

# PRAKTYCZNY PRZEWODNIK

po diagnostyce mutacji *FLT3* u chorych z OBSZ

1. badanie przesiewowe *FLT3*-ITD. oraz TKD
2. oznaczenie allelic ratio *FLT3*-ITD.:WT

wg protokołu PALG/RATIFY



STANDARD OPERATING PROCEDURE  
DLA BADACZY KLINICZNYCH PALG

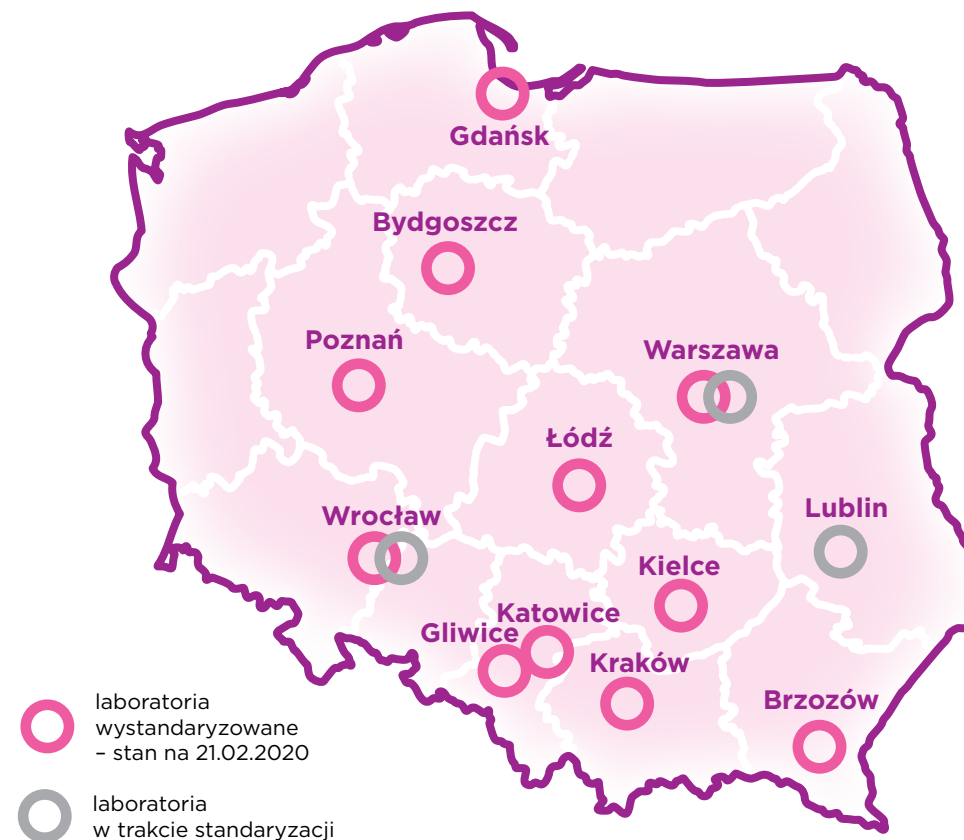
**Przewodnik opracowany w ramach realizacji projektu:**

„Standaryzacja Badań Mutacji *FLT3*” realizowanego  
w pracowniach referencyjnych d/s diagnostyki  
OBSz PALG -SHM PTGCz

**Koordynator naukowy projektu:** dr Marta Libura

1. Laboratoria referencyjne PALG d/s diagnostyki OBSz w Polsce .....	3
2. Schemat aspiracji diagnostycznej szpiku w OBSz -workflow .....	6
3. Preparatyka materiału w OBSZ - workflow .....	7
4. Schemat diagnostyki molekularnej w OBSZ wg ELN2017/RATIFY, NCCN, AMLSG/HOVON .....	8
5. Schemat diagnostyki mutacji <i>FLT3</i> wg PALG/RATIFY .....	9
6. Metodologia badania mutacji <i>FLT3</i> : ITD & TKD - workflow .....	10
7. WYNIK badania <i>FLT3</i> : ITD & TKD - przykład .....	13
8. Badanie allelic ratio <i>FLT3</i> -ITD:wt .....	14
1. Aspekt kliniczny i biologiczny AR .....	14
2. Aspekt metodologiczny badań AR .....	14
9. WYNIK i INTERPRETACJA badań AR <i>FLT3</i> -ITD:wt - przykłady .....	20

14 PRACOWNI PALG-SHM/PTGCz  
- REFERENCYJNYCH d/s. DIAGNOSTYKI OBSZ W POLSCE



○ laboratoria  
wystandaryzowane  
- stan na 21.02.2020

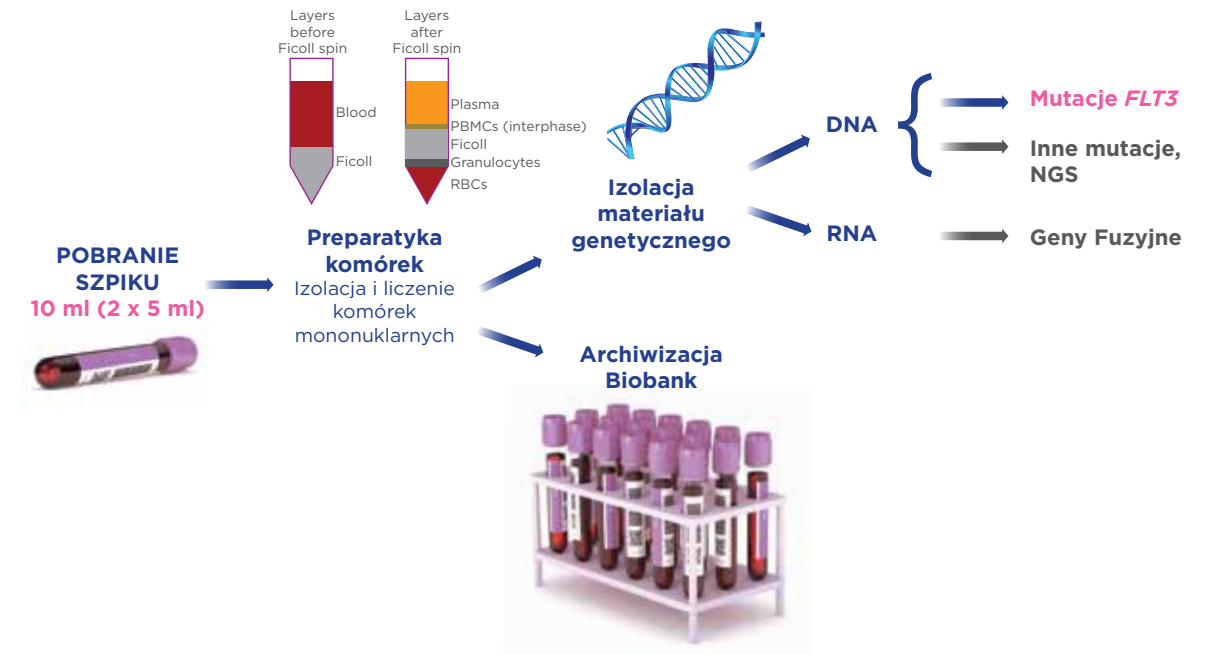
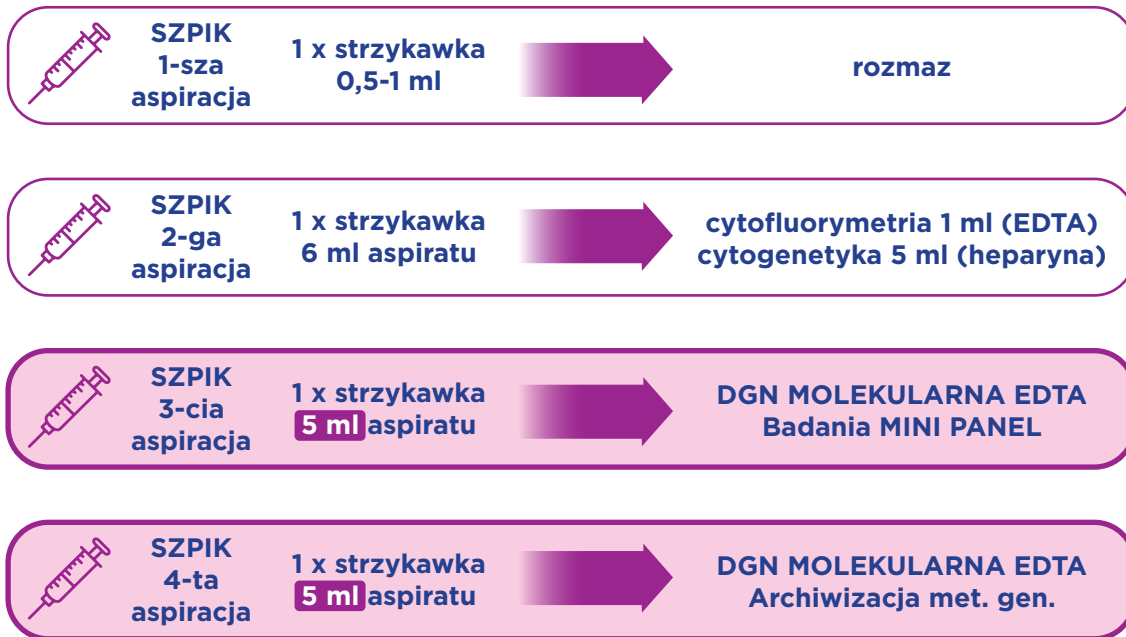
○ laboratoria  
w trakcie standaryzacji

## LISTA REFERENCYJNYCH PRACOWNI DLA DIAGNOSYKI OBSZ W PL BIORĄCYCH UDZIAŁ W STANDARYZACJI BADAŃ MUTACJI FLT3

Miasto	Ośrodek	Badacz PALG	Kierownik
<b>WARSZAWA</b>	Pracownia Biologii i Genetyki Molekularnej Uniwersyteckie Centrum Patomorfologii Uniwersyteckie Centrum Kliniczne Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego ul. Pawińskiego 7, 02-106 Warszawa	Dr n.med. Tomasz Stokłosa tomasz.stoklosa@uckwum.pl Mgr Bartłomiej Sankowski sanbartek@gmail.com Mgr Albert Moskowicz albert.moskowicz@gmail.com Tel.: 22 599 17 92, pbigm@uckwum.pl	Dr n.med. Tomasz Stokłosa/ Prof. dr hab. n. med. Grzegorz Basak
<b>KRAKÓW</b>	Zakład Diagnostyki Hematologicznej i Genetyki Szpital Uniwersytecki w Krakowie ul. Jakubowskiego 2 30-688 Kraków	Dr n. med. Magdalena Zawada Dr n.med. Sylwia Czekalska Tel/fax: 12 400 36 54 mzawada@su.krakow.pl, szczekalska@su.krakow.pl	Dr n. med. Magdalena Zawada/ Prof. dr hab. n. med. Tomasz Sacha
<b>BYDGOSZCZ</b>	Katedra i Zakład Genetyki Klinicznej CMUMK w Bydgoszczy ul. M. Skłodowskiej 9 85-094 Bydgoszcz	Mgr inż. Karolina Matiakowska Mgr inż. Alicja Bartoszevska-Kubiak Tel: 52 585 36 71, tel: 52 585 38 56 kmatiakowska@tlen.pl, a_bartoszevska@tlen.pl	Prof. dr hab. n.med. Olga Haus
<b>KATOWICE</b>	Pracownia Biologii Molekularnej Laboratorium Hematologiczne Klinika Hematologii i Transplantacji Szpiku w Katowicach, ul Dąbrowskiego 25, 40-027 Katowice	Mgr. Agnieszka Karolczyk Dr n.med. Małgorzata Stachowicz Tel: (32) 25 91 323 akarolczyk@interia.pl, g_stach@o2.pl	Mgr. Joanna Dziackowska-Suszek
<b>WARSZAWA</b>	Pracownia Biologii Molekularnej, Zakład Diagnostyki Hematologicznej, Instytut Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie ul. Gandhi 14 02-776 Warszawa	Dr n. med. Iwona Solarska Dr n. biol. Magdalena Wojtas Mgr Grażyna Nowak Tel: 22 34 96 171/170 isolarska@ihit.waw.pl mwojtas@ihit.waw.pl gbnnowak@ihit.waw.pl	Dr n. med. Iwona Solarska / Prof. dr hab. n.med. Przemysław Juszczynski
<b>WROCLAW</b>	Pracownia Biologii Molekularnej i Cytogenetyki, Przyklinikalne Laboratorium Hematologiczne, Klinika Hematologii, Nowotworów Krwi i Transplantacji Szpiku, Uniwersytecki Szpital Kliniczny we Wrocławiu ul. Pasteura 4, 50-367 Wrocław	Mgr inż. Bożena Jaźwiec Mgr Jagoda Rewus Mgr Krystyna Fajfer Tel: 71 784 26 07 lab-molek@spsk1.com.pl, bozena.jazwiec@umed.wroc.pl	Prof. dr hab. n.med. Tomasz Wróbel/ dr n. med. Marta Sobas
<b>POZNAN</b>	Pracownia Biologii Molekularnej Laboratorium Diagnostyki Hematologicznej Szpital Kliniczny Przemienienia Pańskiego Klinika Hematologii i Transplantacji Szpiku UM w Poznaniu, ul. Szamarzewskiego 82/84, 60-569 Poznań	Mgr Kinga Eling Dr n.med. Michał Gniot Tel. 61 854 95 97 kinga.eling@skpp.edu.pl michal.gniot@ump.edu.pl lewandowski@ump.edu.pl	Prof. dr hab. n.med. Krzysztof Lewandowski

## LISTA REFERENCYJNYCH PRACOWNI DLA DIAGNOSYKI OBSZ W PL BIORĄCYCH UDZIAŁ W STANDARYZACJI BADAŃ MUTACJI FLT3

Miasto	Ośrodek	Badacz PALG	Kierownik
<b>ŁÓDŹ</b>	Pracownia Immunologii Klinicznej, Transplantacyjnej i Genetyki Wojewódzki Szpital Specjalistyczny im. Mikołaja Kopernika w Łodzi, ul. Pabianicka 62, 93-513 Łódź	Mgr Joanna Kamińska Mgr Izabela Węclaw Mgr Katarzyna Wasilewska Mgr Aleksandra Sobierajczyk Mgr Michał Soin Tel. ośr. 42 689 52 80 pracownia_hla@kopernik.lodz.pl	Dr n. med. Aleksandra Kaczmarek / Prof. dr hab. n.med. Agnieszka Wierzbowska
<b>GDAŃSK</b>	Laboratorium Hematologii Uniwersyteckie Centrum Kliniczne Pracownia Diagnostyki Molekularnej ul. Dębinki 7, 80-211, Gdańsk	Dr n. med. Aleksandra Leszczyńska Dr n. biol. Urszula Charmuszko Tel: 58 349 22 16 ola5@gumed.edu.pl, ucharmuszko@uck.gda.pl	Prof. dr hab. n.med. Jan Zaucha
<b>KIELCE</b>	Zakład Diagnostyki Molekularnej, Świętokrzyskie Centrum Onkologii ul. St. Artwińskiego 3, 25-734 Kielce	Doc. dr hab. n.med. Artur Kowalik arturko@onkol.kielce.pl, artur_kowalik@yahoo.com Mgr Magdalena Stawiarz magda5.stawiarz@gmail.com Mgr Karolina Wąsowska karolka9208@gmail.com Tel. ośr. 41 367 42 59, fax. 41 367 42 60	Dr n.med. Artur Kowalik/ Prof. dr hab. n.med. Marcin Pasiarski
<b>GLIWICE</b>	Centrum Onkologii Instytut-Klinika Transplantacji Szpiku Onkohematologii w Gliwicach 44-101, ul. Wybrzeże Armii Krajowej	Dr n. med. Smagur Andrzej andrzej.smagur@io.gliwice.pl Mgr Agata Chwieduk agata.chwieduk@io.gliwice.pl Tel. ośr. 32 278 98 93	Prof. dr hab. n.med. Sebastian Giebel
<b>LUBLIN</b>	Laboratorium Diagnostyki Molekularnej Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny nr 1 w Lublinie, ul. Staszica 11, 20-081 Lublin	Dr hab. n.med. Agata Filip Dr n. med. Sylwia Chocholska Mgr inż. Klaudia Kot Tel. 81 4486102 agata.filip@umlub.pl sylwia.chocholska@umlub.pl klaudiakot08@gmail.com	Dr hab. n.med. Agata Filip
<b>BRZOSZÓW</b>	Laboratorium Diagnostyki Molekularnej Cytogenetyki i Cytometrii Szpital Specjalistyczny w Brzozowie Podkarpacki Ośrodek Onkologiczny 36-200 Brzozów ul.Ks.Bielawskiego 18 bud.K	Mgr Katarzyna Kozma katarzynakozma@gmail.com Tel. kom. 781 074 238 Dr n. med Marek Cieśla ciesla_marek@wp.pl Tel. kom.515 367 922	Dr n.med. Dorota Hawrylecka
<b>WROCLAW</b>	Dolnośląskie Centrum Transplantacji Komórkowych z Krajowym Bankiem Dawców Szpiku, 53-439 Wrocław, ul. Grabiszyńska 105	Mgr Jolanta Bocheńska bochenska@dctk.wroc.pl Tel. kom.781 074 238	Dr n.med. Mariola Sędzimirska



**1. Pakiet minimum<sup>1</sup>**  
- wyniki do 48-72 godz<sup>2</sup>.

Geny fuzyjne: *PML-RARA*, *RUNX1-RUNX1T1*, *CBFb-MYH11*,  
*BCR-ABL1*, *MLL3-KMT2A*

Mutacje wewnątrzgenowe<sup>3</sup>: *NPM1*, *CEBPA*, *IDH1/2*, *FLT3-ITD* oraz *FLT3 TKD*

**2. Pakiet rozszerzony wg ELN2017**  
- wyniki do 5-10 dni (1 cyklu indukcji)

mutacje wewnątrzgenowe: *RUNX1*, *ASXL1*, *TP53*<sup>3</sup>

Allelic ratio *FLT3-ITD:wt*<sup>4</sup>

**3. NGS - pakiet mieloidalny (minimum)**  
- 3-6 tygodni

Koncentrat do sporządzania roztworu do infuzji.

Przezroczysty do lekko opalizującego bezbarwny do białozółtego płyn.

1. W porównaniu do „Pakietu Minimum” proponowanego w chwili rozpoczęcia badania PALG-AML1/2016 –włączono mutacje *IDH1/2*, gen fuzyjny *MLL3-KMT2A*;  
2. UWAGA w ramach PALG czas 48-72 godz obowiązuje jedynie dla badań mutacji *FLT3*!  
3. Mutacje w wymienionych genach mogą być przebadane w ramach badania NGS pakietu mieloidalnego minimum; analiza tych genów powinna mieć miejsce jako pierwsza przed innymi genami, tak aby respektować czaswyniku.  
4. Nieliczne laboratoria referencyjne PALG wykonują badania allelic ratio już w momencie diagnozy.

**1. Przesiewowe - jakościowe badanie mutacji *FLT3***

ITD  
TKD

Czułość i specyficzność  
Czas: 48-72 godz

Wynik pozytywny:  
kwalifikacja do  
Midostauryny

**2. Półilościowe badanie allelic ratio *FLT3-ITD:wt*<sup>1</sup>**

Czynnik rokowniczy

Wynik AR <0,5 *NPM1(+)*  
brak rekomendacji  
do alloHSCT

1 Nieliczne laboratoria referencyjne PALG wykonują badania allelic ratio już w momencie diagnozy.

## ZALECENIA REKOMENDOWANE

Jako materiał wyjściowy można użyć RNA (badanie jest czulsze) jednak protokół jest bardziej czasochłonny i angażujący diagnostę (tj. przygotowanie matrycy RNA: izolacja + reakcja odwrotnej transkrypcji). **Jest to istotne jeśli wynik ma być wydany w ciągu 48-72 godz.**

Protokół PCR: warunki jakościowe<sup>2</sup>

### Primery:

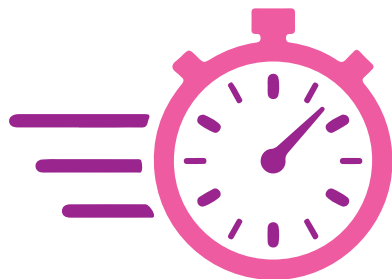
- dla ITD: wg e.g Thiede et al 2001, Huang et al, Nakao Met al 1996
- dla TKD: wg e.g. Murphy et al. 2003

## ZALECENIA OBLIGATORYJNE

Czułość badania obu mutacji: = lub < 5% komórek *FLT3*(+)

Wizualizacja produktów PCR: elektroforeza kapilarna z analizą fragmentów

**Wynik: w ciągu 48-72 godz**



**Wizualizacja produktu PCR**



**PCR**  
Primery  
znakowane  
fluorochromem  
w egzonie 14-15

### Przykład:

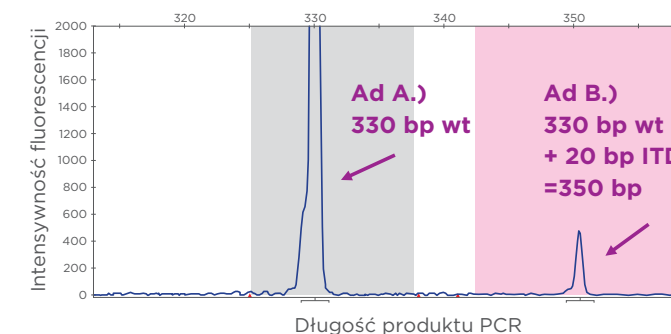
A). Fragment bez duplikacji (dziki wt)



B). Fragment z duplikacją (ITD)

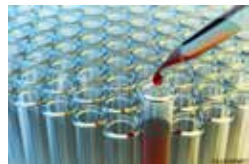


### Elektroforeza kapilarna - analiza fragmentów



1. Jako materiał wyjściowy można użyć RNA (badanie jest czulsze) jednak protokół jest bardziej czasochłonny i angażujący diagnostę (tj. przygotowanie matrycy RNA jest dłuższe: izolacja + reakcja odwrotnej transkrypcji).

2. Nieliczne laboratoria referencyjne PALG wykonują badania allelic ratio już w momencie diagnozy.

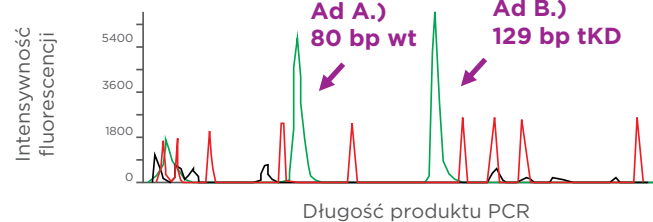


**PCR**  
 Primery  
 znakowane  
 Fluo Egzon 20



**Produkty  
 trawienia**

**Elektroforeza kapilarna - analiza fragmentów**



**Trawienie enzymami  
 restrykcyjnymi  
 produktu PCR**

**Wizualizacja produktu  
 PCR**



**WYNIK *FLT3*-ITD:  
 POZYTYWNY**

**WYNIK *FLT3* TKD:  
 NEGATYWNY**

**INTERPRETACJA wg RATIFY**

**Obecność *FLT3*-ITD w badanym materiale  
 jest wskazaniem do podania inhibitora *FLT3***

AR - aspekt biologiczny i kliniczny

WYSOKIE AR ↑

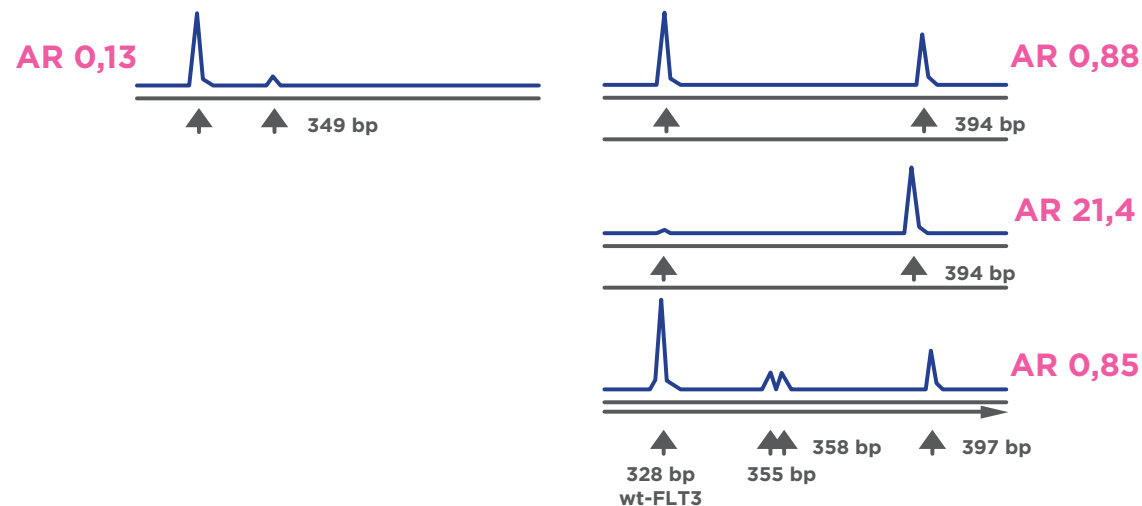
⇒ WIĘKSZE RYZYKO CHOROBY BIALLELICZNEJ ↑

⇒ GORSZE ROKOWANIE ↓

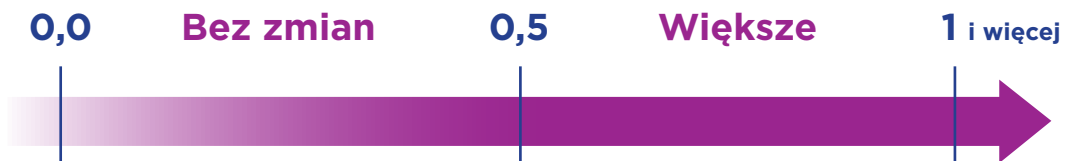


RYZYKO:

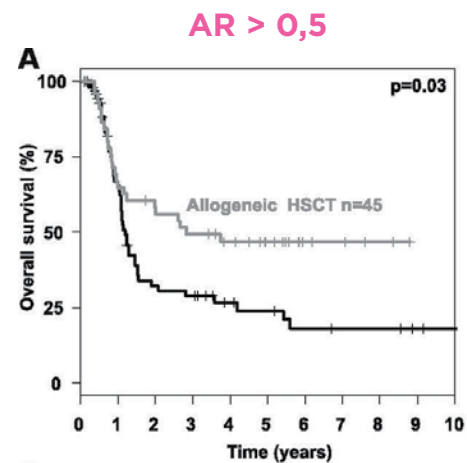
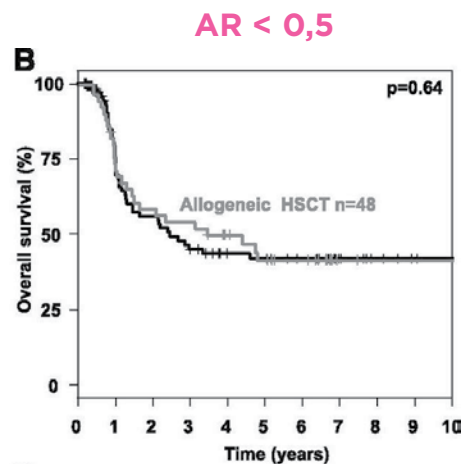
- Choroby biallelicznej
- Nawrotu białaczki







PRAWDOPODOBIENSTWO  
dłuższego przeżycia po alloHSCT



AR - aspekt metodologiczny

WYJĄTKOWO DUŻE ↑  
ROZBIEŻNOŚCI W WYNIKACH AR *FLT3*-ITD:WT\*

\* Dane wg UK NQAS - międzynarodowej organizacji akredytującej laboratoria w UK.

---

**PROTOKÓŁ PCR**  
**- OBOWIĄZKOWE WARUNKI PÓLILOŚCIOWE**

- ➔ **LICZBA CYKLI PCR :** **29 CYKLI**
  - ➔ **ILOŚĆ DNA:** **5 NG**
  - ➔ **PCR OBJĘTOŚĆ REAKCJI:** **50 UL**
  - ➔ **LICZBA PRÓBEK BADANCH :** **TRIPLIKATY !!!**
  - ➔ **POLIMERAZA AMPLITAQ GOLD Z BUFOREM NR 1**  
(UWAGA polimeraza AmpliTaq Gold 360 oraz bufor nr 2 nie mogą być stosowane do oznaczeń AR)
- 

**STANDARYZACJA ALLELIC RATIO**  
***FLT3*-ITD:WT**

PORÓWNANIE WYNIKÓW AR  
UZYSKANYCH W 12 PRACOWNIACH  
REFERENCYJNYCH DLA OBSZ  
W POLSCE

## WSPÓŁCZYNNIK ZMIENNOŚCI

COEFFICIENT OF VARIATION  $CV = [SD / MEAN] \times 100\%$

MIARA HETEROGENNOŚCI WYNIKÓW AR DLA 1 PRÓBKII PACJENTA

## PORÓWNANIE WYNIKÓW AR W PRACOWNIACH REFERENCYJNYCH

KRYTERIA AKCEPTACJI BADANIA WG THIEDE



CV

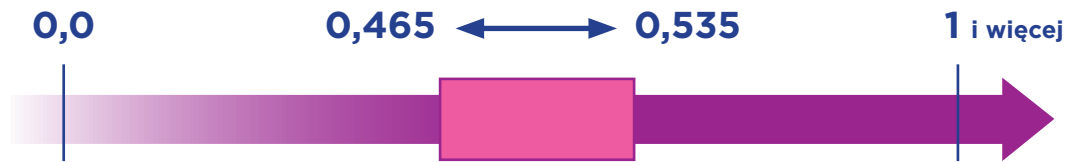
Precyzja badania ↓	← 5% →	SD: 0,025	AR: 0,475 - 0,525
	← 10% →	SD: 0,05	AR: 0,45 - 0,55
	← 20% →	SD: 0,1	AR: 0,4 - 0,6
	← 50% →	SD: 0,25	AR: 0,25 - 0,75

Im wyższy CV ↑ tym mniejsza precyzja badania ↓

Współczynnik zmienności  
dla 12 pracowni

**CV = 6,55%<sup>1,2</sup>**

1. Wynik jest akceptowalny jeśli CV dla tripliketu jest <10% wg kryteriów prof Thiede.  
2. Wynik ustalony na początku roku 2020 - może jeszcze ulec zmianie w przeciągu najbliższych 3 miesięcy.



### INTERPRETACJA wg ELN2017 -PALG:

AR > 0,532	Wskazanie do alloHSCT wg ELN2017
<b>AR 0,465-0,535</b>	<i>Przedział niepewności metody dla Pracowni Referencyjnych PALG</i> <b>Do indywidualnej decyzji terapeutycznej lekarza</b>
AR < 0,465 i NPM1(+)	Brak wskazania do alloHSCT wg ELN2017

WYNIK (średnia z trzech powtórzeń):

**AR = 0,53**

### INTERPRETACJA KLINICZNA wg ELN2017-PALG

**Wynik stanowi wskazanie do alloHSCT**

#### KOMENTARZ - INTERPRETACJA WYNIKU wg ELN2017/PALG:

<b>AR &gt; 0,535</b>	<b>Wskazanie do alloHSCT</b>
AR 0,465-0,535	<i>Przedział niepewności metody dla pracowni PALG</i> Kwalifikacja do alloHSCT –do indywidualnej decyzji lekarza
AR < 0,465 i NPM1(+)	Brak wskazań do alloHSCT

WYNIK (średnia z trzech powtórzeń):

**AR = 0,51**

Wynik w przedziale niepewności metody dla pracowni  
ref. PALG: AR 0,465-0,535

INTERPRETACJA KLINICZNA wg ELN2017-PALG

**Kwalifikacja do alloHSCT  
- do indywidualnej decyzji lekarza**

**KOMENTARZ - INTERPRETACJA WYNIKU wg ELN2017/PALG:**

AR > 0,535      Wskazanie do alloHSCT

**AR 0,465-0,535**      **Przedział niepewności metody dla pracowni PALG  
Kwalifikacja do alloHSCT -do indywidualnej decyzji  
lekarza**

AR < 0,465 i NPM1(+) Brak wskazań do alloHSCT

WYNIK (średnia z trzech powtórzeń):

**AR = 0,47**

Wynik w przedziale niepewności metody dla pracowni  
ref. PALG: AR 0,465-0,535

INTERPRETACJA KLINICZNA wg ELN2017-PALG

**Kwalifikacja do alloHSCT  
- do indywidualnej decyzji lekarza**

**KOMENTARZ - INTERPRETACJA WYNIKU wg ELN2017/PALG:**

AR > 0,535      Wskazanie do alloHSCT

**AR 0,465-0,535**      **Przedział niepewności metody dla pracowni PALG  
Kwalifikacja do alloHSCT -do indywidualnej decyzji  
lekarza**

AR < 0,465 i NPM1(+) Brak wskazań do alloHSCT

---

**WYNIK (średnia z trzech powtórzeń):**

**AR = 0,45**

**Mut NPM1 +**

**INTERPRETACJA KLINICZNA wg ELN2017-PALG**

**Wynik nie stanowi wskazania do alloHSCT**

---

**KOMENTARZ - INTERPRETACJA WYNIKU wg ELN2017/PALG:**

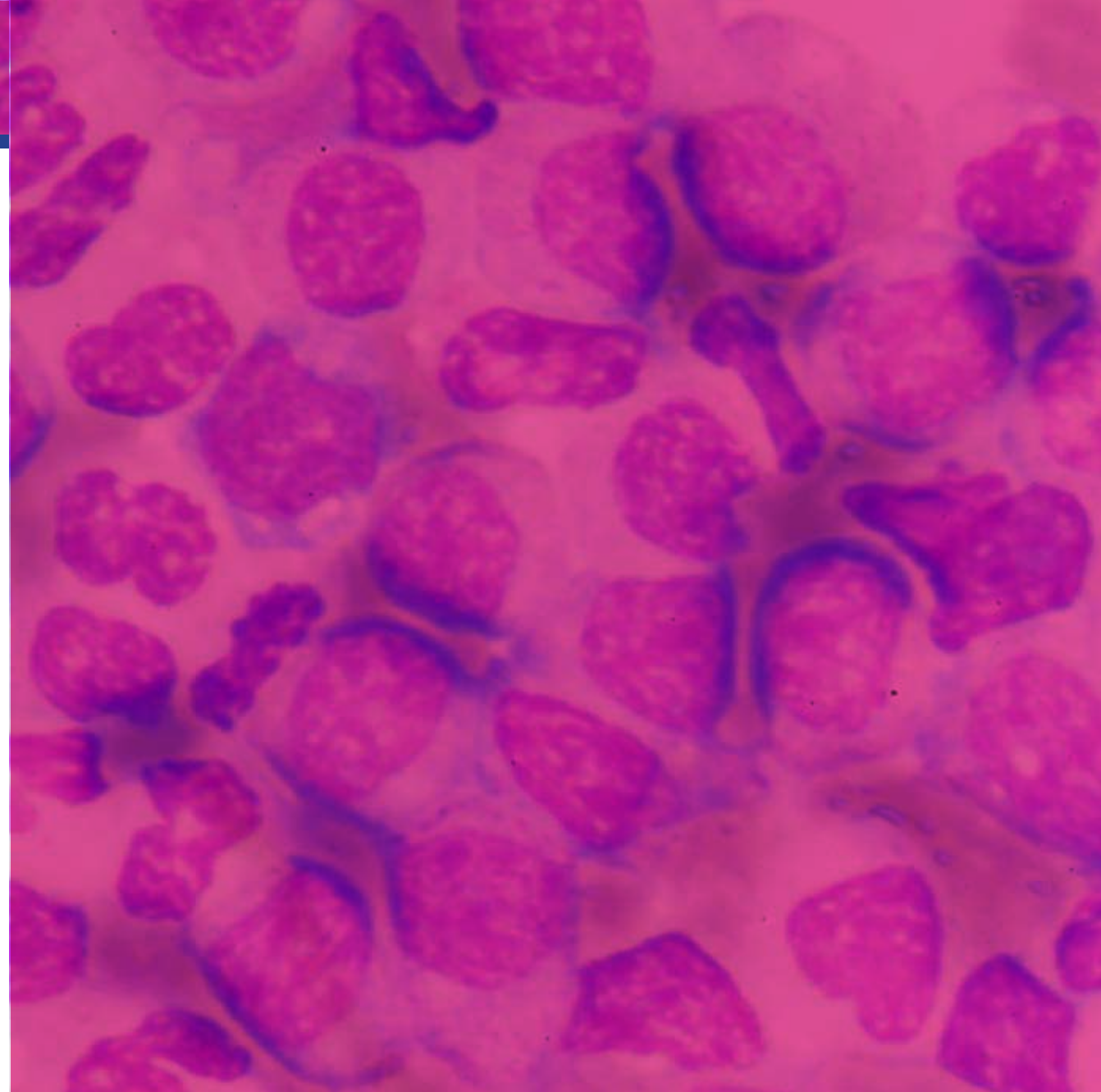
*AR > 0,535*

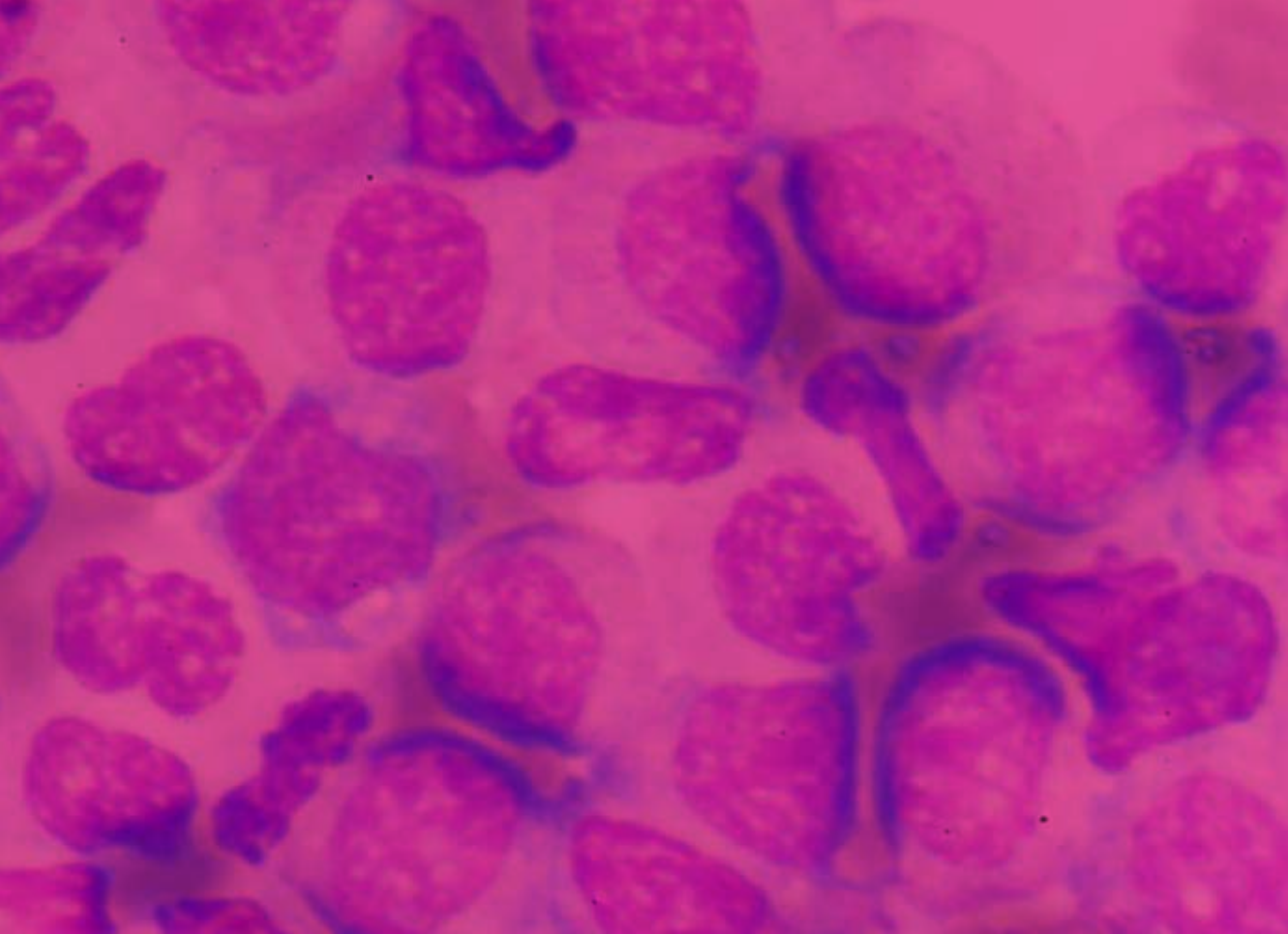
*Wskazanie do alloHSCT*

*AR 0,465-0,535*

*Przedział niepewności metody dla pracowni PALG  
Kwalifikacja do alloHSCT -do indywidualnej decyzji  
lekarza*

***AR < 0,465 i NPM1(+) Brak wskazań do alloHSCT***





**Novartis Poland Sp. z o.o.**

ul. Marynarska 15, 02-674 Warszawa, Polska  
Tel: +48 22 375 48 88; Fax: +48 22 375 47 00  
Email: [kontakt.polska@novartis.com](mailto:kontakt.polska@novartis.com)  
[www.novartis.pl](http://www.novartis.pl)

