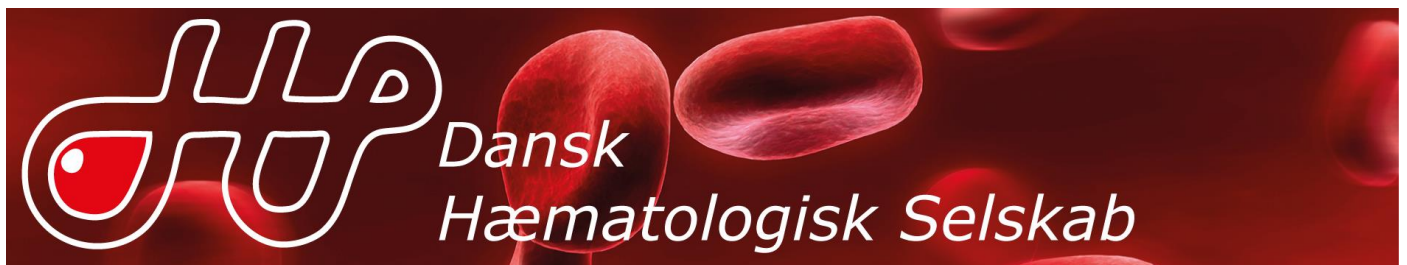


Guideline for diagnosticering og
håndtering af patienter med idiopatisk
cytopeni af ukendt signifikans (ICUS)

2017



Indhold

Arbejdsgruppe	2
Indledning.....	3
Udredning af patienter henvist med cytopeni	4
Blodprøver	4
Knoglemarvsundersøgelse	4
Differentialdiagnoser.....	4
Cytogenetik.....	5
Supplerende undersøgelser.....	6
Flowcytometri.....	6
NGS og detektion af mutationer	6
Arvelige cytopenier.....	8
Transplantation	9
Anbefalinger	10
Referencer	11

Arbejdsgruppe

Overlæge, Ph.d. Mette Skov Holm, Aarhus Universitetshospital

Hoveduddannelseslæge, Ph.d. Anne Roug, Aalborg Universitetshospital

Overlæge, Dr.Med Mette Klarskov Andersen, Klinisk Genetisk Afdeling,
Rigshospitalet

Professor, overlæge, Dr.Med Kirsten Grønbæk, Rigshospitalet

Reservelæge, Ph.d.-studerende Jakob Werner Hansen, Rigshospitalet

Indledning

Idiopatisk cytopeni af ukendt signifikans (ICUS) er en samlet betegnelse for persisterende cytopeni, hvor en umiddelbar årsag ikke kan identificeres efter et rutinemæssigt udredningsprogram¹. ICUS er tæt beslægtet med myelodysplastisk syndrom (MDS), og diagnosen kan kun stilles, hvis kriterierne for en MDS-diagnose ikke er opfyldt. MDS er defineret som en tilstand med cytopeni med mere end 10% dysplastiske celler i knoglemarven, eller hvor der forekommer specifikke cytogenetiske aberrationer². Selvom dysplastiske forandringer er et af de helt centrale diagnostiske kriterier for MDS, kan det være vanskeligt at vurdere dysplasigraden, og dysplastiske forandringer kan også være til stede ved andre sygdomme og hos raske individer^{3,4}. Internationalt er der foreslået minimumskriterier for morfologisk diagnostik af MDS, men til trods for at disse anvendes, kan det være udfordrende at basere en MDS-diagnose alene på morfologisk undersøgelse, og der er en relativt stor interobservatør varians i vurderingen af borderline dysplasi^{5,6}. Nogle tilfælde/cases med borderline dysplasi vil have klassiske cytogenetiske forandringer, som definerer en MDS-diagnose, men da det kun er ca. 50% af patienterne med MDS, der har cytogenetiske forandringer, vil det stadig i mange tilfælde være nødvendigt at stille diagnosen baseret på den morfologiske undersøgelse⁷. Det estimeres, at et rutine-udredningsprogram hos kun ca. 1/3 af de hospitalshenviste cytopeni-patienter fører til en MDS-diagnose, mens 2/3 forbliver diagnostisk uafklarede over længere tid⁸. Anvendelse af next generation sequencing (NGS) til kortlægning af det molekylærgenetiske landskab, hvor gener, der hyppigt er muteret i MDS, undersøges, har vist sig at være et nyttigt værktøj i udredningen af denne patientgruppe. Det udgør et væsentligt supplement både i diagnostikken og i bestemmelsen af patientens risiko for udvikling af regelret MDS^{6,8,10}. Denne guideline omhandler udredning af patienter med persisterende cytopeni herunder brugen af NGS.

ICUS (Idiopatisk cytopeni af ukendt signifikans)

- Persisterende cytopeni i mere end 6 måneder
- Ingen karakteristiske cytogenetiske forandringer
- Knoglemarvsundersøgelsen er ikke diagnostisk for MDS eller anden malign tilstand
- Udelukkelse af almindelige årsager til cytopeni, herunder vitaminmangel og andre mangeltilstande
- Udelukkelse af hæmolytiske tilstande

CCUS (Klonal cytopeni af ukendt signifikans):

- Kriterierne for ICUS opfyldt
- Tilstedeværelse af en klonal markør, forstået som en cytogenetisk forandring (fraset tab af kromosom Y), der ikke er diagnostisk for MDS, eller detektion af en eller flere sandsynligt patogene mutationer i et af de undersøgte gener.

FIGUR 1

Skematisk opdeling af patienter med cytopeni og/eller klonal sygdom.

	Raske personer	Patienter med persisterende cytopeni i mere end 6 mdr. (ICUS)		Myelodysplastisk syndrom	
	Klonal hæmatopoiese (CHIP)	Ikkeklonal	Klonal (CCUS)	Lav-risiko	Høj-risiko
Klonalitet	Ja	Nej	Ja	Oftest	Ja
Dysplasi	Nej	Nej	Nej	Ja	Ja
Cytopeni	Nej	Ja	Ja	Ja	Ja
Blaster i %	<5%	<5%	<5%	<5%	>5%
SKS-kode	Ingen	DD758C	DD758D	DD46	DD46

ICUS = idiopatisk cytopeni af ukendt signifikans; CCUS = klonal cytopeni af ukendt signifikans; CHIP = *clonal haematopoiesis of indeterminate potential*.

Udredning af patienter henvist med cytopeni

Blodprøver: Hæmatologi inkl. leukocyt- og differentialtælling, hæmoglobin (hgb), trombocytal, MCV (erythrocyt middelcellevolumen) og retikulocytal. Øvrige blodprøver: serum folat, cobalamin, jern, transferrin, ferritin, LDH, bilirubin, haptoglobin, Coombs test (DAT), ALAT, basisk fosfatase, albumin, urat, kreatinin, erythropoietin (EPO) samt IgG, IgA og IgM. Vira: Screening for HIV samt parvovirus B19 ved hypoplastisk marv. Hepatitisscreening.

Knoglemarvsundersøgelse er essentiel i udredningen af patienter med cytopeni, og flertallet af hæmatologiske tilstande afklares ved en knoglemarvsundersøgelse. Ved MDS findes der pr. definition minimum 10% dysplastiske celler i én eller flere cellelinier; ved ICUS er der færre end 10% eller slet ingen. Det anbefales at gentage undersøgelsen ved tegn på progression eller efter maksimum 4 måneder i tilfælde, hvor kvaliteten af den første knoglemarv er dårlig. Knoglemarvsundersøgelsen suppleres med cytogenetisk undersøgelse. Det anbefales, at man supplerer med genetisk screening for somatiske mutationer med anvendelse af et MDS-specifikt genpanel (se nedenfor).

Differentialdiagnoser: MDS. B12- eller folinsyremangel. Nylig kemoterapi. HIV eller anden infektion. Autoimmun cytopeni. Kronisk leversygdom. Alkoholmisbrug. Tungmetalforgiftning. Medicininduceret cytopeni (gennemgang af medicinstatus). Andre hæmatologiske stamcellesygdomme.

Cytogenetik

Hos patienter med mistænkt MDS eller tilstande med persisterende cytopeni anbefales knoglemarven undersøgt for cytogenetiske forandringer med konventionel karyotypering. Cytogenetisk klonal evolution er associeret med sygdomsprogression og dårlig prognose. Cytogenetisk evaluering skal gentages ved enhver mistanke om sygdomsprogression.

Der bør undersøges mindst 20 metafaser, men færre metafaser kan være tilstrækkelige. Klonalitet defineres som tilstedeværelsen af mindst to metafaser med gevinst af samme kromosom eller samme strukturelle rearrangement (deletion, inversion eller translokation), mens der kræves tilstedeværelse af mindst tre metafaser ved tab af kromosom. Standard cytogenetiske undersøgelser skal aktuelt ikke foregå ved FISH og er ikke implementeret til sekventeringsteknikker endnu. I tilfælde af meget sparsomt cellemateriale eller tekniske problemer med at fremstille metafaser, kan FISH være informativ og følgende regioner bør undersøges: 5q31, cep7, 7q31, 20q, cep8, cepY og 17p13/TP53¹⁰. Man skal dog være opmærksom på, at FISH analyse for de nævnte regioner ikke udelukker andre betydende klonale afvigelser.

I Tabel 1 er angivet de erhvervede cytogenetiske forandringer, som er MDS-definerende også ved fravær af diagnostisk morfologisk dysplasi. Således vil tilstedeværelsen af de i Tabel 1 listede forandringer udelukke en ICUS-tilstand og være diagnostiske for MDS².

Tilstedeværelse af +8, -Y eller del(20q) er ikke MDS-definerende i fravær af diagnostisk dysplasi og vil således kunne findes hos patienter med CCUS.

Tabel 1. MDS-definerende kromosomale forandringer. Gælder også ved fravær af diagnostisk morfologisk dysplasi. Modifieret fra Vardiman et al.¹¹

Forandring	Hypighed (%)
-5 eller del(5q)*	10-15
-7 eller del(7q)	10
i(17q) eller del(17p)	2-3
del(12p) eller t(12p)	1-2
del(11q)	1-2
-13 eller del(13q)	1-2
del(9q)	1
idic(X)(q13)	1
inv(3)(q21q26.2)	1
t(6;9)(p23;q34)	1

t(3;21)(q26.2;q22.1)	<1
t(1;3)(q36.3;q21.2)	<1
t(11;16)(q23;p13.3)	<1
t(2;11)(p21;q23)	<1
*Eneste cytogenetiske forandring, der er definerende for MDS subtype (MDS med isoleret del(5q))	

Supplerende undersøgelser

Flowcytometri

En række studier har vist, at flowcytometri kan bidrage til MDS-diagnostikken bl.a. ved kvantificering af umodne celler og markering af dedifferentieret myelopoiese. Til trods herfor er flowcytometriske undersøgelser ikke formelt inkorporeret i udredningen af persisterende cytopeni, bl.a. pga. manglende konsensus omkring protokoller og teknikker. En anden begrænsning ved flowcytometri er manglende sikker diskrimination mellem reaktiv cytopeni, dysplasi og egentlig myeloid neoplas, især når der er tale om diskrete forandringer¹².

Diagnostisk flowcytometri i udredningen af patienter med cytopeni kræver således parametre med højere specificitet og sensitivitet, reproducerbarhed af data og direkte klinisk translation.

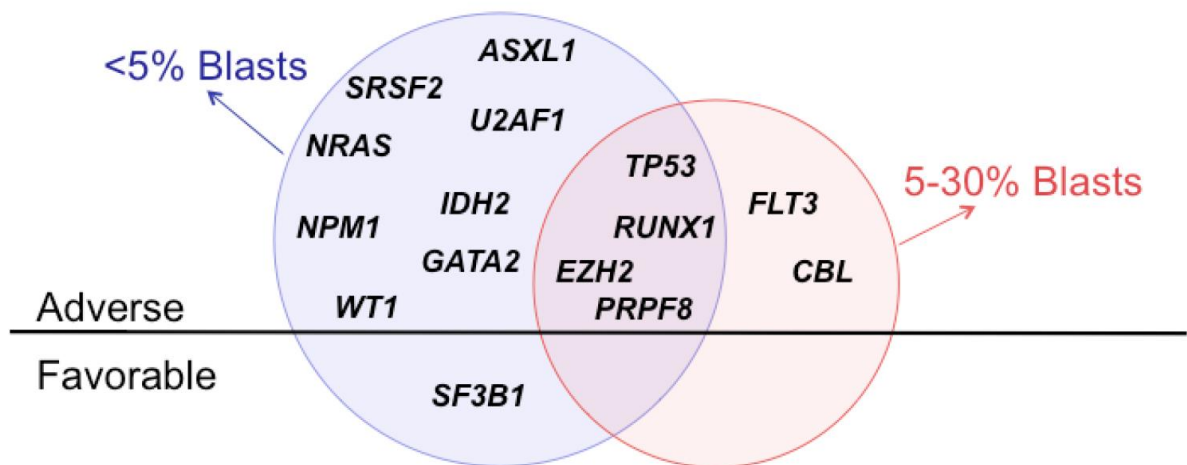
NGS og detektion af mutationer

Brugen af NGS har medført, at man har identificeret de 20-30 hyppigst muterede gener i MDS^{13,14}. Ved lavrisiko MDS har ca. 60-80% af patienterne en mutation i et af de MDS-relaterede gener, mens næsten alle patienter med højrisiko MDS har minimum én og typisk flere mutationer¹⁴. I Tabel 2 er listet de gener, der hyppigt indeholder mutationer hos patienter med lavrisiko MDS eller CCUS.

Tabel 2: De hyppigste gener muteret i lavrisiko MDS og CCUS listet efter hyppighed^{6,8}.

1. TET2	7. ZRSR2	13. TP53	19. BCORL1
2. DNMT3A	8. CBL	14. CEBPA	20. NRAS
3. SRSF2	9. EZH2	15. SETBP1	21. GATA2
4. ASXL1	10. U2AF1	16. IDH2	22. KRAS
5. RUNX1	11. ETV6	17. BCOR	23. JAK2
6. SF3B1	12. IDH1	18. STAG2	

Ved ICUS findes én eller flere mutationer hos ca. 30-50% af patienterne (dvs. de har CCUS), og sandsynligheden, for at patienten har en mutation, øges, hvis der er dysplastiske forandringer i en eller flere cellelinjer⁶. Det er de samme gener, der er muteret ved MDS og CCUS. Kun et enkelt gen (*SF3B1*) er associeret med en bestemt fænotype (MDS med ringsideroblaster)¹⁵, men mutationer i dette gen kan også findes ved CCUS^{6,8}. Således er der ingen mutationer, som er diagnostiske for MDS eller CCUS, og den genetiske undersøgelse skal derfor sammenholdes med andre foretagne undersøgelser. Den prognostiske betydning af enkeltmutationer i de forskellige gener er på nuværende tidspunkt ikke fuldt afklaret. Der er foreløbig identificeret flere mutationer med negativ prognostisk betydning og en enkelt med positiv prognostisk betydning (Figur 2). Der er endnu ingen studier, der har undersøgt betydningen af sameksistensen af mutationer i forskellige gener.



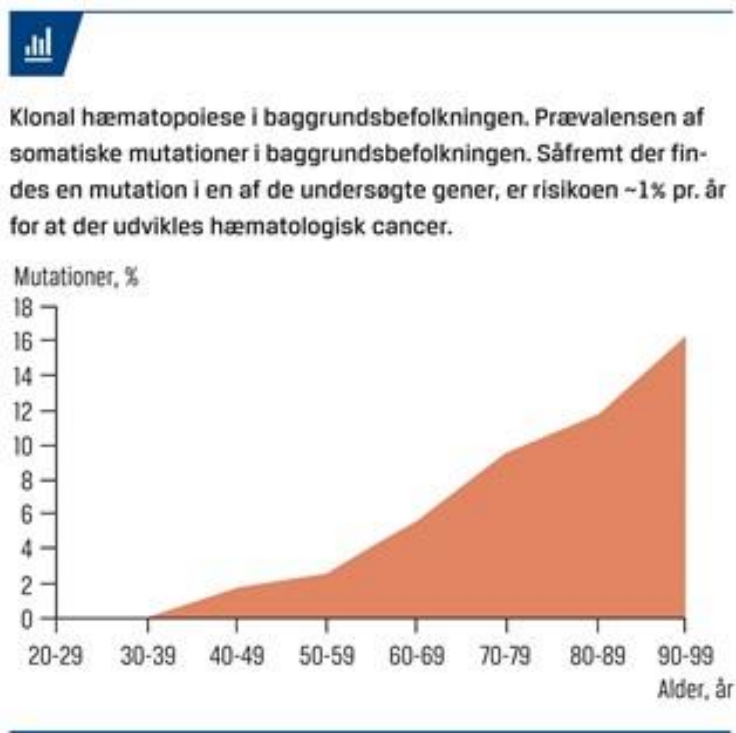
Figur 2: Fra Nordisk MDS-guidelines. Mutationer med prognostisk betydning i MDS. Den prognostiske betydning er tillige afhængig af antallet af blaster i knoglemarven.

Mutationer, klonal hæmatopoiese og aldring

Mutationer i MDS-associerede gener kan også findes hos tilsyneladende raske ældre uden cytopeni. Dette kaldes klonal hæmatopoiese, og prævalensen stiger med alderen (Figur 3). Således har ca. 10% af befolkningen på 70 år mutation i et af de gener, som oftest er muteret ved MDS^{16,17}. Hvis man har klonal hæmatopoiese øger det risikoen med en faktor 12 for senere at få myeloid eller lymfoid hæmatologisk cancer. Sygdomsudviklingen hos individer med klonal hæmatopoiese er ca. 1% pr. år, hvilket er omtrent det samme som risikoen for at få myelomatose, hos individer med monoklonal gammopati af ukendt signifikans (MGUS). På grund af den lave årlige incidens af hæmatologisk cancer hos tilsyneladende raske personer med disse mutationer, og manglende vidende om behandlingseffekter, kan det i øjeblikket ikke anbefales at anvende mutationsanalyse til screening af raske individer (uden cytopeni). Det er desuden ukendt, hvilke risikofaktorer der eksisterer for udvikling af manifest hæmatologisk sygdom hos individer med mutation i et af disse

gener. Klonal hæmatopoiese -, altså en tilfældigt opdaget mutation uden tilhørende cytopeni - betegnes internationalt clonal hematopoiesis of indeterminate potential (CHIP) og er forskellig fra CCUS, hvor de muterede stamceller ikke formår at opretholde et normalt blodcelleniveau.

Figur 3



Arvelige cytopenier

Hos patienter med persisterende cytopeni kan årsagen være en arvelig gendefekt (germline mutation i modsætning til somatisk mutation). Dette er især undersøgt og identificeret hos patienter med persisterende trombocytopeni og øget blødningstendens¹⁸. En del af disse mutationer er, foruden trombocytopeni, forbundet med en øget risiko for udvikling af MDS, f.eks. mutationer i generne *RUNX1* og *ETV6*. Der er desuden flere arvelige syndromer, som øger risikoen for udvikling af MDS. Dette ses bl.a. ved mutationer i *GATA2*, *CEBPA*, *SBDS*, *DDX41*, ved Fanconi anæmi generne (FA) samt gener involveret i opretholdelsen af normale telomerlængder som

dyskeratosis congenita (DKC)¹⁹. Det er endnu ikke velundersøgt, om germline mutationer i disse gener også kan findes hos patienter med persisterende cytopeni. Således er familiehistorien vigtig ved stillingtagen til genetisk udredning ved persisterende cytopeni.

Ved undersøgelse for somatiske mutationer, hvor der findes en mutation i fx *GATA2*, *ETV6*, *RUNX1*, *CEBPA* eller *TP53* med en variant allel frekvens (VAF) omkring 50%, bør man være meget opmærksom på, at denne kan være af germline oprindelse, og dermed kræve nærmere genetisk udredning.

Tabel 3: Myeloide neoplasier associeret med arvelige tilstande og prædisponerende gener. Adopteret efter WHO klassifikationen².

Klassifikation af myeloide neoplasier med germline prædisposition

AML med germline *CEBPA* mutation

Myeloide neoplasier med germline *DDX41* mutation

Myeloide neoplasier med germline prædisponering og trombocytopeni

Myeloide neoplasier med germline *RUNX1* mutation*

Myeloide neoplasier med germline *ANKRD26* mutation*

Myeloide neoplasier med germline *ETV6* mutation*

Myeloide neoplasier med germline prædisposition og anden organ dysfunktion

Myeloide neoplasier med germline *GATA2* mutation

Myeloide neoplasier associeret med arvelige knoglemarvssvigt syndromer

Myeloide neoplasier associeret med telomersygdom

Juvenil myelomonocytær leukæmi (JMML) associeret med neurofibromatose, Noonan syndrom

Noonansyndrom lignende tilstande

Myeloide neoplasier associeret med Down syndrom*

*Lymfoide neoplasier er også rapporteret

Transplantation

Transplantation er den eneste helbredende behandling for patienter med CCUS ligesom ved MDS. Der foreligger ingen rekommandationer for transplantation hos patienter med ICUS. Grundet ligheden mellem CCUS og lavrisiko MDS bør disse håndteres ens. De nuværende MDS guidelines anbefaler generelt ikke transplantation i lavrisiko MDS (Transplantations Guideline på hematology.dk), medmindre der foreligger en svært belastende cytopeni. I den nyeste

molekylærgenetiske forskning på området er der tilsyneladende identificeret gener, som har negativ prognostisk betydning for overlevelse hos patienter med lavrisiko MDS (Figur 2). Vi anbefaler derfor, at man ved beslutning om transplantation foretager molekylærgenetisk undersøgelse og inddrager mutationsstatus som en del af beslutningsgrundlaget for henvisning til transplantation. Der findes endnu ingen publicerede undersøgelser, der har vurderet overlevelse eller relapsrisiko efter transplantation i denne patientgruppe, men ved hjælp af NGS kan man identificere patienter i risiko for at progrediere til MDS eller AML⁹.

Anbefalinger

- Patienter over 50 år, hvor der foretages kromosomanalyse og herved bred udredning, er kandidater til udredning med en targeteret genetisk screening for somatiske mutationer (NGS).
- Patienter, der på baggrund af komorbiditet og alder er mulige kandidater til knoglemarvstransplantation, bør have foretaget genetisk screening som led i udredningsprogrammet. Hos andre patienter kan man vente og se, om cytopenien persisterer i mere end 6 måneder, før der foretages en genetisk screening for at fastslå årsagen til den persisterende cytopeni.
- Hos alle unge patienter under 50 år med transfusionskrævende cytopeni samt hos patienter med en familiehistorie med hæmatologisk cancer anbefales genetisk screening for mutationer i gener associeret med arvelig MDS. Hvis der ikke tidligere er testet for somatiske mutationer gøres dette samtidigt.
- Transplantation
 - Overvejes ved fund af tre eller flere mutationer med kendt association til myeloid cancer, men transplantation vil altid afhænge af en individuel vurdering.
 - Fund af *TP53* mutation uden cytogenetiske forandringer, bør give anledning til overvejelser om tidlig transplantation.
- Kodning af persisterende cytopeni ved brug af de nyligt oprettede specifikke diagnosekoder for henholdsvis ICUS (DD758C) og CCUS (DD758D).
- Patienter uden mutationer, og ingen andre hæmatologiske årsager til persisterende cytopeni, kan afsluttes til henvisende læge. Hvorimod patienter med mutationer følges med blodprøver hver 6 måned og knoglemarv ved mistanke om progression.

Referencer

1. Valent P. Low blood counts: immune mediated, idiopathic, or myelodysplasia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012;2012:485-491. doi:10.1182/asheducation-2012.1.485.
2. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-2406. doi:10.1182/blood-2016-03-643544.The.
3. Goasguen JE, Bennett JM, Bain BJ, et al. Quality Control Initiative on the Evaluation of the Dysmegakaryopoiesis in Myeloid Neoplasms: Difficulties in the Assessment of Dysplasia. *Leuk Res*. 2016;45:75-81. doi:10.1016/j.leukres.2016.04.009.
4. Parmentier S, Schetelig J, Lorenz K, et al. Assessment of dysplastic hematopoiesis: Lessons from healthy bone marrow donors. *Haematologica*. 2012;97(5):723-730. doi:10.3324/haematol.2011.056879.
5. Della Porta MG, Travaglino E, Boveri E, et al. Minimal morphological criteria for defining bone marrow dysplasia: a basis for clinical implementation of WHO classification of myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2015;29(1):66-75. doi:10.1038/leu.2014.161.
6. Hansen JW, Westman MK, Sjö LD, et al. Mutations in idiopathic cytopenia of undetermined significance assist diagnostics and correlate to dysplastic changes. *Am J Hematol*. 2016;91(12):1234-1238. doi:10.1002/ajh.24554.
7. Schanz J, Tüchler H, Solé F, et al. New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *J Clin Oncol*. 2012;30(8):820-829. doi:10.1200/JCO.2011.35.6394.
8. Kwok B, Hall JM, Witte JS, et al. MDS-associated somatic mutations and clonal hematopoiesis are common in idiopathic cytopenias of undetermined significance. *Blood*. 2015;126(21):2355-2361. doi:10.1182/blood-2015-08-667063.
9. Malcovati L, Gallì A, Travaglino E, et al. Clinical significance of somatic mutation in unexplained blood cytopenia. *Blood*. 2017;129(25):3371-3378. doi:10.1182/blood-2017-01-763425.
10. Valent P, Orazi A, Steensma DP, et al. Proposed minimal diagnostic criteria for myelodysplastic syndromes (MDS) and potential pre-MDS conditions. *Oncotarget*. 2017;8(43):73483-73500. doi:10.18632/oncotarget.19008.
11. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009;114(5):937-951. doi:10.1182/blood-2009-03-209262.
12. Cremers EMP, Westers TM, Alhan C, et al. Multiparameter flow cytometry is instrumental to distinguish myelodysplastic syndromes from non-neoplastic cytopenias. *Eur J Cancer*. 2016;54:49-56. doi:10.1016/j.ejca.2015.11.013.
13. Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2013;122(22):3616-3627. doi:10.1182/blood-2013-08-518886.

14. Haferlach T, Nagata Y, Grossmann V, et al. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2013;28(2):241-247. doi:10.1038/leu.2013.336.
15. Malcovati L, Karimi M, Papaemmanuil E, et al. SF3B1 mutation identifies a distinct subset of myelodysplastic syndrome with ring sideroblasts. *Blood*. 2015;126(2):233-241. doi:10.1182/blood-2015-03-633537.
16. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, et al. Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes. *N Engl J Med December*. 2014;25(37126):2488-2498. doi:10.1056/NEJMoa1408617.
17. Genovese G, Kähler AK, Handsaker RE, et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med*. 2014;371(26):2477-2487. doi:10.1056/NEJMoa1409405.
18. Leinøe E, Zetterberg E, Kinalis S, et al. Application of whole-exome sequencing to direct the specific functional testing and diagnosis of rare inherited bleeding disorders in patients from the Öresund Region, Scandinavia. *Br J Haematol*. 2017;179(2):308-322. doi:10.1111/bjh.14863.
19. Niemeyer CM, Mecucci C. Practical considerations for diagnosis and management of patients and carriers. *Semin Hematol*. 2017;54(2):69-74. doi:10.1053/j.seminhematol.2017.04.002.