

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

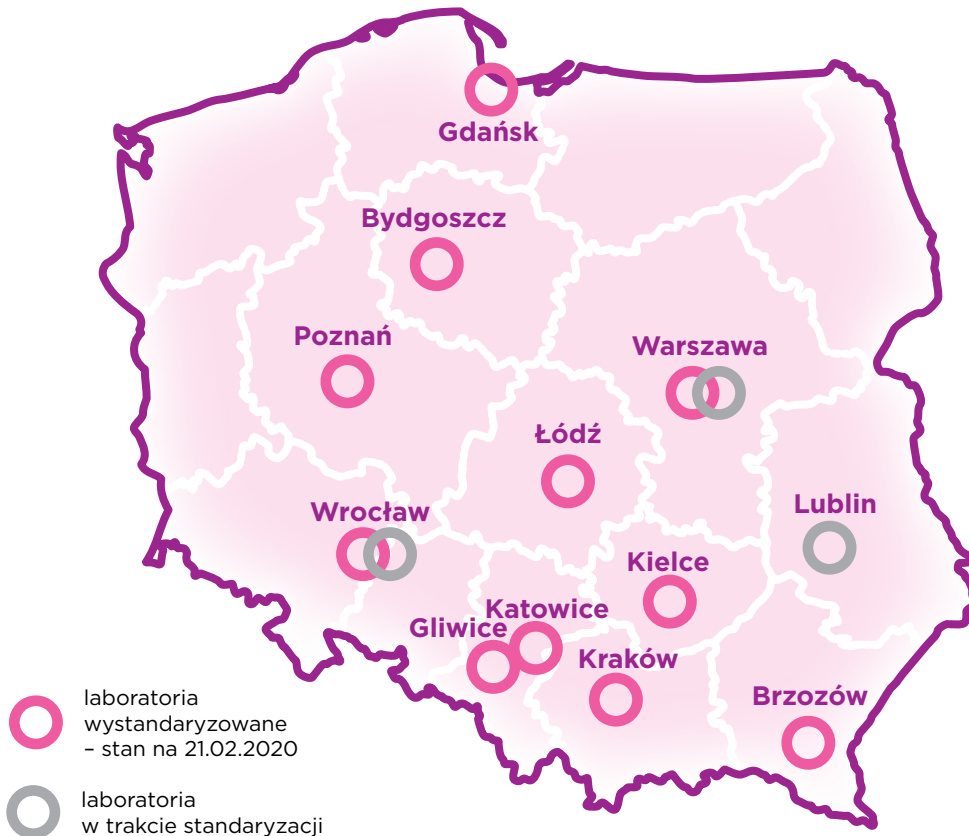
Przewodnik opracowany w ramach realizacji projektu:

„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



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

Miasto	Ośrodek	Kontakt
BRZOSZÓW	Laboratorium Diagnostyki Molekularnej Cytogenetyki i Cytometrii Szpital Specjalistyczny w Brzozowie Podkarpacki Ośrodek Onkologiczny ul. Ks. Bielawskiego 18 bud.K 36-200 Brzozów	Tel: 13 430 79 09
BYDGOSZCZ	Katedra i Zakład Genetyki Klinicznej CMUMK w Bydgoszczy ul. M. Skłodowskiej 9 85-094 Bydgoszcz	Tel: 52 585 36 71 Tel: 52 585 38 56
GDAŃSK	Laboratorium Hematologii Uniwersyteckie Centrum Kliniczne Pracownia Diagnostyki Molekularnej ul. Dębinki 7, 80-211 Gdańsk	Tel: 58 349 22 16
GLIWICE	Centrum Onkologii Instytut-Klinika Transplantacji Szpiku Onkohematologii ul. Wybrzeże Armii Krajowej 44-101 Gliwice	Tel: 32 278 98 93
KATOWICE	Pracownia Biologii Molekularnej Laboratorium Hematologiczne Klinika Hematologii i Transplantacji Szpiku w Katowicach, ul Dąbrowskiego 25, 40-027 Katowice	Tel: 32 25 91 323
KIELCE	Zakład Diagnostyki Molekularnej, Świętokrzyskie Centrum Onkologii ul. St. Artwińskiego 3, 25-734 Kielce	Tel: 41 367 42 59 Fax: 41 367 42 60
KRAKÓW	Zakład Diagnostyki Hematologicznej i Genetyki Szpital Uniwersytecki w Krakowie ul. Jakubowskiego 2 30-688 Kraków	Fax: 12 400 36 54

LISTA REFERENCYJNYCH PRACOWNI DLA DIAGNOSTYKI OBSZ W PL BIORĄCYCH UDZIAŁ W STANDARYZACJI BADAŃ MUTACJI *FLT3*

1

Miasto	Ośrodek	Kontakt
LUBLIN	Laboratorium Diagnostyki Molekularnej Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny nr 1 w Lublinie, ul. Staszica 11, 20-081 Lublin	Tel: 81 4486102
ŁÓDŹ	Pracownia Immunologii Klinicznej, Transplantacyjnej i Genetyki Wojewódzki Szpital Specjalistyczny im. Mikołaja Kopernika w Łodzi, ul. Pabianicka 62, 93-513 Łódź	Tel: 42 689 52 80
POZNAŃ	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	Tel: 61 854 95 97
WARSZAWA	Pracownia Biologii i Genetyki Molekularnej Uniwersyteckie Centrum Patomorfologii Uniwersyteckie Centrum Kliniczne Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego ul. Pawińskiego 7, 02-106 Warszawa	Tel: 22 599 17 92,
WARSZAWA	Pracownia Biologii Molekularnej, Zakład Diagnostyki Hematologicznej, Instytut Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie ul. Gandhi 14 02-776 Warszawa	Tel: 22 34 96 171/170
WROCLAW	Dolnośląskie Centrum Transplantacji Komórkowych z Krajowym Bankiem Dawców Szpiku, ul. Grabiszyńska 105 53-439 Wrocław,	Tel: 71 786 85 81
WROCLAW	Pracownia Biologii Molekularnej i Cytogenetyki, Przykliniczne Laboratorium Hematologiczne, Klinika Hematologii, Nowotworów Krwi i Transplantacji Szpiku, Uniwer- sytecki Szpital Kliniczny we Wrocławiu ul. Pasteura 4, 50-367 Wrocław	Tel: 71 784 26 07

SCHEMAT ASPIRACJI DIAGNOSTYCZNEJ SZPIKU

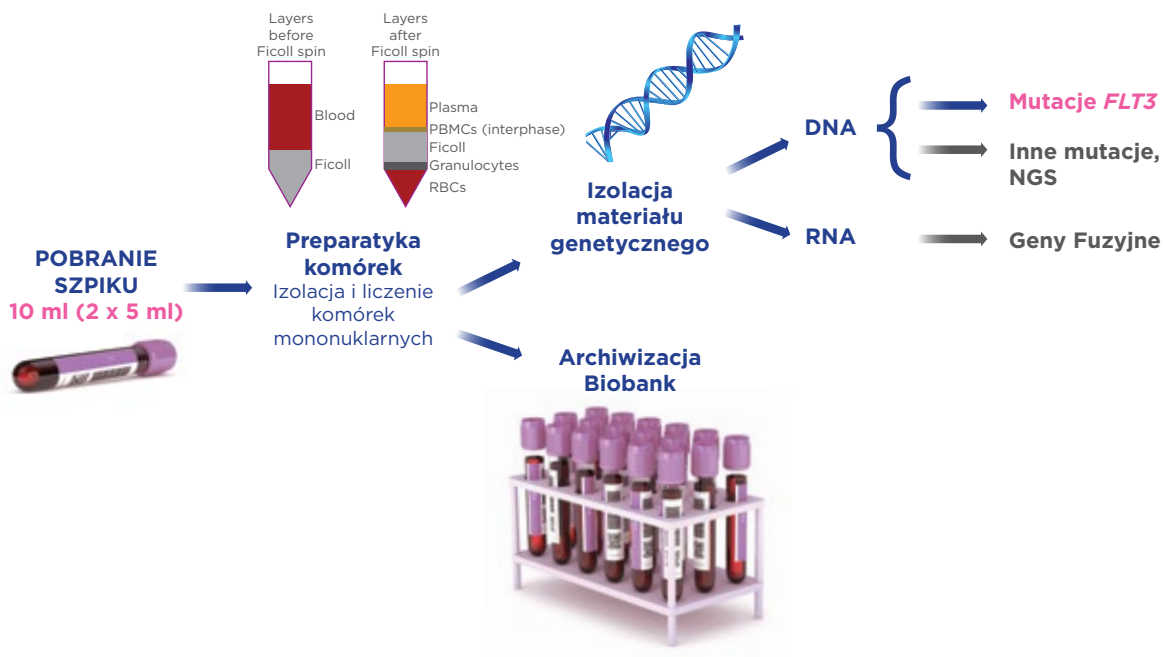
rekomendacje PALG

**SZPIK
1-sza
aspiracja****1 x strzykawka
0,5-1 ml****rozmaz****SZPIK
2-ga
aspiracja****1 x strzykawka
6 ml aspiratu****cytofluorymetria 1 ml (EDTA)
cytogenetyka 5 ml (heparyna)****SZPIK
3-cia
aspiracja****1 x strzykawka
5 ml aspiratu****DGN MOLEKULARNA EDTA
Badania MINI PANEL****SZPIK
4-ta
aspiracja****1 x strzykawka
5 ml aspiratu****DGN MOLEKULARNA EDTA
Archiwizacja met. gen.**

SCHEMAT PREPARATYKI MATERIAŁU DO BADANIA MUTACJI *FLT3*

WORK FLOW

3



4 SCHEMAT DIAGN. MOLEKULARNEJ W OBSZ wg rekomendacji ELN2017/RATIFY, NCCN oraz AMLSG/HOVON

1. Pakiet minimum¹ - wyniki do 48-72 godz².

Geny fuzyjne: *PML-RARA*, *RUNX1-RUNXT1*, *CBFb-MYH11*,
BCR-ABL1, *MLLT3-KMT2A*

Mutacje wewnątrzgenowe³: *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*³

Allelic ratio *FLT3-ITD:wt*⁴

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

Koncentrat do sporządzania roztworu do infuzji.

Przezroczysty do lekko opalizującego bezbarwny do bladożółtego płyn.

1. W porównaniu do „Pakietu Minimum” proponowanego w chwili rozpoczęcia badania PALG-AML1/2016 –włączono mutacje *IDH1/2*, gen fuzyjny *MLLT3-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 czasownik.

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:wt¹

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 jakościowe²

Primery:

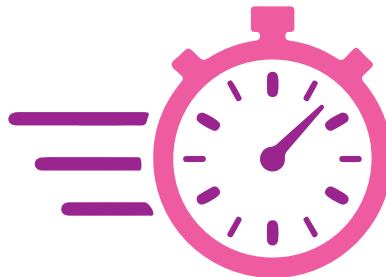
- dla ITD: wg e.g Thiede et al 2001, Huang et al, Nakao Met al 1996
- dla TKD: wg e.g. Murphy et al. 2003

ZALECENIA OBLIGATORYJNE

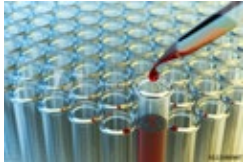
Czułość badania obu mutacji: = lub < 5% komórek *FLT3*(+)

Wizualizacja produktów PCR: elektroforeza kapilarna z analizą fragmentów

Wynik: w ciągu 48-72 godz



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
fluorochromem
w egzonie 14-15

Przykład:

A). Fragment bez duplikacji (dziki wt)



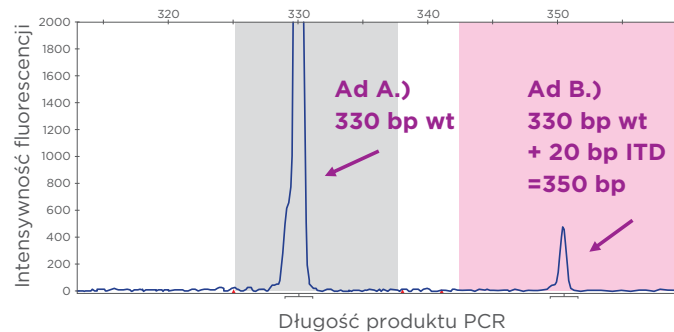
B). Fragment z duplikacją (ITD)

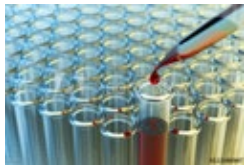


**Wizualizacja produktu
PCR**



Elektroforeza kapilarna – analiza fragmentów





PCR
Primery
znakowane
Fluo Egzon 20

Przykład:

A). Fragment bez mutacji (wt)



B). Fragment z mutacją TKD



EcoRV



A). 80 bp wt



B). 129 bp - mutacja TKD - brak trawienia



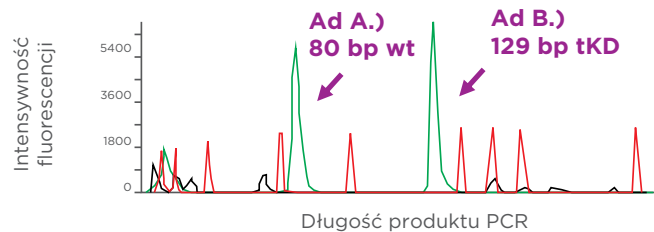
**Produkty
trawienia**

**Trawienie enzymami
restrykcyjnymi
produktu PCR**

**Wizualizacja produktu
PCR**



Elektroforeza kapilarna – analiza fragmentów



WYNIK *FLT3*-ITD:
POZYTYWNY

WYNIK *FLT3* TKD:
NEGATYWNY

INTERPRETACJA wg RATIFY

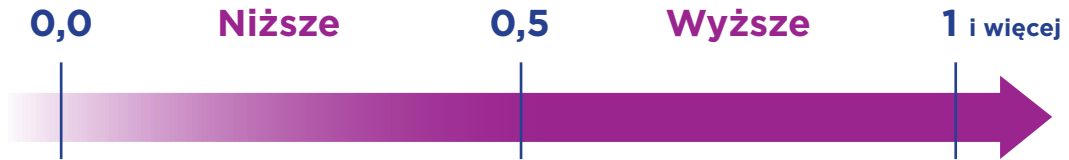
***Obecność *FLT3*-ITD w badanym materiale
jest wskazaniem do podania inhibitora *FLT3****

AR – aspekt biologiczny i kliniczny

WYSOKIE AR ↑

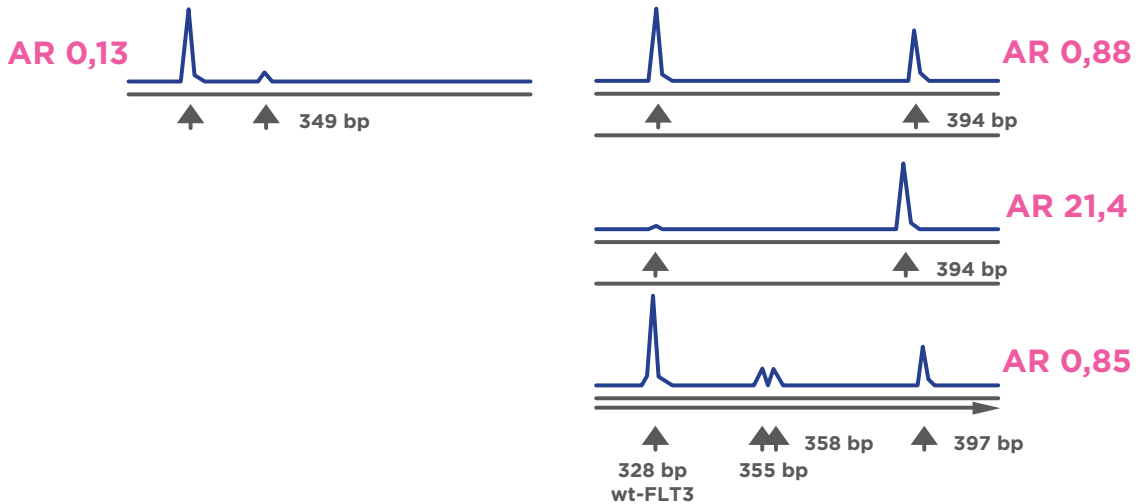
⇒ **WIĘKSZE RYZYKO CHOROBY BIALLELICZNEJ** ↑

⇒ **GORSZE ROKOWANIE** ↓

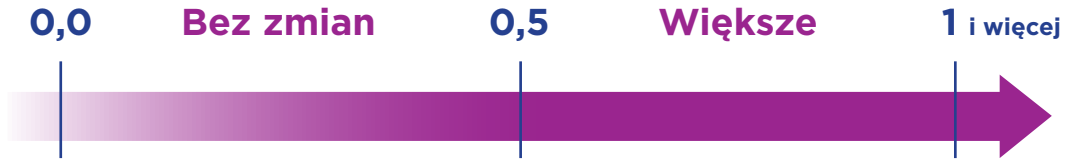


RYZIKO:

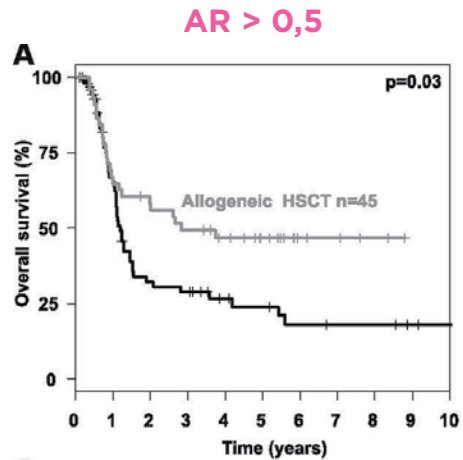
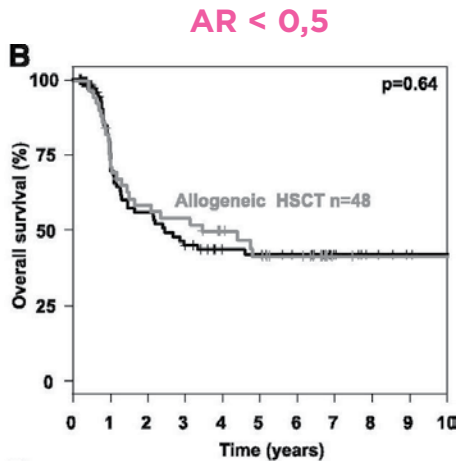
- Choroby białecicznej
- Nawrotu białaczki



BADANIE ALLELIC RATIO *FLT3*-ITD:WT WPŁYW ALLOHSCT NA PRZEŻYCIE W GRUPACH < I > AR 0.5



PRAWDOPODOBIEŃSTWO 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 PÓŁIŁOŚCIOWE

- ➔ **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)
-



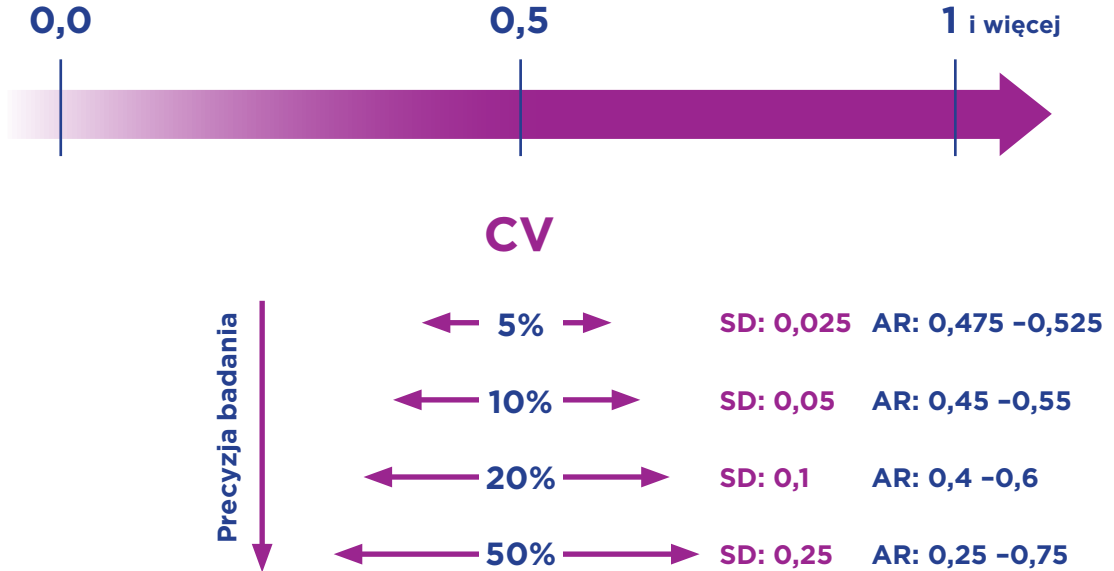
**STANDARYZACJA ALLELIC RATIO
FLT3-ITD:WT**

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

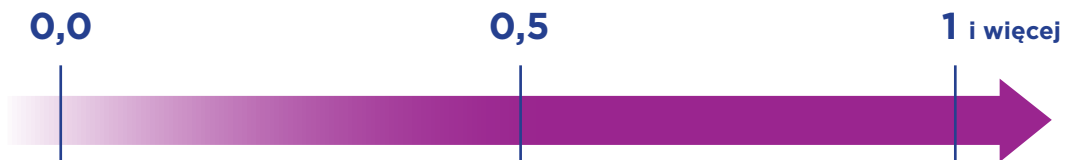


Im wyższy CV  tym mniejsza precyzja badania 

PORÓWNANIE WYNIKÓW AR W PRACOWNIACH REFERENCYJNYCH

KRYTERIA AKCEPTACJI BADANIA WG THIEDE

9

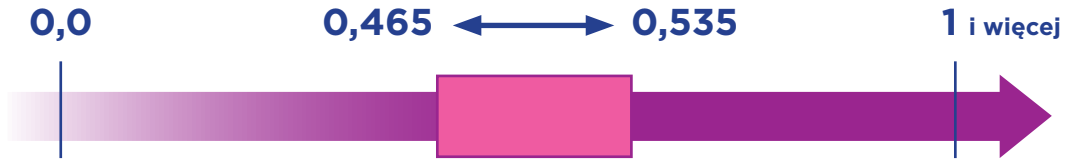


**Współczynnik zmienności
dla 12 pracowni**

$$CV = 6,55\%^{1,2}$$

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 WYNIKU BADANIA AR NA PODSTAWIE STANDARYZACJI PALG WG RATIFY



INTERPRETACJA wg ELN2017 -PALG:

AR > 0,532

Wskazanie do alloHSCT wg ELN2017

AR 0,465-0,535

*Przedział niepewności metody
dla Pracowni Referencyjnych PALG*

**Do indywidualnej decyzji
terapeutycznej lekarza**

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:

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 = 0,51

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

