

RAPPORT

2021

FORENKLET METODEVURDERING

Vurdering av tester for
FLT3 mutasjoner ved
akutt myelogen
leukemi (AML)

Utgitt av Folkehelseinstituttet
Område for helsetjenester

Tittel Vurdering av tester for FLT3 mutasjoner ved akutt myelogen leukemi (AML)

English title Evaluation of tests for FLT3 mutations in acute myeloid leukaemia (AML)

Ansvarlig Camilla Stoltenberg, direktør

Forfattere Tor Atle Rosness, seniorrådgiver, *Folkehelseinstituttet*
Kjetil G. Brurberg, avdelingsdirektør, *Folkehelseinstituttet*

ISBN 978-82-8406-154-2

Prosjektnummer ID2019_095

Publikasjonstype Forenklet metodevurdering

Antall sider 29 (inkludert vedlegg)

Oppdragsgiver Bestillerforum RHF/Nye metoder

Emneord(MeSH) FLT3 test assay acute myeloid leukemia

Sitering Rosness TA, Brurberg KG. Vurdering av tester for FLT3 mutasjoner ved akutt myelogen leukemi (AML). [Evaluation of tests for FLT3 mutations in acute myeloid leukaemia]. Oslo: Folkehelseinstituttet, 2021

Innhold

INNHold	3
HOVEDBUDSKAP	4
KEY MESSAGES	5
FORORD	6
INNLEDNING	7
Bakgrunn	7
Aktuelle mutasjoner og teststrategier	8
Oppsummert forskning om FLT3 mutasjoner og AML	9
METODE	10
Litteratursøk	10
Inklusjonskriterier	10
Artikkelutvelging og vurdering av risiko for skjevheter	11
Dataauthenting og sammenstilling	11
RESULTATER	12
Litteratursøk	12
Inkluderte studier	13
Analytisk validitet	13
Klinisk validitet	14
Klinisk anvendbarhet	15
Vurdering av tester for FLT3 mutasjoner	16
DISKUSJON	20
Hovedfunn	20
Overensstemmelse med andre oversikter	20
Behov for mer forskning	20
Implikasjoner for praksis	21
KONKLUSJON	22
REFERANSER	23
VEDLEGG 1 SØKESTRATEGI	25
VEDLEGG 2 KOSTNADER VED TESTING FOR FLT3 MUTASJONER	27
VEDLEGG 3 AKTIVITETSLOGG	29

Hovedbudskap

Akutt myelogen leukemi (AML) er en form for blodkreft hvor umodne blodceller (myeloblaster) i benmargen vokser og deler seg uhemmet. AML er en heterogen sykdom, og den karakteristiske overproduksjonen som skjer av umodne blodceller tilskrives ulike genetiske avvik. Disse mutasjonene endrer de normale mekanismene for cellevekst og celledeling.

Genetiske avvik som avdekkes ved ulike testmetoder kan være relevante for prognose og i valg av behandling ved diagnose-tidspunkt og ved residiv hos AML pasienter. Folkehelseinstituttet har fått i oppdrag fra Bestillerforum å metodevurdere tester som påviser FLT3-mutasjoner.

Kunnskapsgrunnlaget for vurdering av FLT3 mutasjonstester består av 17 vitenskapelige studier.

FLT3 tester:

- Testing for FLT3 mutasjoner gjøres rutinemessig for alle pasienter med AML
- Testing for FLT3 mutasjoner gjøres på ulike måter; PCR fragmentanalyse, Sanger-sekvensering og nestegenerasjonssekvensering (NGS)
- FLT3-ITD er den hyppigste mutasjonen (skjer hos ca. 30%), og er forbundet med andre genetiske avvik som samlet sett har foreløpig uklart betydning i valg av kreftbehandling
- FLT3-ITD mutasjon er forbundet med dårlig prognose hos AML pasienter både ved diagnosetidspunkt og ved residiv etter initiell behandling
- Det var ikke mulig å svare på om gilteritinib bør brukes kun hos pasienter med FLT3 mutasjon

Tittel:

Vurdering av tester for FLT3 mutasjoner ved akutt myelogen leukemi (AML)

Publikasjonstype:

Forenklet metodevurdering

Svarer ikke på alt:

Vi gir ingen anbefalinger

Hvem står bak denne publikasjonen?

Folkehelseinstituttet har gjennomført metodevurderingen på oppdrag fra Bestillerforum RHF (ID2019_095).

Når ble litteratursøket utført?

Oktober 2020

Fagekspert(er)

Randi Hovland, Kristin Dahl-Michelsen v/ Haukeland universitetssykehus og Yngvar Fløisand, Signe Spetalen v/ Oslo universitetssykehus, og Anne Pernille Dyrbekk v/ Sykehuset i Vestfold

Key messages

Acute myeloid leukemia (AML) is a form of blood cell cancer involving immature blood cells (myeloblasts) that grow and divide uncontrollably. AML is a heterogenous disease, where one of its main features is the characteristic overproduction of immature blood cells. This is caused by different genetic aberrations which alter the normal cell mechanisms for cell growth and division.

Genetic aberrations are unveiled through different test methods and can be of relevance in regard of prognosis and in choice of treatment after an established diagnosis or at the time of relapse. The Ordering Forum commissioned the Norwegian Institute of Public Health to evaluate tests that involve FLT3 mutations.

The knowledge base for this review evaluating FLT3 mutations consists of 17 scientific publications.

In relation to FLT3 tests:

- Testing for FLT3 is an established routine procedure for AML patients
- FLT3 mutations can be determined by different techniques; PCR fragment analysis, Sanger sequencing and next generation sequencing (NGS)
- FLT-ITD is the most common mutation to occur in AML patients (30 %), but when observed together with other genetic deviations the combined clinical relevance still remains aloof in cancer treatment
- FLT-ITD is associated with an unfavorable prognosis in AML patients at time of diagnosis and at relapse after initial therapy
- We were unable to determine if gilteritinib should only be used as treatment in patients with a FLT3 mutation

Title:

Evaluation of tests for FLT3 mutations in acute myeloid leukaemia (AML)

Type of publication:

Rapid HTA

Doesn't answer everything:

We do not give recommendations

Publisher:

Norwegian Institute of Public Health

Updated:

October 2020

Experts

Randi Hovland, Kristin Dahl-Michelsen at Haukeland University Hospital and Yngvar Fløisand, Signe Spetalen at Oslo University Hospital and Anne Pernille Dyrbekk at Vestfold Hospital

Forord

Folkehelseinstituttet har på oppdrag fra Bestillerforum RHF vurdert tester for FLT3 mutasjoner ved behandling av akutt myeloid leukemi (AML). Saksdokumenter og protokoll fra Bestillerforum RHF finnes som sak 157-19 (<https://nyemetoder.no/metoder/gilteritinib-xospata>).

Bakgrunnen for oppdraget er Bestillerforums forslag om vurdering av bruk av tyrosinkinasehemmer (gilteritinib) i behandling av akutt myelogen leukemi (AML) med mutert FLT3. Oppdraget gikk opprinnelig ut på å utarbeide en metodevurdering over hvilken betydning FLT3 mutasjoner har ved behandling av AML. Etter dialog mellom FHI og Sekretariatet i Nye metoder, Nasjonalt nettverk for persontilpasset medisin og fagekspertene ble en forenklet metodikk ansett som mest relevant. Det ble ikke blitt presisert i oppdraget fra Bestillerforum om det var aktuelt å inkludere en helseøkonomisk analyse og derfor er kun et overslag over kostnadsopplysninger for tester på norske sykehus tatt med som et vedlegg.

Alle forfattere av denne rapporten erklærer at de ikke har interessekonflikter.

Vi vil gjerne takke de eksterne fagekspertene Randi Hovland, Kristin Dahl-Michelsen, Haukeland universitetssykehus og Yngvar Fløisand, Signe Spetalen, Oslo universitetssykehus, Anne Pernille Dyrbekk v/ Sykehuset i Vestfold og forskningsbibliotekar Ingvild Kirkehei for hjelp med søkestrategi.

Folkehelseinstituttet tar det fulle ansvaret for synspunktene som er uttrykt i rapporten.

Kjetil G. Brurberg
avdelingsdirektør

Tor Atle Rosness
prosjektleder

Innledning

Bakgrunn

Akutt myelogen leukemi (AML) er en heterogen kreftsykdom, hvor den karakteristiske overproduksjonen av umodne blodceller som delvis skyldes forskjellige typer genetiske avvik ødelegger for normal cellevekst og celledeling. Ved AML gjennomgår pasientens umodne blodceller, såkalte myeloblaster, en ukontrollert celledeling som gjør at de mister sin funksjon og ødelegger for produksjonen av normale hvite og røde blodlegemer og blodplater. Når ødeleggelsen skjer i stor nok grad oppstår benmargssvikt hos pasienter og de blir utsatt for anemi, infeksjoner og blødninger (1,2). Om antallet kreftceller øker i stort nok omfang kan også organinfiltrasjon forekomme. Man vet ikke hvorfor noen personer rammes av AML men studier har vist at tilstanden kan være forbundet med eksponering for radioaktiv stråling, cellegift eller sigarettøyking (1,2).

Det diagnostiseres om lag 150 nye tilfeller av AML i Norge årlig og median alder ved diagnositidspunkt er i underkant av 70 år ¹. Pasienter med primær refraktær sykdom kan vurderes for allotransplantasjon uten å ha oppnådd komplett remisjon. Pasienter med residiv etter konsolideringsbehandling eller i løpet av et par måneder etter avsluttet behandling har svært dårlig prognose.

Færre enn en tredjedel av AML pasienter overlever etter fem år med sykdommen (1,2). Til tross for at det gjøres stadige fremskritt i behandling av sykdommen med bedre muligheter for kurasjon, trenges forskning og evidensbasert kunnskap for å forstå mer av sammenhengen mellom prognostiske biomarkører i form av mutasjoner og respons hos pasienter på tilpasset kreftbehandling.

Det finnes i hovedsak tre behandlingsprinsipper av AML i Norge:

- 1) Intensiv kjemoterapi med mål om å oppnå komplett remisjon uten påvisbar leukemi i blod eller benmarg
- 2) Konsolidering med kjemoterapi, autolog stamcelletransplantasjon eller allogen stamcelletransplantasjon med mål om å eliminere gjenværende sykdom og redusere antall kreftceller for at sykdomsfri overlevelse skal være mulig
- 3) Behandling ved residiv eller refraktær sykdom

Aktuelle mutasjoner og teststrategier

Det finnes to hovedformer for mutasjoner som oppstår ved akutt myelogen leukemi (AML). En er av diagnostisk verdi og en annen har prognostisk og/eller prediktiv nytte. Førstnevnte mutasjonsgruppe har en stabil og robust uttrykksform og er egnet for å gi dypere forståelse om patofysiologiske endringer som oppstår ved sykdommen og drive bak mutasjonene, og være til hjelp innen diagnostikken. Sistnevnte mutasjonsgruppe har prediktiv betydning ved å kunne fortelle om forventet respons av spesifikk og målrettet behandling, og gir også prognostisk informasjon ved å fortelle om hvor sannsynlig det er at responsen på gitt behandling har vært effektiv. En FLT3 (FMS-Like Tyrosine kinase 3) mutasjon tilfaller sistnevnte gruppe og er klassifisert som en prognostisk og/eller prediktiv biomarkør.

For å vite mer om hva som bestemmer alvorlighetsgrad og forverring i et sykdomsforløp testes alle pasienter med AML i Norge rutinemessig for FLT3 mutasjoner før behandling. Muterte former av FLT3 genet er assosiert med overproduksjon av FLT3 proteinet som fører til ukontrollert celledeling av umodne blodceller. FLT3 proteinet finnes på overflaten av kreftceller og ved å hemme dens virksomhet dør kreftceller og dermed forsinkes sykdomsprogresjon, men slik hemning er ikke kurativ.

Vurdering av tester for FLT3 mutasjoner ved AML dreier seg om to typer: internal tandem duplikasjoner (ITD) og tyrosine kinase domener (TKD). FLT3-ITD er den vanligste formen for mutasjon (ca. 30 % forekomst hos AML pasienter) og det utføres omtrent 200 FLT3 tester totalt i året i Norge fordelt på to sykehus, Haukeland universitetssykehus og Oslo universitetssykehus, Radiumhospitalet.

Begge sykehus bruker in-house testing av typen polymerasekjedereaksjon (PCR) etterfulgt av deteksjon av PCR produktets lengdestørrelse, og hvor det er rutine å gjøre to tester for å være sikker på prøvesvaret. Måten PCR fungerer på er ved å først kopiere og så amplifisere pasientens DNA i tilstrekkelig mengde for å identifisere mutasjoner i arvestoffet. Nestegenerasjonssekvensering (NGS) er en mer avansert testmetode og den har muliggjort sekvensering av alle genene til en pasient, men brukes ikke for å vurdere FLT3-ITD mutasjoner fordi de er vanskelige å påvise gjennom denne teknikken. NGS er ikke egnet innen differensialdiagnostikk, men gir noen diagnostiske fordeler når den brukes for et utvalg av gener. NGS innebærer derimot mer arbeid, lengre behandlingstid av prøvesvar og større kostnader enn ved PCR.

Når det testes for den mindre hyppige FLT3 mutasjon - FLT3-TKD (tyrosine kinase domener) som for eksempel variantene D835 eller I836, er det mest vanlig å bruke in-house PCR men NGS anvendes også. Et korrekt og nøyaktig prøvesvar er viktig, og bruk av DNA er mer optimalt enn RNA ved PCR for å unngå variasjon i prøvesvar og høy rate av falske positive svar. I motsetning til testing for FLT3-ITD mutasjoner brukes altså både in-house PCR og NGS for å bekrefte FLT3-TKD mutasjoner.

European Leukemia Nets (ELN) retningslinjer stipulerer at prøvesvar for mutasjoner bør helst være tilgjengelige innen 48-72 timer, men frister for prøvesvar kan variere siden tidsintervallet regnes fra når prøven tas og ikke når den mottas. Det ideelle er om prøvesvar foreligger innen åtte dager etter at diagnosen AML er stilt siden behandlingen bør starte i løpet av dag 8 av forbehandling (induksjonsbehandling) (3). Selv om AML pasienter med positiv FLT3-ITD mutasjonstatus har økt sannsynlighet for raskt tilbakefall og behandlingsresistens kan status på FLT3 mutasjoner endre seg i løpet av et sykdomsforløp og statusen betinges ofte av tidligere gjennomgått behandlingsforløp. AML pasienter med residiv vil som oftest bli testet på nytt for FLT3 for å få en oppdatert status, men unntaket er hos eldre personer hvor ytterligere behandling ikke er indisert. Refraktære AML pasienter testes vanligvis ikke på nytt i Norge grunnet dårlig prognose.

Oppsummert forskning om FLT3 mutasjoner og AML

Genmutasjoner forekommer regelmessig hos AML pasienter. FLT3-ITD er den hyppigste muterte ved AML og oppstår spontant. Det finnes kjent genetisk predisponering for sykdommen, men det er sjeldent og AML regnes i hovedsak ikke som en markant arvelig kreftsykdom. En FLT3-ITD mutasjon er viktig å få bekreftet fordi den er forbundet med dårlig prognose hos AML pasienter, selv etter gjennomgått behandlingsregime med intensiv kjemoterapi og allogene stamcelletransplantasjon. Den prognostiske betydningen av FLT3-TKD er ikke kartlagt like godt og det er usikkert hvordan mutasjonen påvirker pasientens sykdomsforløp. Til tross for større prognostisk usikkerhet rundt FLT3-TKD anbefaler forskere å teste rutinemessig for mutasjonen etter at AML diagnosen er stilt (4).

Behandling med FLT3 hemmere motvirker de kreftmekanismer som oppstår i AML og responsraten er antatt til å være omtrent 50 % hos pasienter etter gjennomgått behandling. Responsrater ved bruk av FLT3 hemmere måles med ulike kriterier og det trenges mer kunnskap for å kunne bedømme effekten av tyrosinkinasehemmer. Tilpasset behandling av AML involverer flere typer av behandling og det kan være vanskelig å skille effekten av FLT3 hemmere fra konvensjonell kjemoterapi i induksjonsfasen og måle effekten av FLT3 hemmere etter konsoliderende behandling med kjemoterapi eller stamcelletransplantasjon. Forskning som har undersøkt hvordan FLT3 mutasjonstatus endres ved diagnosetidspunktet, ved residiv og ved allogene stamcelletransplantasjon kan trolig si noe om effekten av konsoliderende behandling i løpet av behandlingsregimet. Konsoliderende behandling gis etter innledende kreftbehandling (induksjonsbehandling) og skal bidra til å befeste oppnådd virkning og ytterligere redusere antall kreftceller. Konsoliderende behandling øker sannsynligheten for varig tilbakegang av sykdom (varig komplett remisjon) og forskere tror at ved å teste for FLT3 mutasjoner under ulike stadier av behandling kan være av klinisk nytte.

Metode

Litteratursøk

Kilder det ble søkt i:

MEDLINE (Ovid)

Embase (Ovid)

PubMed

Scopus

Cochrane CENTRAL

Epistemonikos

ClinicalTRials.gov

International Clinical Trials Registry (ICTRP).

Kort beskrivelse av søkestrategi:

Søket er sammensatt av emneord og tekstord for *acute myeloid leukemia* og *FLT3* (for hele søkestrategi se vedlegg, s. 21). Søketreffene må i tillegg inneholde ordene *test*, *tests*, *testing* og *assay/assays* (med unntak av søketreff fra CENTRAL, studieregistre og Epistemonikos, hvor søket kun er avgrenset med *assay*).

Søket er avgrenset til publikasjonsår f.o.m. 2015.

Søketreff totalt: 458

Søketreff totalt etter fjerning av dubletter og konferanse sammendrag: 248

Inklusjonskriterier

Vi inkluderte kliniske studier, oversiktsartikler og systematiske kunnskapssoppsummeringer på engelsk. Kun publikasjoner fra de siste fem årene ble vurdert.

Populasjon:	AML pasienter
Tiltak:	Test for FLT3 mutasjoner
Sammenlikning:	Ingen begrensninger
Utfall:	Ingen begrensninger

Eksklusjonskriterier

Abstrakter sendt inn til konferanser, kronikker, meningsytringer, debattinnlegg og ledere («perspectives» og «opinions») og forskningsstudier som ikke inkluderte FLT3 mutasjoner hos AML pasienter ble ekskludert, prekliniske studier med dyremodeller ble også ekskludert.

Artikkelutvelgning og vurdering av risiko for skjevheter

Én person vurderte identifiserte studier opp mot inklusjonskriteriene. Det ble ikke vurdert risiko for systematiske skjevheter.

Dataauthenting og sammenstilling

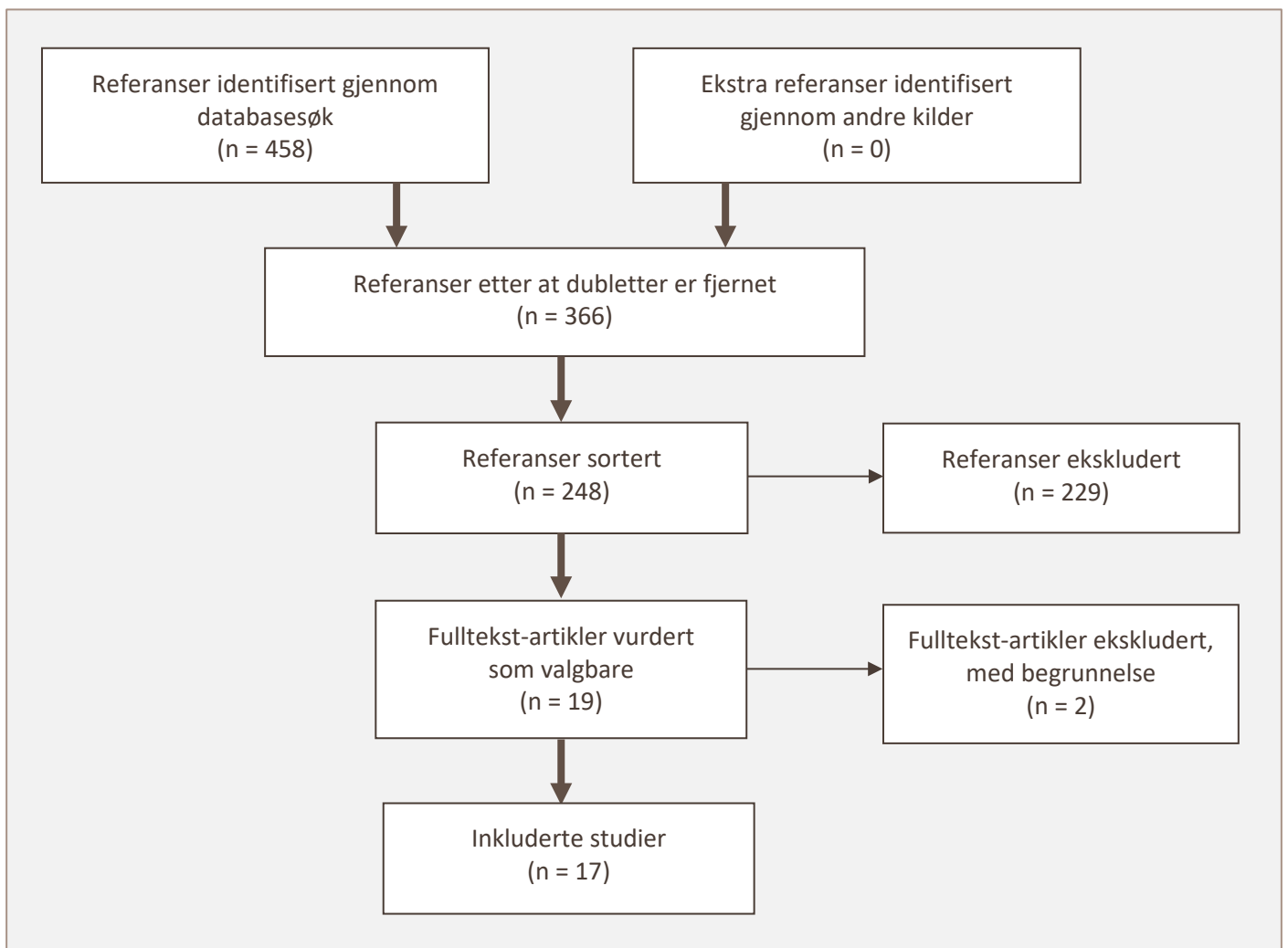
Vi har beskrevet utvalg, behandlingsdetaljer og utfall i tekst og oppgitt referanser i tabell for hver av de inkluderte studiene. Vi utførte et enkelt systematisk litteratursøk i flere relevante kilder. Et slikt søk har som oftest hensikt å fange opp all relevant litteratur på et tema. Søket skal i tillegg være dokumentert og etterprøvbart. I søket vårt har vi, på grunn av delvis brede inklusjonskriterier og et komplekst tema, hatt som formål å finne all potensielt relevant litteratur.

For å forenkle gjennomgang og utvelgelse av relevante studier, har vi gjort et smalt søk avgrenset til studier hvor forfatteren bruker begreper som *test* og *assay* i tittel eller sammendrag. Denne avgrensningen kan ha ført til at søket ikke har fanget opp alle relevante studier, enten fordi de ikke har vært tydelige på bruk av denne testmetoden, eller fordi de har brukt andre ord for å beskrive den. Søket er imidlertid grundig dokumentert, slik at det skal være mulig å etterprøve og justere. Søkeord og søkestrategi er utviklet i samråd med prosjektleder. Det ble ikke foretatt noen sammenstilling av inkluderte studier.

Resultater

Litteratursøk

Søkene i de medisinske databasene ga opprinnelig til sammen 458 treff, hvorav 92 viste seg å være dubletter. Ytterligere 349 referanser ble ekskludert fordi de ikke tilfredstilte inklusjonskriteriene. Vi endte opp med å inkludere 17 studier.



Figur 1. Flytskjema over identifisert litteratur

Inkluderte studier

Vi inkluderte 17 studier som belyser nytteverdien av å benytte FLT3-tester gjennom vurdering av 1) analytisk validitet (evne til å påvise en bestemt genforandring), 2) klinisk validitet (evne til å prediktere et bestemt klinisk utfall) og 3) klinisk anvendbarhet (evne til å forbedre kliniske utfall) i iht Pitini et al (5). Noen studier er relatert til flere tematiske plattformer innen analytisk og klinisk validitet.

Analytisk validitet

For å klassifisere en studie som betydningsfull innen analytisk validitet, var det aktuelt å vektlegge følgende spørsmål ved gjennomgang av studien: Hvor ofte er testen positiv når en mutasjon er til stede (sensitivitet)? Hvor ofte er testen negativ når en mutasjon ikke er til stede (spesifisitet)? Har det blitt utført gjentatte målinger på samme prøve (standardisering)? Hvordan håndteres falske positive svar og hvor like er resultater fra laboratorier med det samme utstyret (harmonisering)?

Følgende studier ble vurdert å være knyttet til analytisk validitet:

1. Schumacher JA, Holgard VD, Sial F, Pearson LN, Patel JL, Karner KH. Detection and Quantification of FLT3 Internal Tandem Duplication Mutations Do Not Vary Significantly Between Whole Blood and Blast-Enriched Samples. *Am J Clin Pathol*, 2020;153(2), 251-257.
2. Park J, Kim HS, Lee JM, Jung J, Kang D, Choi T, et al. Analytical and Potential Clinical formance of Oncomine Myeloid Research Assay for Myeloid Neoplasms. *Mol Diagn Ther*, 2020; 24(5), 579-592.
3. Perez M, Blankenhorn J, Murray KJ, Parker LL. High-throughput Identification of FLT3 Wild-type and Mutant Kinase Substrate Preferences and Application to Design of Sensitive In Vitro Kinase Assay Substrates. *Mol Cell Proteomics*, 2019; 18(3), 477-489.
4. Mezei ZA, Tornai D, Földesi R, Madar L, Sümegi A, Papp M et al. A DNA pool of FLT3-ITD positive DNA samples can be used efficiently for analytical evaluation of NGS-based FLT3-ITD quantitation - Testing several different ITD sequences and rates, simultaneously. *J Biotechnol*, 2019; 303, 25-29.
5. Mezei ZA, Tornai D, Földesi R, Madar L, Sümegi A, Papp M et al. A DNA pool of FLT3-ITD positive DNA samples can be used efficiently for analytical evaluation of NGS-based FLT3-ITD quantitation - Testing several different ITD sequences and rates, simultaneously. *J Biotechnol*, 2019; 303, 25-29.
6. Cumbo C, Minervini CF, Orsini P, Anelli L, Zagaria A, Minervini A et al. Nanopore Targeted Sequencing for Rapid Gene Mutations Detection in Acute Myeloid Leukemia. *Genes* 2019; 10(12)

7. Patkar N, Kakirde C, Bhanshe P, Joshi S, Chaudhary S, Badrinath Y et al. Utility of Immunophenotypic Measurable Residual Disease in Adult Acute Myeloid Leukemia-Real-World Context. 2019; *Front Oncol*, 9, 450.
8. Quek L, Ferguson P, Metzner M, Ahmed I, Kennedy A, Garnett C et al. Mutational analysis of disease relapse in patients allografted for acute myeloid leukemia. *Blood Adv*, 2016; 1(3), 193-204
9. Bibault JE, Figeac M, Hélevaut N, Rodriguez C, Quief S, Sebda S et al. Next-generation sequencing of FLT3 internal tandem duplications for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukemia. *Oncotarget*, 2015; 6(26), 22812-22821.
10. Mizuta S, Yamane N, Komai T, Koba Y, Kawata T, Ukyo N et al. Investigation of screening method for DNMT3A mutations by high-resolution melting analysis in acute myeloid leukemia. *Int J Lab Hematol*, 2019; 41(5), 593-600.

Klinisk validitet

For å klassifisere en studie som betydningsfull innen klinisk validitet, var det aktuelt å vektlegge følgende spørsmål ved gjennomgang av studien: Hva er tilstandens forekomst målt gjennom testen? Har testen blitt validert i alle aktuelle pasientpopulasjoner? Hva er testens positive og negative predikative verdier og hva er forholdet mellom genotype og fenotype?

Følgende studier ble vurdert å være knyttet til klinisk validitet:

1. Schwartz, GW, Manning, B, Zhou, Y, Velu, P, Bigdeli, A, Astles, R. et al. Classes of ITD Predict Outcomes in AML Patients Treated with FLT3 Inhibitors. *Clin Cancer Res*, 2019; 25(2), 573-583.
2. Milne P, Wilhelm-Benartzi C, Grunwald MR, Bigley V, Dillon R, Freeman SD et al. Serum Flt3 ligand is a biomarker of progenitor cell mass and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood Adv*, 2019; 3(20), 3052-3061.
3. Liu SB, Qiu QC, Bao XB, Ma X, Li HZ, Liu YJ et al. Pattern and prognostic value of FLT3-ITD mutations in Chinese de novo adult acute myeloid leukemia. *Cancer Sci*, 2018; 109(12), 3981-3992
4. Ardestani MT, Kazemi A, Chahardouli B, Mohammadi S, Nikbakht M, Rostami S, et al. FLT3-ITD Compared with DNMT3A R882 Mutation Is a More Powerful Independent Inferior Prognostic Factor in Adult Acute Myeloid Leukemia Patients After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Retrospective Cohort Study. *Turk J Haematol*, 2018; 35(3), 158-167.

5. Li C, Zhu B, Chen J, Huang X. Feature genes predicting the FLT3/ITD mutation in acute myeloid leukemia. *Mol Med Rep*, 2016; 14(1)
6. Brodská B, Otevřelová P, Šálek C, Fuchs O, Gašová Z, Kuželová K. High PD-L1 Expression Predicts for Worse Outcome of Leukemia Patients with Concomitant NPM1 and FLT3 Mutations. *Int J Mol Sci*, 2019; 20(11)
7. Zhu GZ, Yang YL, Zhang YJ, Liu W, Li MP, Zeng WJ et al. High Expression of AHSP, EPB42, GYPC and HEMGN Predicts Favorable Prognosis in FLT3-ITD-Negative Acute Myeloid Leukemia. *Cell Physiol Biochem*, 2017; 42(5), 1973-1984.

Klinisk anvendbarhet

For å klassifisere en studie som betydningsfull innen klinisk anvendbarhet, er det iht Pitini et al, aktuelt å vektlegge følgende spørsmål ved gjennomgang av studien: Hva er belastningen for pasienten ved et positivt eller negativt testsvar? Hva indikerer forskningen fra tidligere studier utført med den diagnostiske testen? Hva er kostnytte effekt ved bruk av den diagnostiske testen? Hva er den totale kostnaden per utført test? Krever testen samtykke av deltager og hvem eier rettighetene til innsamlede data fra den diagnostiske testen?

Vi identifiserte ingen studier som omhandlet klinisk anvendbarhet av å benytte FLT-3 tester i behandling med tyrosinkinasehemmer av AML.

Tabell 1. Oversikt over alle inkluderte enkeltstudie (sortert etter årstall)

Studie-ID (referanser)
1. Schumacher JA, Holgard VD, Sial F, Pearson LN, Patel JL, Karner KH. Detection and Quantification of FLT3 Internal Tandem Duplication Mutations Do Not Vary Significantly Between Whole Blood and Blast-Enriched Samples. <i>Am J Clin Pathol</i> , 2020;153(2), 251-257.
2. Park J, Kim HS, Lee JM, Jung J, Kang D, Choi T, et al. Analytical and Potential Clinical Performance of Oncomine Myeloid Research Assay for Myeloid Neoplasms. <i>Mol Diagn Ther</i> , 2020; 24(5), 579-592.
3. Megías-Vericat, JE, Martínez-Cuadrón, D, Solana-Altabella, A, Montesinos, P. Precision medicine in acute myeloid leukemia: where are we now and what does the future hold? <i>Expert review of hematology</i> , 2020; 1-9
4. Schwartz, GW, Manning, B, Zhou, Y, Velu, P, Bigdeli, A, Astles, R. et al. Classes of ITD Predict Outcomes in AML Patients Treated with FLT3 Inhibitors. <i>Clin Cancer Res</i> , 2019; 25(2), 573-583.
5. Perez M, Blankenhorn J, Murray KJ, Parker LL. High-throughput Identification of FLT3 Wild-type and Mutant Kinase Substrate Preferences and Application to Design of Sensitive In Vitro Kinase Assay Substrates. <i>Mol Cell Proteomics</i> , 2019; 18(3), 477-489.
6. Patkar N, Kakirde C, Bhanshe P, Joshi S, Chaudhary S, Badrinath Y et al. Utility of Immunophenotypic Measurable Residual Disease in Adult Acute Myeloid Leukemia-Real-World Context. 2019; <i>Front Oncol</i> , 9, 450.

7. Mizuta S, Yamane N, Komai T, Koba Y, Kawata T, Ukyo N et al. Investigation of screening method for DNMT3A mutations by high-resolution melting analysis in acute myeloid leukemia. <i>Int J Lab Hematol</i> , 2019; 41(5), 593-600.
8. Milne P, Wilhelm-Benartzi C, Grunwald MR, Bigley V, Dillon R, Freeman SD et al. Serum Flt3 ligand is a biomarker of progenitor cell mass and prognosis in acute myeloid leukemia. <i>Blood Adv</i> , 2019; 3(20), 3052-3061.
9. Mezei ZA, Tornai D, Földesi R, Madar L, Sümegi A, Papp M et al. A DNA pool of FLT3-ITD positive DNA samples can be used efficiently for analytical evaluation of NGS-based FLT3-ITD quantitation - Testing several different ITD sequences and rates, simultaneously. <i>J Biotechnol</i> , 2019; 303, 25-29.
10. Cumbo C, Minervini CF, Orsini P, Anelli L, Zagaria A, Minervini A et al. Nanopore Targeted Sequencing for Rapid Gene Mutations Detection in Acute Myeloid Leukemia. <i>Genes</i> 2019; 10(12)
11. Brodská B, Otevřelová P, Šálek C, Fuchs O, Gašová Z, Kuželová K. High PD-L1 Expression Predicts for Worse Outcome of Leukemia Patients with Concomitant NPM1 and FLT3 Mutations. <i>Int J Mol Sci</i> , 2019; 20(11)
12. Liu SB, Qiu QC, Bao XB, Ma X, Li HZ, Liu YJ et al. Pattern and prognostic value of FLT3-ITD mutations in Chinese de novo adult acute myeloid leukemia. <i>Cancer Sci</i> , 2018; 109(12), 3981-3992.
13. Ardestani MT, Kazemi A, Chahardouli B, Mohammadi S, Nikbakht M, Rostami S, et al. FLT3-ITD Compared with DNMT3A R882 Mutation Is a More Powerful Independent Inferior Prognostic Factor in Adult Acute Myeloid Leukemia Patients After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Retrospective Cohort Study. <i>Turk J Haematol</i> , 2018; 35(3), 158-167.
14. Zhu GZ, Yang YL, Zhang YJ, Liu W, Li MP, Zeng WJ et al. High Expression of AHSP, EPB42, GYPC and HEMGN Predicts Favorable Prognosis in FLT3-ITD-Negative Acute Myeloid Leukemia. <i>Cell Physiol Biochem</i> , 2017; 42(5), 1973-1984.
15. Quek L, Ferguson P, Metzner M, Ahmed I, Kennedy A, Garnett C et al. Mutational analysis of disease relapse in patients allografted for acute myeloid leukemia. <i>Blood Adv</i> , 2016; 1(3), 193-204
16. Li C, Zhu B, Chen J, Huang X. Feature genes predicting the FLT3/ITD mutation in acute myeloid leukemia. <i>Mol Med Rep</i> , 2016; 14(1)
17. Bibault JE, Figeac M, Hélevaut N, Rodriguez C, Quief S, Sebda S et al. Next-generation sequencing of FLT3 internal tandem duplications for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukemia. <i>Oncotarget</i> , 2015; 6(26), 22812-22821.

Vurdering av tester for FLT3 mutasjoner

Testmetoder

Det er godt dokumentert i forskningslitteraturen som ble inkludert at AML pasienter generelt sett har dårlig prognose når diagnosen stilles og hvis en FLT3-ITD mutasjon blir bekreftet forverres prognosen ytterligere. Tester som brukes for å vurdere FLT3 mutasjoner identifiserer i hovedsak de to mest kjente typene: internal tandem duplikasjoner (ITD) eller tyrosine kinase domener (TKD). Det finnes andre mutasjoner som det testes samtidig for i et genpanel sammen med FLT3 mutasjoner men litteraturen konkluderer ikke med hva flere positive mutasjonsfunn har av betydning. Det blir for tidlig å si noe om den samlede kliniske anvendbarheten når andre genetiske avvik forekommer utover FLT3 mutasjoner som for eksempel DNMT3A (6).

En FLT3 mutasjon slår ut positivt om mutant-villtype forholdet er lik eller overstiger en grense på 0,05 og tilsvarende om det samme forholdet er under 0,05 tolkes svaret som negativ (7). Funn av svakt positive prøver er vanskelige å bestemme betydningen av og prøveresultater med et lavt forholdstall (under 0,05) blir dobbeltsjekket før igangsettelse av videre behandlingsstrategier som medfører transplantasjon (7). Ved PCR undersøkelser foretas opp til fire retester om det er indisert eller ved ugyldig prøvetagning. Det er usikkert om FLT3-ITD mutasjoner oppdages i større grad i et beriket testmiljø sammenlignet med analyser av totalantallet av hvite blodceller (7).

Nanopore-sekvensering er en testmetode som benytter polynukleotider i form av DNA eller RNA ved testing for mutasjoner. Ved bruk av nanopore-sekvensering kan et enkelt molekyl DNA eller RNA sekvenseres uten behov for PCR-amplifisering og svar fra undersøkelsen kan foreligge innen 24 timer. I studien til Cumbo et al. med 22 AML pasienter ble metoden utført på seks kjente mutasjoner som forekommer ved sykdommen (NPM1, FLT3, CEBPA, TP53, IDH1 og IDH2) og nanopore-sekvensering ble vurdert som en rask og billig testmetode (8).

Andre mutasjoner

Flere former for genetiske avvik har blitt kartlagt for å utforske den prognostiske verdien ved kreftsykdommer inkludert FLT3 hos AML pasienter. Inntil nylig har kromosomavvik vært de viktigste. Zhu et al. avdekket flere genetiske mønstre som ble uttrykt ved FLT3 testing og at de fungerte som biomarkører med diagnostisk og prognostisk nytteverdi som for eksempel AHSP, EB42, GYPC, HEMGN, men hva de har å si for FLT3 mutasjoner og AML pasienter gjenstår å se (9). Quek et al. identifiserte gjennom NGS mutasjonene KIT, TET2, RUNX1 og SRSF2 som trolig gir prognostisk informasjon om AML pasienter som har gjennomgått kjemoterapi men det vites ikke i hvor stor grad (10). Det samme forskerteamet fant ut at når AML diagnosen stilles er følgende mutasjoner: WT1, DNMT3A og TP53, assosiert med økt risiko for residiv etter transplantasjonsbehandling (10). Tidspunktet for prøvetakning og når andre mutasjoner enn FLT3 oppdages er viktig for å vurdere hvordan de totalt sett påvirker pasientens sykdomsforløp. Noen mutasjoner er mulige å oppdage ved diagnosetidspunktet og andre etter gjennomgått behandling, og dette bør gjenspeiles i retningslinjer for genetiske tester ved kreftbehandling (10). PD-L1 er et genuttrykk som sett i sammenheng hos AML pasienter kan påvirke behandlingsrespons selv om den oftest forekommer i solide tumorer. Brodska et al. fant at PD-L1 var assosiert med dårlig prognose hos AML pasienter som samtidig var bærere av FLT3-ITD og NPM1 mutasjonene men det er for tidlig å konkludere rundt klinisk relevans siden studien inkluderte få deltagere (11).

Prognose

Det er ikke forekomst av FLT3-ITD alene som røper viktig informasjon om prognose men også andelen celler som bærer mutasjonen, lengden av duplikasjon, lokalisering og antallet mutasjoner har alt sammen prognostisk informasjon (12). Lui et al. testet 1101 AML pasienter og FLT3-ITD mutasjonen ble funnet hos 227 (20.6%) av dem. FLT3-ITD mutasjonene ble kvantifisert ved enten «Genescan» analyse eller PCR (13). Lui et al. så at FLT-ITD mutasjonssekvensene deltes opp i tre typer: DNA komplett duplikasjon, DNA partiell duplikasjon eller komplett randomisert sekvens. Når en FLT3-ITD mutasjonen inneholder hele DNA intronet og blir fjernet etter transkripsjon kan

det oppdages ved bruk av PCR. Når FLT3-ITD inneholder deler av intronet forsvinner ikke det partielle intronet ved DNA transkripsjon (13). Det er usikkert hvordan mekanismen påvirker pasientens prognose men FLT3 ITD mutasjonen forårsakes av duplikasjoner eller innsettinger i det området av FLT3 genot som koder proteinområdet nær membranen. FLT3 TKD mutasjoner forårsakes derimot av bytte eller sletting av nukleinsyre som medfører bytting eller sletting av aminosyrer i den delen av proteinet som katalyserer tyrosin fosforylering (2). Pasienter med en FLT3-ITD mutant/villtype ratio høyere enn 0,5 har signifikant verre overlevelsesrater og prognose enn de med lavere ratio og derfor har enkelte forskere foreslått at forholdet blir vurdert hos AML pasienter mens andre forskere har forfektet at forholdet mutant/(mutant+villtype) er mest aktuelt for å vurdere overlevelsesrater og som mål for prognose (13).

Patkar et al. viste i en studie som inkluderte 451 pasienter med en median alder på 35 år at FLT3-ITD var forbundet med verre kliniske utfall sammenlignet med pasienter uten mutasjonen og FLT3-ITD var også med på å forverre prognosen hos pasienter med funn av «minimal residual disease» (MRD) (14). MRD er definert som restsykdom ved kreft og oppdages med hjelp av sensitive metoder, som har ført til at i de senere år har skjedd en utvikling og produksjon av mer avanserte undersøkelser av benmarg for å fange opp MRD. Pasienter som er kategorisert som MRD negative har i likhet med pasienter uten FLT3-ITD mutasjon bedre prognose (14). Evaluering av MRD status brukes i en tidlig fase av kreftsykdommen til å tolke risiko og vurdere behandlingsalternativer hos pasienter som er bærere av FLT3-ITD mutasjonen. Bibault et al. har vurdert NGS til å være den mest sensitive testmetoden for å måle MRD (15).

En DNMT3A mutasjon er sett på som en mulig driver av andre mutasjoner som finnes i AML pasienter men rollen av DNMT3A iht prognose er uklar. DNMT3A forekom i 15,6 % i en gruppe av 128 AML pasienter som også hadde en NPM1 mutasjonsendring men den kombinerte effekten av de to genetiske avvikene har trolig liten betydning for pasienters kliniske utfall (6). Når DNMT3A mutasjoner ble funnet sammen med FLT3-ITD reduseres overlevelsesrater og prognosen forverres til tross for gjennomført allogent stamcelletransplantasjon (6). Etter utført transplantasjonsbehandling har funn av FLT3-ITD sammen med NPM1 begrenset prognostisk verdi, som gjør det vanskelig å anvende tilgjengelig genetisk informasjon til å utvikle tilpassede former for behandling ved tilbakefall etter allogent stamcelletransplantasjon (10). DNMT3A er bredere distribuert i celler enn FLT3-ITD men vanskeligere å oppdage i rutinemessige laboratorieundersøkelser. Mizuta et al fant at DNMT3A var til stede hos 17 % av pasientene i en liten studie med 69 pasienter og at det mest vanlige genetiske mønsteret som forekom var funn av NPM1, FLT3-ITD og DNMT3A som fantes hos 30 % av pasientene (16).

Nye analysemetoder

Forskere har vist at en teknikk for å oppdage FLT3 ligander hos AML pasienter er trolig av klinisk interesse (1). Men å påvise en FLT3 ligand er ikke ensbetydende med å påvise en FLT3 mutasjon. FLT3 ligander uttrykkes uavhengig av reseptor og antallet er ofte økt etter behandling med cellegift. FLT3 ligander kan ikke oppdages hos AML pasienter hvor nivået av ligander forblir vedvarende lavt som skjer hos refraktære pasienter. Milne et al. fant i undersøkelser av en kohort på 28 pasienter at etter to runder med

intensiv kjemoterapi var FLT3 ligander umulige å oppdage hos de med manglende effekt mens i pasienter som ble vurdert til å ha komplett remisjon etter gjennomgått kjemoterapi, ble det fanget opp normale eller forhøyede nivåer av samme FLT3 ligand (1).

«Oncomine» er en ny type NGS assay som brukes i myeloide krefttilstander, som forskere anser å være lovende for fremtiden. «Oncomine» lages hos ThermoFisher, og er samme assay Haukeland universitetssykehus er i ferd med å etablere for myeloide maligniteter. En utfordring med å ta i bruk et slik NGS assay er at det tar lenger tid å få resultater fra NGS undersøkelser enn PCR fragmentanalyse. I en sammenligning av metoder mellom NGS assayet «Oncomine» og FISH, PCR, Sanger-sekvensering samt et NGS standardpanel, identifiserte «Oncomine» FLT3-ITD mutasjoner på en tilfredsstillende måte ifølge forfatterne av studien (17). Det utvikles nye metoder for å analysere genmutasjoner som forhåpentligvis bærer frukt men det er et stort sprang fra gode forskningsresultater til implementering av dem i klinisk praksis. Schwartz et al. har forsøkt å utvikle en programvare ¹ med formål om å fasilitere klinisk beslutningsstøtte og har derfor undersøkt relasjonen mellom FLT3-ITD mutasjoner og residiv hos enkelte pasienter (4). De har ikke funnet ut av betydningen som proteiner som dannes ved FLT3-ITD mutasjoner har innen klinisk anvendbarhet.

In vitro fosforylering og cellelysering har vært brukt for å modifisere KALIP metoden (Kinase Assay Linked with Phosphoproteomics) som identifiserer tre FLT3 varianter: villtype, ITD og D835Y (18). Modifikasjonen i testmetoden er basert på prinsippene bak KALIP og er gjort for å ha mulighet til å screene AML pasienter for de tre FLT3 variantene (19). Fremgangsmåten ble ansett som rask og effektiv når oppgaven var å undersøke et utvalg FLT3 mutasjoner. Perez et al. tror metoden kan anvendes for å velge enkelte former for tyrosine kinase hemmere i kreftbehandlingsregimer basert på pasientens mutasjonstatus (18). Et relevant funn kan være at AML pasienter med villtype har bedre prognose enn de med FLT-ITD (20).

Ved bruk av to ikke standardiserte metoder - support vector machine (SVM) og random forest (RF) for å undersøke «differentially expressed genes» (DEG), fant forskere hele 585 gener uttrykt ulikt i to grupper med pasienter med enten FLT3-ITD eller villtype (20). Resultatene av disse ulike genuttrykkene kan gi dypere forståelse om hvor aktive FLT3-ITD mutasjoner er hos den enkelte AML pasient og om aktiviteten endrer seg (fra positivt til negativt prøvesvar eller omvendt). SVM og RF ga på denne måten trolig nyttig informasjon i vurdering av mutasjonsaktivitet og når behandling av AML pasienter skal velges (20).

¹ For mer informasjon om den spesifikke metoden: <https://github.com/faryabib/HeatITup>.

Diskusjon

Hovedfunn

Vi fant 17 vitenskapelige artikler som tok for seg ulike sider av tester for FLT3 mutasjoner ved AML. Temaer som ble tatt opp i studiene dreide seg om hvordan testmetoder ble utført, hvilke nye metoder for testing som er av antatt klinisk relevans og om funn av andre mutasjoner sett sammen med FLT3 mutasjoner bidrar til ytterligere prognostisk eller prediktiv informasjon.

Testing for FLT3 mutasjoner gjøres for å kartlegge prognosen til AML pasienter. FLT3-ITD gir dårligere prognose og FLT3 hemmere som er bredspektrede eller andregenerasjon smalspektrede tyrosinkinasehemmere har vist å gi bedre overlevelse hos AML pasienter med og uten allogen stamcelletransplantasjon og anses i dag som en del av standardbehandlingen. Hvilke FLT3-hemmere som i størst grad påvirker prognose positivt er ikke avklart.

Siden det forekommer andre mutasjoner sammen med FLT3, ønsker forskere å undersøke om det er av klinisk interesse iht sykdomsforløp, forverring av tilstand, mortalitet og i valg av behandling av AML. Det utvikles nye metoder for å analysere genmutasjoner, men det er foreløpig uklart om de er raskere eller billigere enn metodene som allerede finnes i dag. Denne kunnskapsoppsummeringen gir ikke grunnlag for å konkludere hvilken metode som er best, men understreker at ulike analyser gjøres for ulike mutasjoner (eksempelvis ITD og TKD).

Overensstemmelse med andre oversikter

Vår forenklete metodevurdering er det første forsøket på oppsummert forskning vi kjenner til som har systematisk vurdert litteraturen om FLT3 tester, selv om utvalget var selektert.

Behov for mer forskning

Metodene som brukes til testing av FLT3 i Norge er i dag Sanger-sekvensering, PCR og NGS. Disse testmetodene er delvis kartlagt i denne oversikten, men de er ikke sammenlignet eller undersøkt nærmere mtp å kvalitetssikre metodene basert på den tilgjengelige vitenskapelige evidensen. Det er derfor umulig å si hvilken av testmetodene som er mest effektiv eller som bør foretrekkes i klinisk praksis i behandling av AML pasienter.

Standardprosedyre i Norge er å reteste for FLT3 om det er aktuelt å tilby behandling, og for å være mest mulig sikker på prøvesvaret. Schwartz og kolleger reiser spørsmål om testing av FLT3-ITD mutasjoner bør skje rutinemessig hos AML pasienter med både de novo mutasjoner og ved residiv. I Norge testes som oftest pasienter med residiv, men vanligvis ikke de som er refraktære.

I forkant av et nytt oppdrag er det hensiktsmessig å oppnå enighet rundt en problem-intervensjon-sammenligning-utfall (PICO) før man innhenter og vurderer forskningslitteratur. Å undersøke hvilke testmetoder for FLT3 som er mest effektive for bruk på norske sykehus (p.t. på Haukeland og Radiumhospitalet) er en av flere aktuelle problemstillinger hvor utfall kan for eksempel være fem års overlevelsesrater eller lignende hardt endepunkt.

Implikasjoner for praksis

I denne vurderingen legges det ikke frem noen anbefalinger om tester eller testing for FLT3 mutasjoner for bruk i klinisk praksis.

Konklusjon

Kunnskapsgrunnlaget for vurdering av FLT3 tester består av 17 vitenskapelige studier.

FLT3 mutasjoner hos AML pasienter:

- Testing gjøres rutinemessig før kreftbehandling igangsettes
- FLT3 mutasjoner (FLT3-ITD) er assosiert med dårlig prognose
- Det er uklart hvilke testmetoder for FLT3 mutasjoner som anses som de beste
- Testing av FLT3-mutasjoner gjøres ofte sammen med testing av andre mutasjoner
- Denne kunnskapsoppsummeringen gir ikke svar på om gilteritinib bør brukes kun hos pasienter med FLT3 mutasjoner

Referanser

1. Milne P, Wilhelm-Benartzi C, Grunwald MR, Bigley V, Dillon R, Freeman SD et al. Serum Flt3 ligand is a biomarker of progenitor cell mass and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood Adv*, 2019; 3(20), 3052-3061.
2. Papaemmanuil, E., et al., Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*, 2016. 374(23): p. 2209-2221.
3. Herold, T., et al., Validation and refinement of the revised 2017 European LeukemiaNet genetic risk stratification of acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 2020.
4. Schwartz, GW, Manning, B, Zhou, Y, Velu, P, Bigdeli, A, Astles, R. et al. Classes of ITD Predict Outcomes in AML Patients Treated with FLT3 Inhibitors. *Clin Cancer Res*, 2019; 25(2), 573-583.
5. Pitini E, D'Andrea E, De Vito C, Rosso A, Unim B, Marzuillo C, et al. A proposal of a new evaluation framework towards implementation of genetic tests. *PLoS One*, 2019. 14(8): e0219755.
6. Ardestani MT, Kazemi A, Chahardouli B, Mohammadi S, Nikbakht M, Rostami S, et al. FLT3-ITD Compared with DNMT3A R882 Mutation Is a More Powerful Independent Inferior Prognostic Factor in Adult Acute Myeloid Leukemia Patients After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Retrospective Cohort Study. *Turk J Haematol*, 2018; 35(3), 158-167.
7. Schumacher JA, Holgard VD, Sial F, Pearson LN, Patel JL, Karner KH. Detection and Quantification of FLT3 Internal Tandem Duplication Mutations Do Not Vary Significantly Between Whole Blood and Blast-Enriched Samples. *Am J Clin Pathol*, 2020;153(2), 251-257.
8. Cumbo C, Minervini CF, Orsini P, Anelli L, Zagaria A, Minervini A et al. Nanopore Targeted Sequencing for Rapid Gene Mutations Detection in Acute Myeloid Leukemia. *Genes* 2019; 10(12)
9. Zhu GZ, Yang YL, Zhang YJ, Liu W, Li MP, Zeng WJ et al. High Expression of AHSP, EPB42, GYPC and HEMGN Predicts Favorable Prognosis in FLT3-ITD-Negative Acute Myeloid Leukemia. *Cell Physiol Biochem*, 2017; 42(5), 1973-1984.

10. Quek L, Ferguson P, Metzner M, Ahmed I, Kennedy A, Garnett C et al. Mutational analysis of disease relapse in patients allografted for acute myeloid leukemia. *Blood Adv*, 2016; 1(3), 193-204
11. Brodská B, Otevřelová P, Šálek C, Fuchs O, Gašová Z, Kuželová K. High PD-L1 Expression Predicts for Worse Outcome of Leukemia Patients with Concomitant NPM1 and FLT3 Mutations. *Int J Mol Sci*, 2019; 20(11)
12. Mezei ZA, Tornai D, Földesi R, Madar L, Sümegi A, Papp M et al. A DNA pool of FLT3-ITD positive DNA samples can be used efficiently for analytical evaluation of NGS-based FLT3-ITD quantitation - Testing several different ITD sequences and rates, simultaneously. *J Biotechnol*, 2019; 303, 25-29.
13. Liu SB, Qiu QC, Bao XB, Ma X, Li HZ, Liu YJ et al. Pattern and prognostic value of FLT3-ITD mutations in Chinese de novo adult acute myeloid leukemia. *Cancer Sci*, 2018; 109(12), 3981-3992.
14. Patkar N, Kakirde C, Bhanshe P, Joshi S, Chaudhary S, Badrinath Y et al. Utility of Immunophenotypic Measurable Residual Disease in Adult Acute Myeloid Leukemia-Real-World Context. 2019; *Front Oncol*, 9, 450.
15. Bibault JE, Figeac M, Hélevaut N, Rodriguez C, Quief S, Sebda S et al. Next-generation sequencing of FLT3 internal tandem duplications for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukemia. *Oncotarget*, 2015; 6(26), 22812-22821.
16. Mizuta S, Yamane N, Komai T, Koba Y, Kawata T, Ukyo N et al. Investigation of screening method for DNMT3A mutations by high-resolution melting analysis in acute myeloid leukemia. *Int J Lab Hematol*, 2019; 41(5), 593-600.
17. Park J, Kim HS, Lee JM, Jung J, Kang D, Choi T, et al. Analytical and Potential Clinical Performance of Oncomine Myeloid Research Assay for Myeloid Neoplasms. *Mol Diagn Ther*, 2020; 24(5), 579-592.
18. Perez M, Blankenhorn J, Murray KJ, Parker LL. High-throughput Identification of FLT3 Wild-type and Mutant Kinase Substrate Preferences and Application to Design of Sensitive In Vitro Kinase Assay Substrates. *Mol Cell Proteomics*, 2019; 18(3), 477-489..
19. Xue L, Arrington JV, Tao WA, Identification of Direct Kinase Substrates via Kinase Assay-Linked Phosphoproteomics. *Methods Mol Biol*, 2016. 1355: p. 263-73.
20. Li C, Zhu B, Chen J, Huang X. Feature genes predicting the FLT3/ITD mutation in acute myeloid leukemia. *Mol Med Rep*, 2016; 14(1)

Vedlegg 1 Søkestrategi

Medline (Ovid)

MEDLINE and Epub Ahead of Print, In-Process & Other Non-Indexed Citations, Daily and Versions(R) 1946 to October 19, 2020

Søketreff: 30

- 1 exp Leukemia, Myeloid, Acute/
- 2 (acute myeloid leukemia* or aml).mp.
- 3 exp fms-Like Tyrosine Kinase 3/
- 4 (FLT3* or FLT 3*).mp.
- 5 (1 or 2) and (3 or 4)
- 6 (test* and assay*).mp.
- 7 5 and 6
- 8 limit 7 to yr="2015 -Current"
- 9 animal/ not human/
- 10 8 not 9

Embase (Ovid)

Embase 1980 to 2020 Week 42

Søketreff: 261

- 1 exp *acute myeloid leukemia/
- 2 (acute myeloid leukemia* or aml).tw.
- 3 1 or 2
- 4 (FLT3* or FLT 3*).tw.
- 5 (test* and assay*).tw.
- 6 3 and 4 and 5
- 7 limit 6 to yr="2015 -Current"
- 8 animals/ not humans/
- 9 7 not 8

PubMed

Søketreff: 76

#4 Search: #1 or #2 Filters: from 2015 - 2020

#3 Search: #1 or #2

#2 Search: (acute myeloid leukemia* or aml) and (FLT3* or "FLT 3" or "FLT-3") and test* and assay*

#1 Search: acute myeloid leukemia and FLT3 and test and assay

Scopus

Søketreff: 45

Advanced search: TITLE-ABS-KEY (("acute myeloid leukemia*" OR aml) AND (flt3* OR "FLT 3*" OR "FLT-3*") AND test* AND assay*) AND PUBYEAR 2015 - current

Cochrane CENTRAL

Søketreff: 33

- #1 MeSH descriptor: [Leukemia, Myeloid, Acute] explode all trees
- #2 ((acute next myeloid next leukemia*) or aml)
- #3 #1 or #2
- #4 MeSH descriptor: [fms-Like Tyrosine Kinase 3] explode all trees
- #5 (FLT3* or "FLT 3" or "FLT-3"):ti,ab,kw
- #6 #4 or #5
- #7 assay*
- #8 #3 and #6 and #7 with Publication Year from 2015 to 2020, in Trials

ClinicalTrials.gov

Søketreff: 12

Simple search

Condition or disease: acute myeloid leukemia

Other terms: FLT3 assay*

ICTRP

Søketreff: 0

acute myeloid leukemia and FLT3* and assay*

Epistemonikos

Søketreff: Systematic reviews 1, primary studies 0

Title or abstract: (flt3* or "flt 3" or "flt-3") and (acute myeloid leukemia* or aml) and (test* or assay*)

Publication date: Last 5 years

Vedlegg 2 Kostnader ved testing for FLT3 mutasjoner

Navn på prosedyre	Refusjon (NOK)
<i>Fremstilling og granskning av histologiske prøver</i>	
1-2 blokker	62,21
3-7 blokker	122,39
8-19 blokker	237,76
20 blokker eller mer	364,18
<i>Fremstilling og granskning av cytologiske prøver</i>	
Andre utstrykspreparater, inkl. væskebasert cytologi og punksjonscytologi	78,25
Punksjonscytologi, prøvetaking og hurtigfarging	171,55
<i>Immun- og enzymhistokjemiske undersøkelser på ufiksert materiale</i>	
Immun- og enzymhistokjemi, 1-10 undersøkelser	303,98
Immun- og enzymhistokjemi, 11 eller flere undersøkelser	453,46
<i>Andre undersøkelser</i>	
Frysesnittundersøkelser, hurtigdiagnostikk	84,28
Elektronmikroskopiske undersøkelser	911,93
<i>Særskilte kvantitative undersøkelser</i>	
Billedanalyse	453,46
Væskestrømscytometri (flow cytometri)	453,46
<i>Spesifisert legearbeid per påbegynt halvtime</i>	
Merarbeid	53,17
<i>Andre takster, kun gyldig for patologiske avdelinger *</i>	
DNA-/RNA-Gensekvensering analysepakke	7127,96
Organisk ekstraksjon av DNA/RNA	53,57
PCR (polymerasekjedereaksjon) 1-2 primerpar	84,28
Tillegg per ekstra primerpar	22,67
Revers transkripsjon	28,84
Sekvensering per DNA-tråd	240,77
In situ-hybridisering (1-3 prober)	222,72

Tillegg per probe utover 3	28,84
Immunologiske undersøkelser av celler med 1–10 antisera	254,81
Særdeles kostbare og kompliserte analyser Særdeles tidkrevende funksjonsundersøkelser II	159,51

Tabell 1. Hentet fra Lovdata, Forskrift om godtgjørelse for å yte poliklinisk helsehjelp ²

Med histologiske prøver menes alt vev som ledsages av en remisse. I taksten er inkludert dypere snitt og spesialfarginger (ikke immun- og enzymhistokjemi). Patologitaksene – fremstilling og gransking av histologiske prøver kan kun kreves for analyser utført i patologiske avdelinger.

Takst for DNA-/RNA-Gensekvensering analysepakke kan utløses dersom det har blitt utført dypsekvenseringsteknologi for å sekvensere genene som inngår i pakken/panelet. Taksten kan også utløses ved bruk av genpanel analyser ved nanostring teknologi. Taksten utløses en gang per utførte analysepakke. Dersom det gjøres både RNA- og DNA- sekvensering, kan taksten utløses to ganger.

² <https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2007-12-19-1761?q=forskrifter+utgifter+helsehjelp+poliklinisk>

* Ved Haukeland universitetssykehus benyttes det genetikk takster.

Vedlegg 3 Aktivitetslogg

Aktivitet	Dato
Mottatt oppdrag fra Bestillerforum RHF	21. oktober 2019
Første fagekspert rekruttert og kontaktet	8. april 2020
Arbeid påbegynt; siste fagekspert rekruttert	15. juni 2020
Utkast oversendt eksterne fagekspert for kommentarer	23. oktober 2020
Utkast diskutert med klyngeledelsen, FHI	24. november 2020
Utkast oversendt Bestillerforum RHF for utkvittering	11. desember 2020
Rapport publisert	

Utgitt av Folkehelseinstituttet

Mars 2021

Postboks 4404 Nydalen

NO-0403 Oslo

Telefon: 21 07 70 00

Rapporten kan lastes ned gratis fra

Folkehelseinstituttets nettsider

www.fhi.no