* valke, peamised on neist p190, p210 ja p230. Ägeda lümfoidleukeemia (ALL) korral on tihti tegemist liitvalguga *BCR::ABL1* p190. Kroonilise müeloidleukeemia (KML) korral esineb enamasti *BCR::ABL1* p210.

Kuna Philadelphia kromosoomi esinemisest sõltub prognoos ning ravi, siis on selle määramine olulise tähtsusega.

BCR::ABL1 liitvalgu olemasolul on võimalik kasutada väga efektiivset ravi türosiinkinaasi inhibiitoritega (imatiniib, nilotiniib, dasatiniib jt), mis inhibeerivad valikuliselt *BCR::ABL1* kinaasi aktiivsust. Molekulaarse ravivastuse jälgimiseks mõõdetakse *BCR::ABL1* mRNA taset kvantitatiivse reaalaja polümeraasi ahelreaktsiooniga. Analüüsi regulaarne kordamine aitab kaasa retsidiivi varasele avastamisele.

Ühendlaboris teostatakse *BCR::ABL1* p210 (KML) analüüsi vastavalt rahvusvaheliste standardiseerimisprogrammide (*European LeukemiaNet*) poolt välja töötatud juhiste ja nõuetele ning kogu protsess on standardiseeritud *EUTOS for CML* rahvusvahelise programmi raames. Ühendlaboris on võimalik tuvastada *BCR::ABL1* transkripte tasemel vähemalt MR4.5.

Uuritav materjal, selle võtmine, saatmine ja säilitamine

| | |
|-------------------|------------------------------|
| Katsuti | K2E/K3E-katsuti (lilla kork) |
| Analüüsitav kogus | Veri 6 mL, luuüdi 2 mL |
| Säilivus | 2–8 °C 48 tundi |

Analüüsi tegemise aeg: tööpäeviti, vastus 5 tööpäeva jooksul

Analüüsimeetod: kvantitatiivne reaalaaja polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)

Vastuse vorm: *BCR::ABL1* mRNA ja kontrollgeeni *ABL1* mRNA suhe rahvusvahelise skaala protsentides (%IS).

Näidustus ja kliiniline tähendus

Kroonilise müeloidleukeemia kahtlustusel diagnoosi täpsustamine, mõõdetava residuaalse haiguse ja ravi tulemuslikkuse jälgimine ning retsidiivi kiire tuvastamine.

Ravi efektiivsuse jälgimiseks teostatakse PCR analüüsi reeglina iga kolme kuu tagant. Pärast täieliku molekulaarse ravivastuse saavutamist (*BCR::ABL1* mRNA negatiivne) võib analüüsi teostada harvemini.

Oluline molekulaarne ravivastus (*Major Molecular Response* ehk MMR) on saavutatud siis, kui saadud väärtus on $< 0,1\%$ (IS).

Kui *BCR::ABL1* transkript (mRNA) ei ole tuvastatav, siis lisatakse vastusesse ka analüüsi tundlikkuse ehk molekulaarse ravivastuse tase: MR4.0 = $BCR::ABL1 \leq 0,01\%$ (IS); MR4.5 = $BCR::ABL1 \leq 0,0032\%$ (IS) või MR5.0 = $BCR::ABL1 \leq 0,001\%$ (IS).

21.08.2017 omistati Ühendlaborile EUTOS MR4.5 sertifikaat, mis tõendab, et labor on võimeline tuvastama *BCR::ABL1* transkripte tasemel MR4.5.

Analüüs on akrediteeritud Eesti Akrediteerimiskeskuse poolt.

***BCR::ABL1* kinaasi domeeni mutatsioonid (sekvenerimine) (XXX-*BCR::ABL1* seq)**

Immuunanalüüsi osakond

Mutatsioonid *BCR::ABL1* kinaasi domeenis võivad põhjustada leukeemia raviks kasutatavate türosiinkinaasi inhibiitorite (TKI) suhtes resistentsust. Valdavalt on tegemist kasvajarakkudes tekkivate punktmutatsioonidega, mille mõju erinevate TKI-de efektiivsusele on väga erinev. Kõige tuntum mutatsioon on T315I, mis põhjustab resistentsust kõikide esimese ja teise põlvkonna TKI-de suhtes. Info erinevate mutatsioonide ning nende mõju kohta TKI-dele täieneb pidevalt.

Antud analüüsi teostamiseks peab *BCR::ABL1* mRNA tase olema vähemalt 0,1%IS.

Uuritav materjal, selle võtmine, saatmine ja säilitamine

| | |
|-------------------|------------------------------|
| Katsuti | K2E/K3E-katsuti (lilla kork) |
| Analüüsitav kogus | Veri 6 mL, luuüdi 2 mL |
| Säilivus | 2–8 °C 48 tundi |

Analüüsimeetod: *BCR::ABL1* kinaasi domeeni sekvenerimine Sanger meetodil (~ aa220–420)

Analüüsi tegemise aeg: tööpäeviti, vastus 5 tööpäeva jooksul

Vastuse vorm

BCR::ABL1 kinaasi domeenis mutatsioone ei leitud.

BCR::ABL1 kinaasi domeenis leitud mutatsioon (mutatsiooni(de) kirjeldus).

Näidustus ja kliiniline tähendus

BCR::ABL1 kinaasi domeeni mutatsioonide määramine on näidustatud Philadelphia kromosoomi ehk t(9;22) *BCR::ABL1* olemasoluga ning TKI ravi saavatel patsientidel, kes ei saavuta optimaalset ravitulemust või kui *BCR::ABL1* mRNA tase tõuseb ravi ajal üle MMR (*Major Molecular Response*) piiri ehk 0,1%(IS).

Vastavalt leitud mutatsiooni(de) tüübile võib olla vajalik muuta kasutatavat ravimit, kohandada ravimi doosi või rakendada alternatiivseid ravimeetodeid. Mutatsioonide olemasolu ei ole püsiv; kasvajarakkudes võivad tekkida uued mutatsioonid ning erinevad kloonid võivad ravi tulemusel tekkida ning kaduda.

AML – äge müeloidleukeemia

t(15;17) *PML::RARA* translokatsiooni (variandid *bcr1*, *bcr2*, *bcr3*) mRNA (B,Bm-t(15;17) *PML::RARA* *bcr1*, *bcr2*, *bcr3* mRNA)

Immuunanalüüsi osakond

Ägeda promüelotsütleukeemia (AML-M3) korral on tihti tuvastatav kromosomaalne translokatsioon (15;17), mida ei esine teiste leukeemavormide korral. Translokatsiooni tulemusena katkeb 15. kromosoom *PML* geeni kohalt, ühinedes 17. kromosoomiga *RARA* (retinoidhappe retseptor α) geeni keskelt, põhjustades hübriidse *PML::RARA* valgu ekspressiooni. Vastav hübriidne valk pidurdab rakkude diferentseerumist ja takistab apoptoosi ehk rakkude normaalset ("programmeeritud") surma.

Translokatsiooni (15;17) määramine on oluline leukeemia molekulaarseks identifitseerimiseks ja prognoosi hindamiseks ning efektiivseks raviks, sest vaid t(15;17) suhtes positiivsed patsiendid alluvad ATRA (*all-trans retinoic acid*) ravile. Translokatsiooni tuvastamine remissioonis oleval patsiendil võimaldab alustada kliinilist retsidiivi ennetava raviga.

Kvantitatiivselt on võimalik määrata sagedamini esinevaid t(15;17) *PML::RARA* variante *bcr1*, *bcr2* ning *bcr3*.

Uuritav materjal, selle võtmine, saatmine ja säilitamine

| | |
|-------------------|------------------------------|
| Katsuti | K2E/K3E-katsuti (lilla kork) |
| Analüüsitav kogus | Veri 6 mL, luuüdi 2 mL |
| Säilivus | 2–8 °C 48 tundi |

Analüüsi tegemise aeg: tööpäeviti, vastus 5 tööpäeva jooksul

Analüüsimeetod: kvantitatiivne reaalaaja polümeraasi ahelreaktsioon (PCR); määratakse t(15;17) variante *bcr1*, *bcr2* ja/või *bcr3* vastavalt esmase analüüsi tulemusele.

Vastuse vorm: *PML::RARA* mRNA ja kontrollgeeni *ABL1* mRNA suhe protsentides.

Näidustus ja kliiniline tähendus

Kiiranalüüsina AML-M3 kahtlusel diagnoosi täpsustamiseks. Mõõdetava residuaalse haiguse ja ravi tulemuslikkuse jälgimine ning molekulaarse retsidiivi tuvastamine enne kliiniliste haigusnähtude ilmnemist.

t(15;17) PML::RARA mRNA 0%: translokatsioon ei ole tuvastatav. Kui analüüs oli eelnevalt positiivne, siis on mutatsiooniga rakkude arv ravi tulemusel tõenäoliselt vähenenud alla testi tundlikkuse taseme.

t(8;21) RUNX1::RUNX1T1 translokatsiooni mRNA (B,Bm-t(8;21) RUNX1::RUNX1T1 mRNA)

Immuunanalüüsi osakond

Translokatsioon (8;21) esineb 2–12%-l ägeda müeloidleukeemiaga (AML) patsientidest. t(8;21) tagajärjel muutub tanskriptsioonifaktorite kompleksi kuuluvate geenide normaalne järjestus ning selle tulemusel tekib kimäärne liitvalk *RUNX1::RUNX1T1* (vana nimega *AML1::ETO*), mida seostatakse just AML-M2 alatüübiga. Translokatsiooniga t(8;21) patsiendid on enamasti alla 30 aastased ning üldiselt üsna hea prognoosiga, mistõttu on raviks võimalik kasutada vähem agressiivset keemiaravi.

Uuritav materjal, selle võtmine, saatmine ja säilitamine

| | |
|-------------------|------------------------------|
| Katsuti | K2E/K3E-katsuti (lilla kork) |
| Analüüsitav kogus | Veri 6 mL, luuüdi 2 mL |
| Säilivus | 2–8 °C 48 tundi |

Analüüsi tegemise aeg: tööpäeviti, vastus 5 tööpäeva jooksul

Analüüsimeetod: kvantitatiivne reaalaaja polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)

Vastuse vorm: *RUNX1::RUNX1T1* mRNA ja kontrollgeeni *ABL1* mRNA suhe protsentides.

Näidustus ja kliiniline tähendus

AML kahtlusel diagnoosi täpsustuseks, prognoosi hindamiseks. Mõõdetava residuaalse haiguse ja ravi tulemuslikkuse jälgimine ning molekulaarse retsidiivi tuvastamine enne kliiniliste haigusnähtude ilmnemist.

t(8;21) RUNX1::RUNX1T1 mRNA 0%: translokatsioon ei ole tuvastatav. Kui analüüs oli eelnevalt positiivne, siis on mutatsiooniga rakkude arv ravi tulemusel tõenäoliselt vähenenud alla testi tundlikkuse taseme.

inv(16) CBFβ::MYH11 inversiooni mRNA (B,Bm-inv(16) CBFβ::MYH11 mRNA)

Immuunanalüüsi osakond

16. kromosoomi inversioon esineb 1–5%-l ägeda müeloidleukeemia (AML) patsientidel. 16. kromosoomis toimub peritsentriline inversioon (16p13q22), mille tagajärjel muutub tanskriptsioonifaktorite kompleksi kuuluvate geenide normaalne järjestus ning selle tulemusel tekib kimäärne liitvalk CBFβ::MYH11. inv(16) muutusega AML patsiendid on tavaliselt nooremad ning üldiselt üsna hea prognoosiga, mistõttu on raviks võimalik kasutada vähem agressiivset keemiaravi.

Uuritav materjal, selle võtmine, saatmine ja säilitamine

| | |
|-------------------|------------------------------|
| Katsuti | K2E/K3E-katsuti (lilla kork) |
| Analüüsitav kogus | Veri 6 mL, luuüdi 2 mL |
| Säilivus | 2-8 °C 48 tundi |

Analüüsi tegemise aeg: tööpäeviti, vastus 5 tööpäeva jooksul

Analüüsimeetod: kvantitatiivne reaalaja polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)

Vastuse vorm: *CBFβ::MYH11* mRNA ja kontrollgeeni *ABL1* mRNA suhe protsentides.

Näidustus ja kliiniline tähendus

AML kahtlusel diagnoosi täpsustamiseks, prognoosi hindamiseks. Mõõdetava residuaalse haiguse ja ravi tulemuslikkuse jälgimine ning molekulaarse retsidiivi tuvastamine enne kliiniliste haigusnähtude ilmnemist.

inv(16) CBFβ::MYH11 mRNA 0%: inversioon ei ole tuvastatav. Kui analüüs oli eelnevalt positiivne, siis on mutatsiooniga rakkude arv ravi tulemusel tõenäoliselt vähenenud alla testi tundlikkuse taseme.

FLT3 geeni koodoni D835 mutatsioon ja sisemine tandemduplikatsioon DNA (B,Bm-FLT3 D835, ITD DNA)

Immuunanalüüsi osakond

FLT3 geeni pealt sünteesitakse türosiinkinaasi retseptorit *FLT3*, mis normaalselt on ekspresseeritud paljude rakkude pinnal, kaasa arvatud vereloome tüvirakud, kus *FLT3* retseptoril on võtmeroll tüvirakkude proliferatsioonile ja ka teatud diferentseerumise kontrollprotsessides. *FLT3* geenis võib esineda peamiselt kahte tüüpi mutatsioone – esiteks sisemised tandemduplikatsioonid (ITD) ja teiseks punktmutatsioon koodonis D835 kinaasi domeeni aktivatsioonilingu osas. Mutatsioonid *FLT3* retseptoris põhjustavad türosiinkinaasi pideva aktiivsuse, mille tulemusel kaob kontroll vereloome tüvirakkude paljunemise ja diferentseerumise üle.

FLT3 mutatsioone esineb eelkõige ägeda müeloidleukeemia (AML) diagnoosiga patsientidel ja need on seotud suhteliselt halva prognoosiga.

Uuritav materjal, selle võtmine, saatmine ja säilitamine

| | |
|-------------------|------------------------------|
| Katsuti | K2E/K3E-katsuti (lilla kork) |
| Analüüsitav kogus | Veri 6 mL, luuüdi 2 mL |
| Säilivus | 2-8 °C 7 päeva |

Analüüsi tegemise aeg: tööpäeviti, vastus 5 tööpäeva jooksul

Analüüsimeetod: kvalitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)

Vastuse vorm: positiivne/negatiivne kummagi muutuse osas.

Näidustus ja kliiniline tähendus

AML prognoosi hindamine ja raviskeemi valik.

FLT3 ITD ja/või D835 DNA negatiivne: muutused ei ole antud proovimaterjalis tuvastatavad.

Wilmsi tuumori geeni 1 ehk *WT1* mRNA (B,Bm-*WT1* mRNA)

Immuunanaluüsi osakond

Umbes pooltel ägeda müeloidleukeemia (AML) diagnoosiga patsientidel esineb nn normaalne karüotüüp – puudub spetsiifiline kromosomaalne aberratsioon, mida kasutada ravi jälgimisel. Seetõttu on oluline leida mingi muu molekulaarne marker, mis võimaldaks jälgida haiguse kulgu.

Wilms'i tuumori geen 1 ehk *WT1* on 11. kromosoomis asuv transkriptsiooniaktivaator, mis identifitseeriti esmakordselt Wilms'i tuumoris.

Sõltuvalt rakulisest kontekstist võib *WT1* valgul olla nii transkriptsiooni aktiveeriv kui ka pidurdav toime ning sellel võib olla nii füsioloogiline kui ka patoloogiline funktsioon, eelkõige onkogeneesis. Reeglina on *WT1* ekspresseeritud hematopoeetilistes tüvirakkudes, kuid on leitud, et *WT1* geen on üleekspresseeritud ka paljudes kasvajakudedes.

Vähemalt 75%-l AML juhtudest on *WT1* ekspressioon tuvastatav perifeersetes vererakkudes. Paljud uuringud on näidanud, et *WT1* transkriptsiooni taseme järgi mononukleaarsetes rakkudes saab hinnata haiguse agressiivsust ning ravile allumist ning seda markerit saab kasutada sõltumatult teistest markeritest mõõdetava residuaalse haiguse jälgimiseks ning varase kliinilise retsidiivi avastamiseks.

Uuritav materjal, selle võtmine, saatmine ja säilitamine

| | |
|-------------------|------------------------------|
| Katsuti | K2E/K3E-katsuti (lilla kork) |
| Analüüsitav kogus | Veri 6 mL, luuüdi 2 mL |
| Säilivus | 2–8 °C 48 tundi |

Analüüsi tegemise aeg: tööpäeviti, vastus 5 tööpäeva jooksul

Analüüsimeetod: kvantitatiivne reaalaja polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)

Vastuse vorm: *WT1* mRNA ja kontrollgeeni *ABL1* mRNA suhe protsentides

Näidustus ja kliiniline tähendus

AML prognoosi hindamine ja raviskeemi valik. Tuvastatav *WT1* geeni ekspressioon viitab reeglina halvale prognoosile, seda eelkõige AML patsientidel. Mõõdetava residuaalse haiguse ja ravi tulemuslikkuse jälgimine ning molekulaarse retsidiivi tuvastamine enne kliiniliste haigusnähtude ilmnemist.

NPM1 geeni mutatsioonide A, B ja D mRNA (B,Bm-*NPM1* mutA, mutB, mutD mRNA)

Immuunanaluüsi osakond

Ligikaudu pooled ägeda müeloidleukeemiaga (AML) patsientidest on tsütogeneetilisel nõrmaalse karüotüübiga. Hoolimata sellest on see patsientide rühm ravile allumise ja prognoosi poolest väga heterogeenne.

NPM1 (nukleofosmiin 1) geeni mutatsioone on leitud kuni 35%-l *de novo* AML juhtudel (väga harvad sekundaarsete AML juhtude korral), sealjuures 45–53% normaalse

karüotüübi korral. Suurem osa *NPM1* geeni mutatsioonidest esinevad 12. eksonis. Levinumad neist on mutatsioonid *NPM1* mutatsioon A (c.860_863dupTCTG) (~72%), *NPM1* mutatsioon B (c.863_864insCATG) (~12%) ja *NPM1* mutatsioon D (c.863_864insCCTG) (~4%). Muteerunud *NPM1* valk lokaliseerub tuuma asemel tsütoplasmas (*NPM1c+*). *NPM1* mutatsioonide esinemine, eelkõige *FLT3* geeni mutatsioonide puudumisel, on reeglina hea prognoosi näitajaks.

NPM1 geeni mutatsioone analüüsitakse kahes etapis. Esimeses etapis teostatakse patsiendile *NPM1* geeni ekson 12 sekveneerimine Sanger meetodikaga. Kui tehakse kindlaks mutatsioonide A, B või D esinemine, on edaspidi võimalik teostada vastava mutatsiooniga geeni mRNA kvantitatiivset analüüsi. Seega on *NPM1* geeni mutatsioonide abil hea jälgida mõõdetava residuaalse haiguse (MRD) esinemist.

Uuritav materjal, selle võtmine, saatmine ja säilitamine

| | |
|-------------------|------------------------------|
| Katsuti | K2E/K3E-katsuti (lilla kork) |
| Analüüsitav kogus | Veri 6 mL, luuüdi 2 mL |
| Säilivus | 2–8 °C 48 tundi |

Analüüsi tegemise aeg: tööpäeviti, vastus 5 tööpäeva jooksul

Analüüsimeetod: esmasel analüüsil Sanger sekveneerimine; edaspidiseks MRD jälgimiseks kvantitatiivne reaalka polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)

Vastuse vorm

Esmane analüüs: *NPM1* geeni ekson 12 mutatsioonide olemasolu/puudumine; leitud mutatsiooni kirjeldus.

MRD jälgimine: *NPM1* geeni A, B või D mutatsiooni mRNA ja kontrollgeeni *ABL* mRNA suhe protsentides.

Näidustus ja kliiniline tähendus

AML prognoosi hindamine ja raviskeemi valik. Mõõdetava residuaalse haiguse ja ravi tulemuslikkuse jälgimine ning molekulaarse retsidiivi tuvastamine enne kliiniliste haigusnähtude ilmnemist.

NPM1 mutatsioonide mRNA 0%: antud proovimaterjalis *NPM1* geeni eksonis 12 vastavat mutatsioone ei tuvastatud. Kui analüüs oli eelnevalt positiivne, siis on mutatsiooniga rakkude arv ravi tulemusel tõenäoliselt vähenenud alla testi tundlikkuse taseme.

ALL – äge lümfoïdleukeemia

t(12;21) *ETV6::RUNX1* translokatsiooni mRNA (B,Bm-t(12;21) *ETV6::RUNX1* mRNA)

Immuunanalüüsi osakond

Translokatsioon 12;21(p13;q22) on kõige levinum translokatsioon lapsea B-rakulise ägeda lümfoïdleukeemia (ALL) korral. Translokatsiooni tulemusena tekib kimäärne liitvalk *ETV6::RUNX1T1*. Lapsea ägeda müeloidleukeemia (AML) puhul translokatsiooni (12;21) praktiliselt ei esine ning täiskasvanute ALL-i puhul on esinemine harv. *RUNX1* geen on transkriptsiooni aktivatsiooni geen, kuid tekkinud translokatsiooni tulemusena muutub see transkriptsiooni repressoriks. t(12;21) positiivsetel patsientidel on suhteliselt hea prognoos.

Uuritav materjal, selle võtmine, saatmine ja säilitamine

| | |
|-------------------|------------------------------|
| Katsuti | K2E/K3E-katsuti (lilla kork) |
| Analüüsitav kogus | Veri 6 mL, luuüdi 2 mL |
| Säilivus | 2–8 °C 48 tundi |

Analüüsi tegemise aeg: tööpäeviti, vastus 5 tööpäeva jooksul

Analüüsimeetod: kvantitatiivne reaalaaja polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)

Vastuse vorm: *ETV6::RUNX1* mRNA ja kontrollgeeni *ABL1* mRNA suhe protsentides.

Näidustus ja kliiniline tähendus

Ägeda leukeemia kahtlusel diagnoosi täpsustuseks, prognoosi hindamiseks. Mõõdetava residuaalse haiguse ja ravi tulemuslikkuse jälgimine ning molekulaarse retsidiivi tuvastamine enne kliiniliste haigusnähtude ilmnemist.

t(12;21) *ETV6::RUNX1* mRNA 0%: translokatsioon ei ole tuvastatav. Kui analüüs oli eelnevalt positiivne, siis on mutatsiooniga rakkude arv ravi tulemusel tõenäoliselt langenud alla testi tundlikkuse taseme.

Kimäärsuse markerite sõeluuring

Kimäärsuse marker 1

Kimäärsuse marker 2

Immuunanalüüsi osakond

Geneetiline kimäär on organism, kellel on kaks või enam geneetiliselt erinevat rakupopulatsiooni ehk siis erinevate genoomidega rakke. Kimäärid võivad tekkida looduslikult (ema vereringes loote rakud; loodete „kokkusulamine“) või tehiskult (vereülekanne, tüvirakkude või organite siirdamine).

Luuüdi ja tüvirakkude siirdamise järgselt on võimalik erinevate geneetiliste markerite määramise abil kindlaks teha retsiipiendi ja doonori rakkude suhet ning selle kaudu hinnata siirdamise edukust ning avastada varakult äratõukereaktsioonide tekkimist.

Ühendlaboris kasutatavasse analüüsi kuulub 39 erinevat geneetilist markerit, mille abil on võimalik eristada erineva päritoluga genoomi. Geneetilisteks markeriteks on valitud erinevad bialleelsed insertioonid/deletsioonid vm inimgenoomi sagedased polümorfismid.

Siirdamiseelne kimäärsuse sõeluuring

Esmase sõeluuringu käigus teostatakse doonorile ning retsiipiendile siirdamiseelselt võrdlusanalüüs, et teha kindlaks markerid, mille osas nende genoomid üksteisest erinevad. Informatiivne marker on selline, mis on olemas retsiipiendil ning puudub doonoril. Korduva siirdamise korral tuleb leida sellised markerid, mida pole ühelgi doonoril.

Siirdamisjärgne kimäärsuse markerite kvantitatiivne analüüs

Siirdamisjärgselt määratakse konkreetse markeri DNA hulk retsiipiendi veres ning võrreldakse selle hulka siirdamiseelselt võetud proovimaterjali sama markeri DNA hulgaga. Erinevate proovimaterjalide DNA kogus normaliseeritakse kontrollgeeni abil. Kuna vähirakkudes võib toimuda DNA fragmenteerumist või ümberkorraldusi, jälgitakse võimaluse korral alati kahte informatiivset markerit, et välistada vale-negatiivsed tulemused mõne markeri kadumise tõttu.

Näiteks markeri tulemus 5% tähendab seda, et siirdamisjärgselt on retsiptendi enda DNA ehk genoomi hulk kogu DNA-st 5%. Ülejäänud 95% kogu DNA-st on pärit doonori genoomist. Analüüsi tundlikkus sõltub DNA hulgast reaktsioonis.

Uuritav materjal, selle võtmine, saatmine ja säilitamine

Siirdamiseelseks kimäärsuse sõeluuringuks on vaja nii retsiptendi kui doonori verd!

| | |
|-------------------|------------------------------|
| Katsuti | K2E/K3E-katsuti (lilla kork) |
| Analüüsitav kogus | Veri 6 mL, luuüdi 2 mL |
| Säilivus | 2-8 °C 7 päeva |

Analüüsi tegemise aeg: tööpäeviti, vastus 3 tööpäeva jooksul

Analüüsimeetod: reaalaja polümeraasi ahelreaktsioon (RT-PCR)

Vastuse vorm

Siirdamiseelne sõeluuring: Informatiivsed markerid valitud

Siirdamisjärgne kimäärsuse markerite analüüs: retsiptendi DNA hulk protsentides.

Näidustus ja kliiniline tähendus

Allogeense vereloome tüvirakkude siirdamise järgselt kimäärsuse staatuse (täielik või osaline kimäärsus) ja taseme (osalise kimäärsuse korral stabiilne või muutuv kimäärsuse tase) regulaarne hindamine võimaldab varakult avastada GVHD (*graft-versus-host disease*), HVG D (*host-versus-graft disease*) ja retsidiivi tekkimist.

Vt ka: Luuüdi aspiraadi tsütoloogiline, tsütokeemiline ja histoloogiline kompleksuuring
Vereloomehaiguste immuunfenotüpeerimine