

**Convegno Regionale SIBioC
Emilia Romagna 2018**



Topics in medicina di laboratorio

Bologna

30 novembre 2018

Aula Cesari c/o AVIS Ospedale Maggiore

10.00 – 17.00

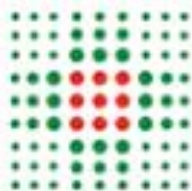
Via dell'Ospedale, 20



APPLICAZIONI DELLA CITOFUORIMETRIA NELLA DIAGNOSI DELLE PATOLOGIE EMATOLOGICHE

Laura Albertazzi

*Responsabile Struttura Semplice Ematologia -Coagulazione
Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche ed Endocrinologia*



SERVIZIO SANITARIO REGIONALE
EMILIA-ROMAGNA
Azienda Unità Sanitaria Locale di Reggio Emilia
IRCCS Istituto in tecnologie avanzate e modelli assistenziali in oncologia



“SISTEMI ESPERTI NELL’ANALISI DELLE IMMAGINI”

L'analisi delle immagini è
«l'estrazione di informazioni significative dalle immagini»

La citofluorimetria
si pone a pieno titolo in quest'ambito



CITOFUORIMETRIA A FLUSSO

- Si applica a cellule in sospensione provenienti da sangue periferico e midollare, aspirati tissutali, liquor, liquidi organici vari
- Genera dati quantitativi, riproducibili e statisticamente robusti.
- Può raggiungere un'elevata sensibilità analitica grazie alla strumentazione sofisticata attualmente disponibile

RILEVANZA DELLA CITOFUORIMETRIA A FLUSSO NELLA DIAGNOSTICA

- Malattie ematologiche
- Malattie del sistema immune

Identifica e riconosce le popolazioni cellulari, evidenziando alterazioni quali/quantitative.

RILEVANZA DELLA CITOFUORIMETRIA A FLUSSO NELLA DIAGNOSTICA EMATOLOGICA

- Identificazione e caratterizzazione della popolazione patologica
- Identificazione e caratterizzazione delle popolazioni residue normali
- Formulazione di diagnosi e classificazione in base alla definizione di linea e del livello maturativo della popolazione patologica
- Ricerca di caratteristiche immunofenotipiche particolari a scopo prognostico
- Ricerca di marcatori o espressioni aberranti a scopo di monitoraggio
- Identificazione di particolari pattern antigenici predittivi di alterazioni molecolari o citogenetiche

RILEVANZA DELLA CITOFUORIMETRIA A FLUSSO NELLA DIAGNOSTICA EMATOLOGICA

- L'analisi citofluorimetrica rappresenta il **GOLD STANDARD** nelle patologie **LINFOPROLIFERATIVE** perché consente di riconoscere le sottopopolazioni linfocitarie e di stabilirne il livello differenziativo, funzionale e la clonalità

RILEVANZA DELLA CITOFUORIMETRIA A FLUSSO NELLA DIAGNOSTICA EMATOLOGICA

- **Emoglobinuria parossistica notturna (EPN):** l'analisi citofluorimetrica rappresenta il “**gold standard**” per l'individuazione del clone EPN

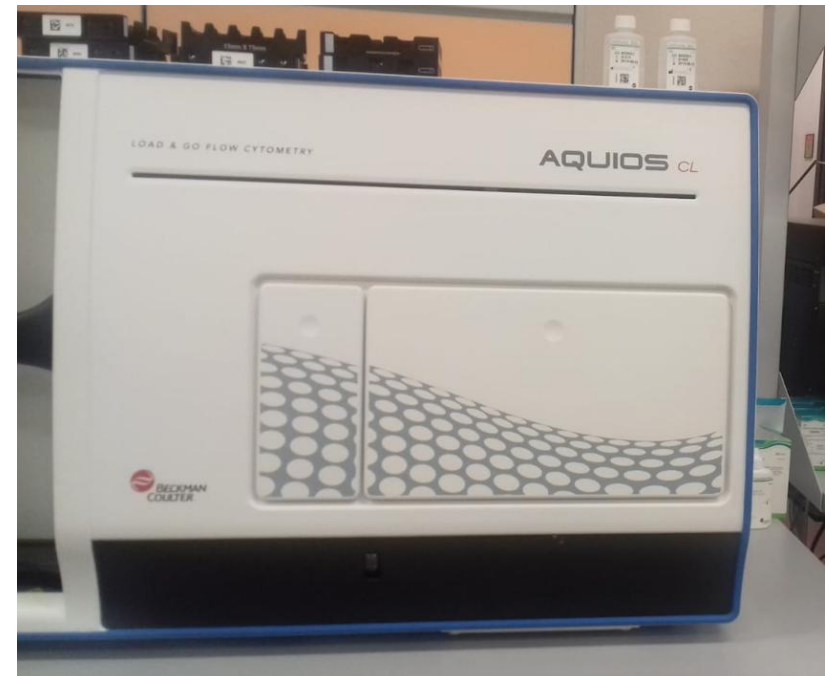
ASPETTI TECNICI e QUALITÀ DEI RISULTATI

- Utilizzo di protocolli/panel internazionali validati e con provata utilità clinico-diagnostica
- Disponibilità di tubi specifici per diagnostica di Leucemie/Linfomi
- Disponibilità di cocktail pre-miscelati/tubi liofilizzati/essiccati pre-marcati, pronti all'uso con miscele bilanciate ed ottimizzate per qualità e standardizzazione
- Aumento della qualità, della efficienza ed efficacia con risultati affidabili, riproducibili e standardizzati/armonizzati
- Risparmio tempo/costi.

CITOFUORIMETRI DEL LABORATORIO *ROUTINE*

Citometro a flusso AQUIOS CL sistema Load & Go: è costituito da un modulo completamente automatizzato per la preparazione dei campioni, il caricamento continuo dei campioni, la gestione automatizzata dei reagenti, dei controlli di qualità e di altre procedure quali lavaggi e spegnimento.

- automazione «spinta»
- collegamento al LIS
- ottimizzazione dei tempi e delle risorse, dell'organizzazione, dei costi



CITOFUORIMETRI DEL LABORATORIO

APPROFONDIMENTI

Citometro a flusso Cytomics FC 500

- analizzatore a 5 colori/2 laser
- routine, diagnostica ematologica avanzata

Citometro a flusso Navios: per applicazioni di citometria avanzata, ad alta capacità produttiva.

- analizzatore a 10 colori/3 laser
- uso di miscele pre-marcate/liofile pronte all'uso



IL CONTRIBUTO DEL LABORATORIO NELLA DIAGNOSI DELLE MALATTIE EMATOLOGICHE

EMOCITOMETRIA

ISTOLOGIA

CITOMORFOLOGIA
SP/MO

CITOGENETICA/FISH

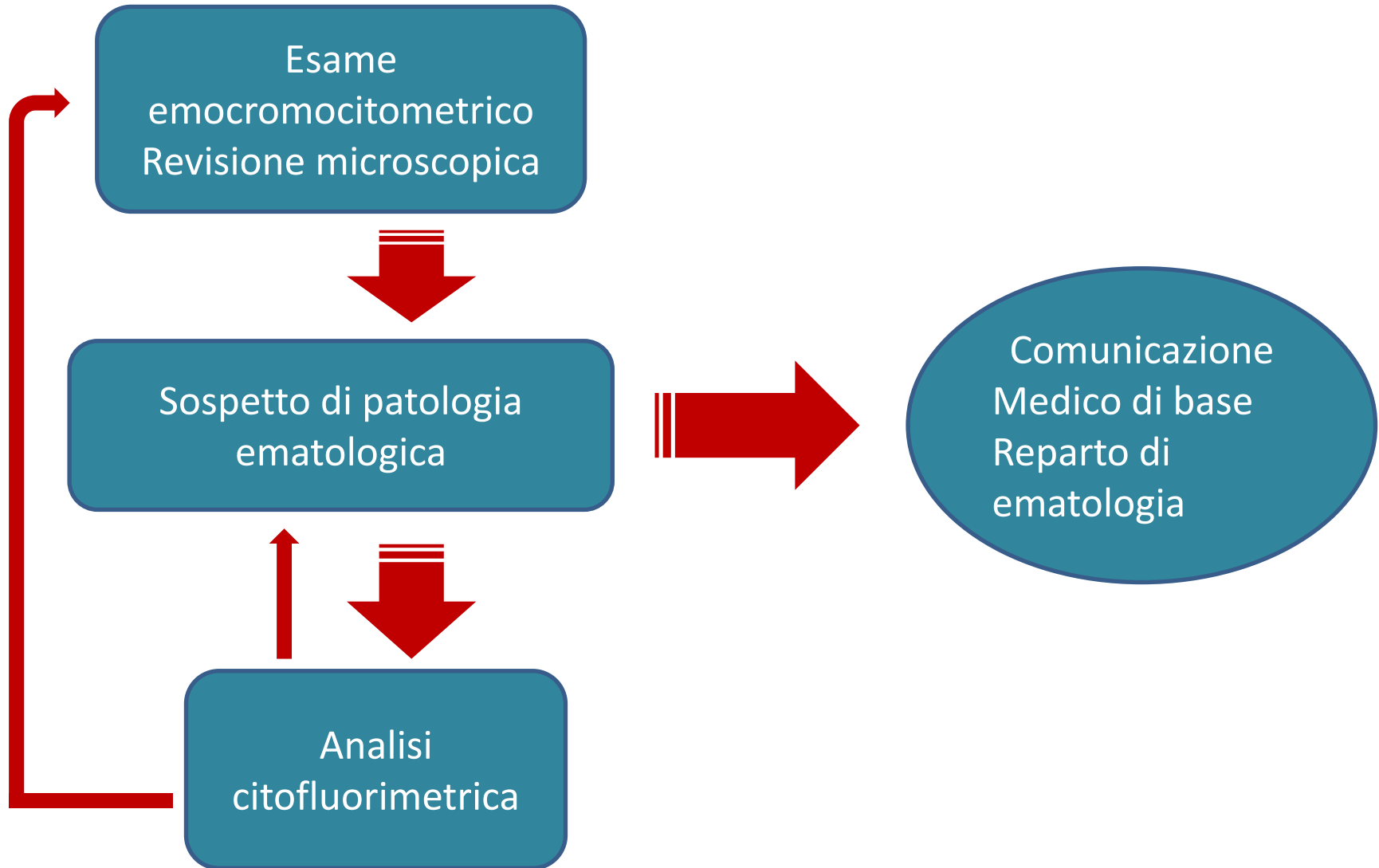
DIAGNOSI

CITOFUORIMETRIA

IMMUNOISTOLOGIA

BIOLOGIA
MOLECOLARE

PERCORSO DIAGNOSTICO



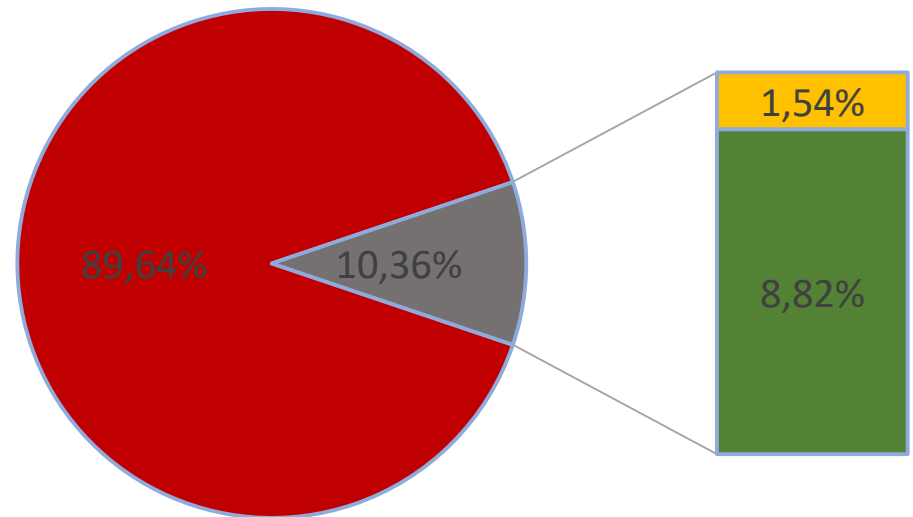
ALCUNI DATI

| Emocromi con e senza formula 2017 | | |
|-------------------------------------|--------|------|
| Solo emocromo | 85179 | 25% |
| Emocromo con formula strumentale | 230946 | 67% |
| Emocromo con formula al microscopio | 27665 | 8% |
| Totale | 343790 | 100% |

Stima del numero di emocromi sottoposti a revisione microscopica

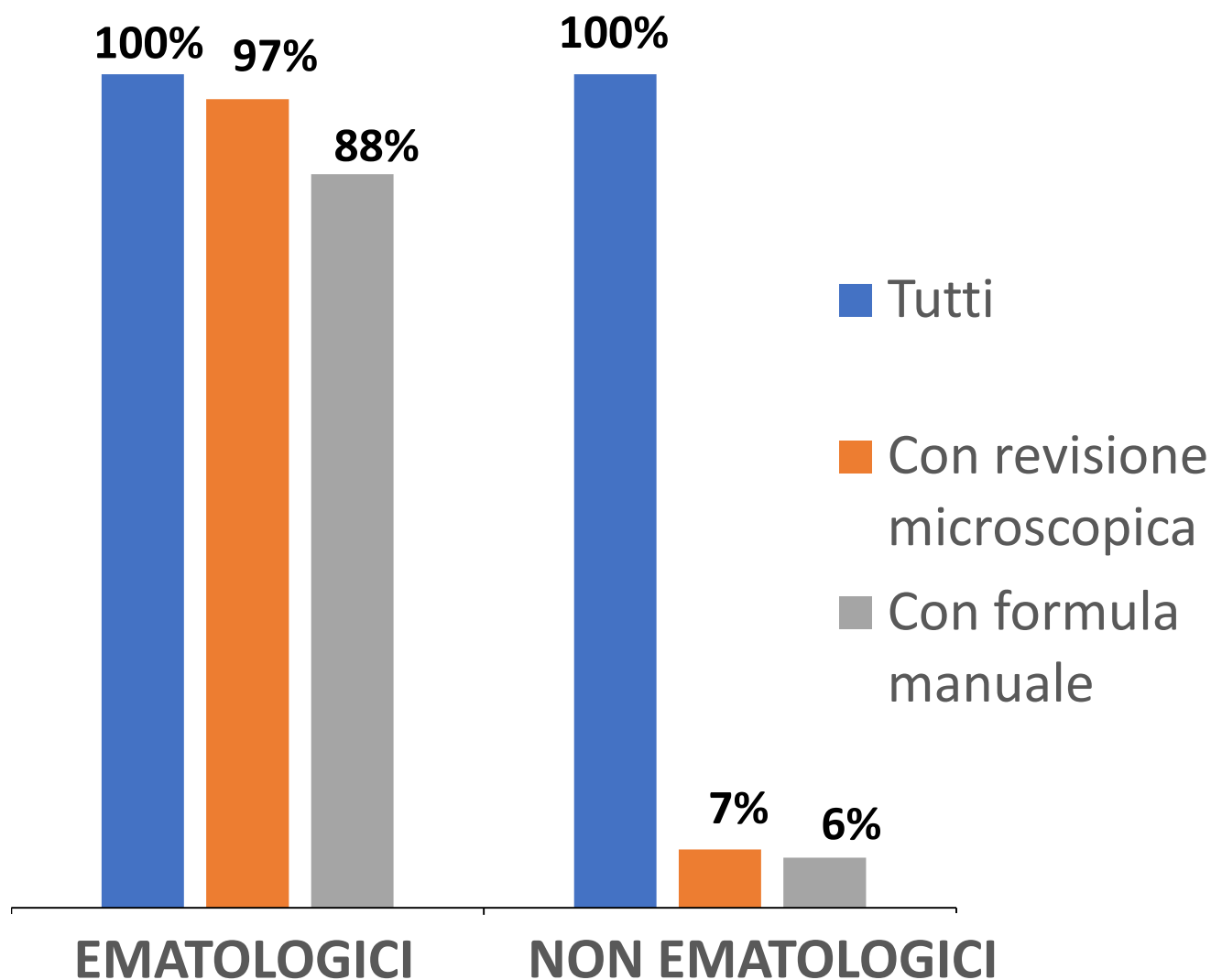
Analisi di un campione relativo ad una settimana in periodo non estivo

| | | |
|--|-------------|----------------|
| Emocromi senza revisione microscopica | 6454 | 89,64% |
| Emocromi con revisione microscopica senza formula manuale | 111 | 1,54% |
| Emocromi con revisione microscopica con formula manuale | 635 | 8,82% |
| Totale | 7200 | 100,00% |

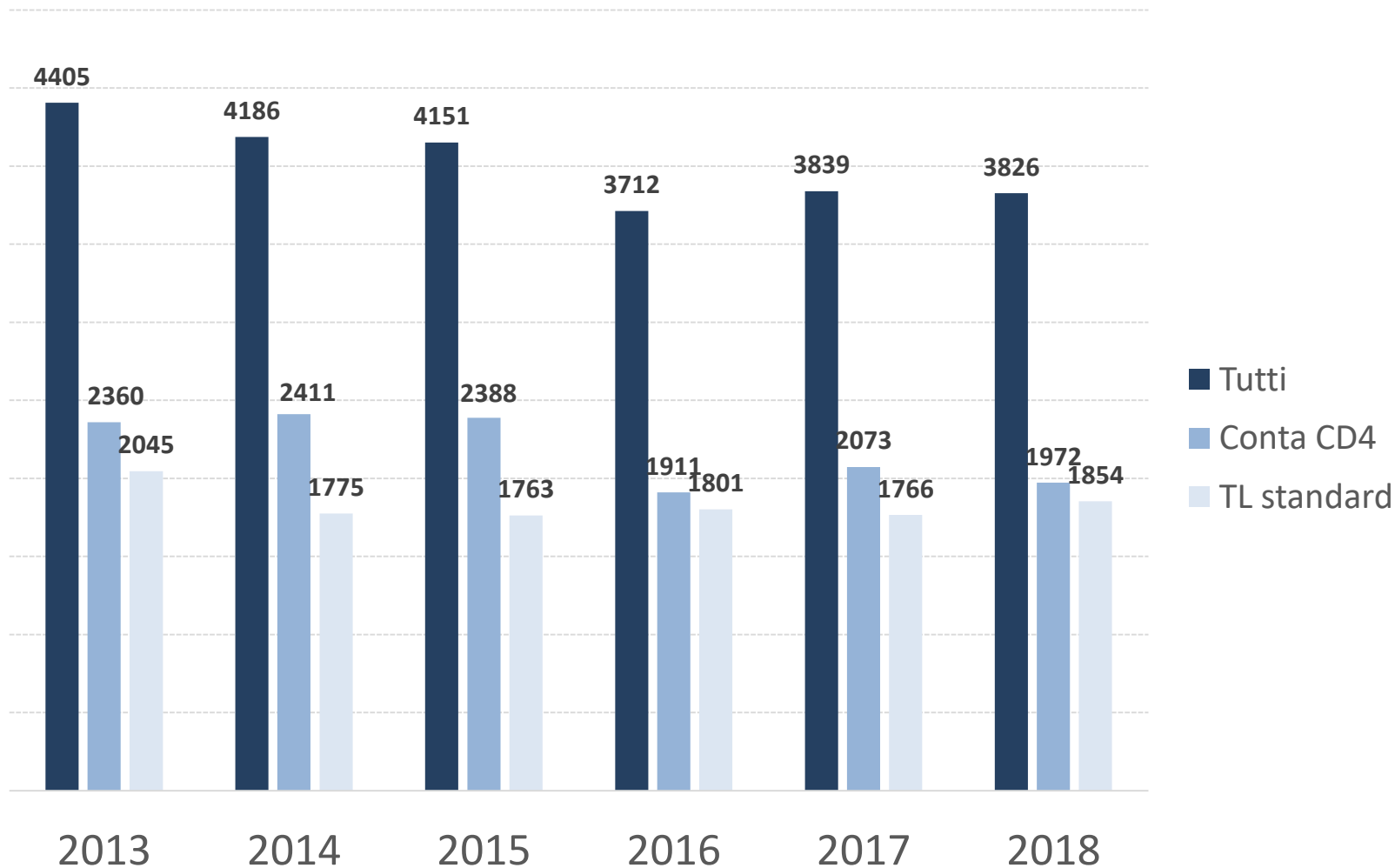


- Emocromi senza revisione microscopica
- Emocromi con revisione microscopica senza formula manuale
- Emocromi con revisione microscopica con formula manuale

Pazienti ematologici vs pazienti non ematologici



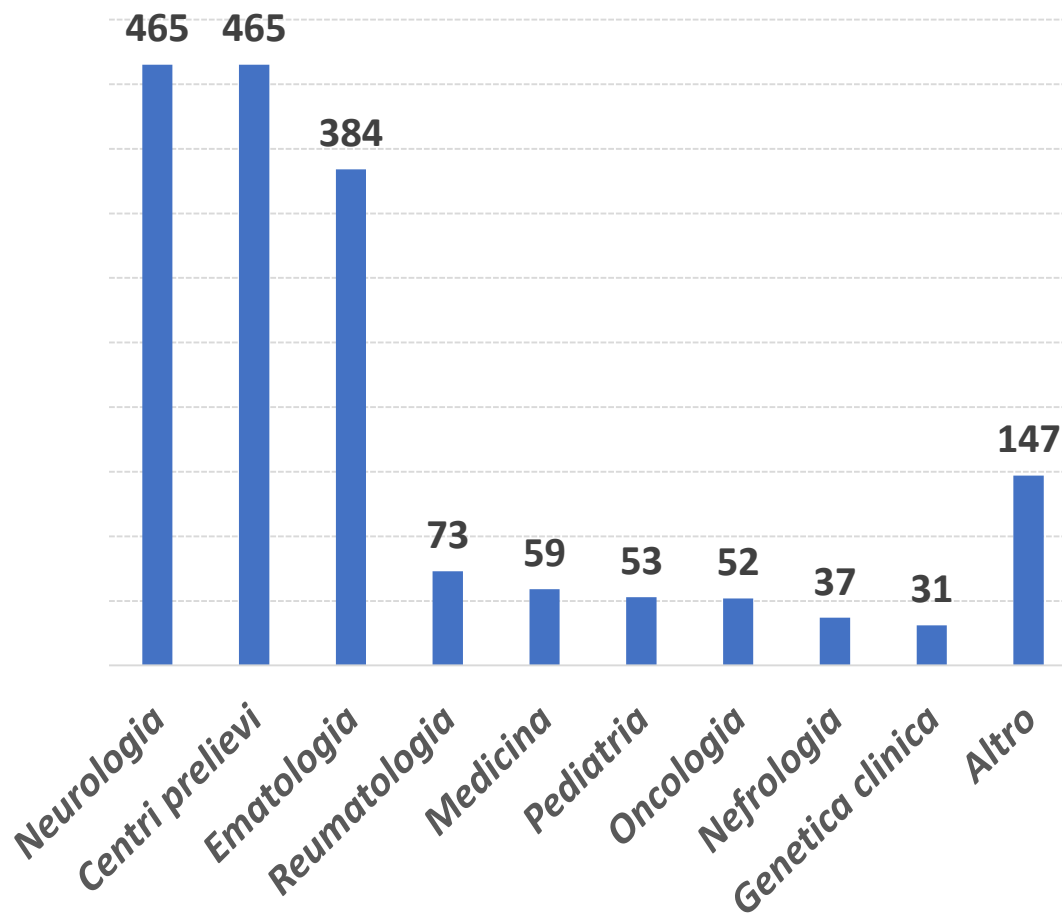
Numero tipizzazioni su sangue periferico



Tipizzazione su sangue periferico (anno 2017)

Ripartizione per reparto richiedente

| | |
|------------------|------|
| Tutti | 1766 |
| Neurologia | 465 |
| Centri prelievi | 465 |
| Ematologia | 384 |
| Reumatologia | 73 |
| Medicina | 59 |
| Pediatria | 53 |
| Oncologia | 52 |
| Nefrologia | 37 |
| Genetica clinica | 31 |
| Altro | 147 |

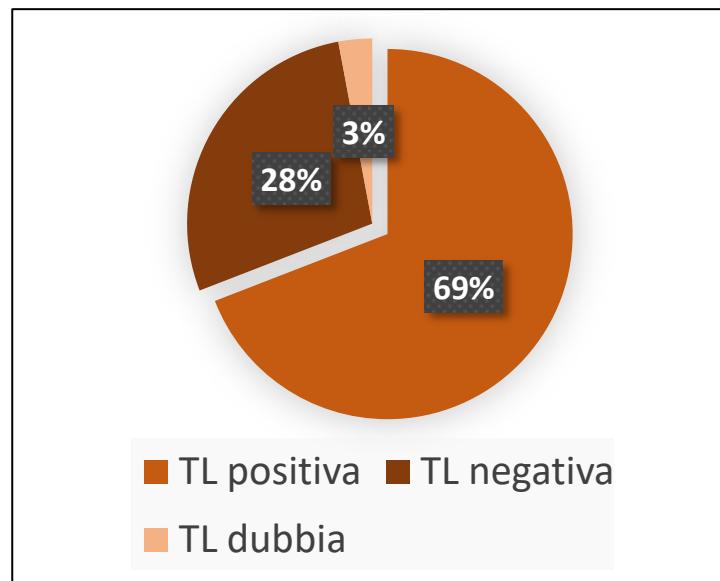
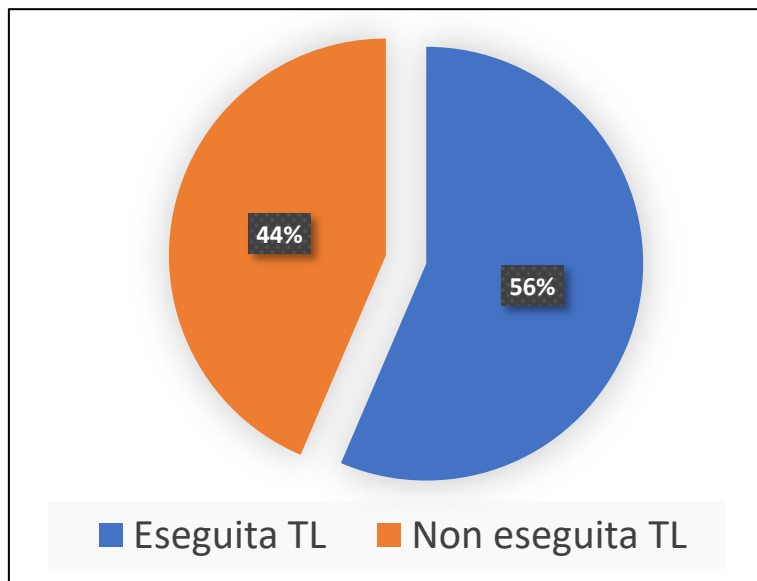


Dall'esame morfologico dello striscio di SP all'approfondimento in citofluorimetria

Casistica relativa al biennio ottobre 2016-ottobre 2018

| | |
|-----------------|-----|
| Consigliata TL | 241 |
| Eseguita TL | 136 |
| Non eseguita TL | 105 |

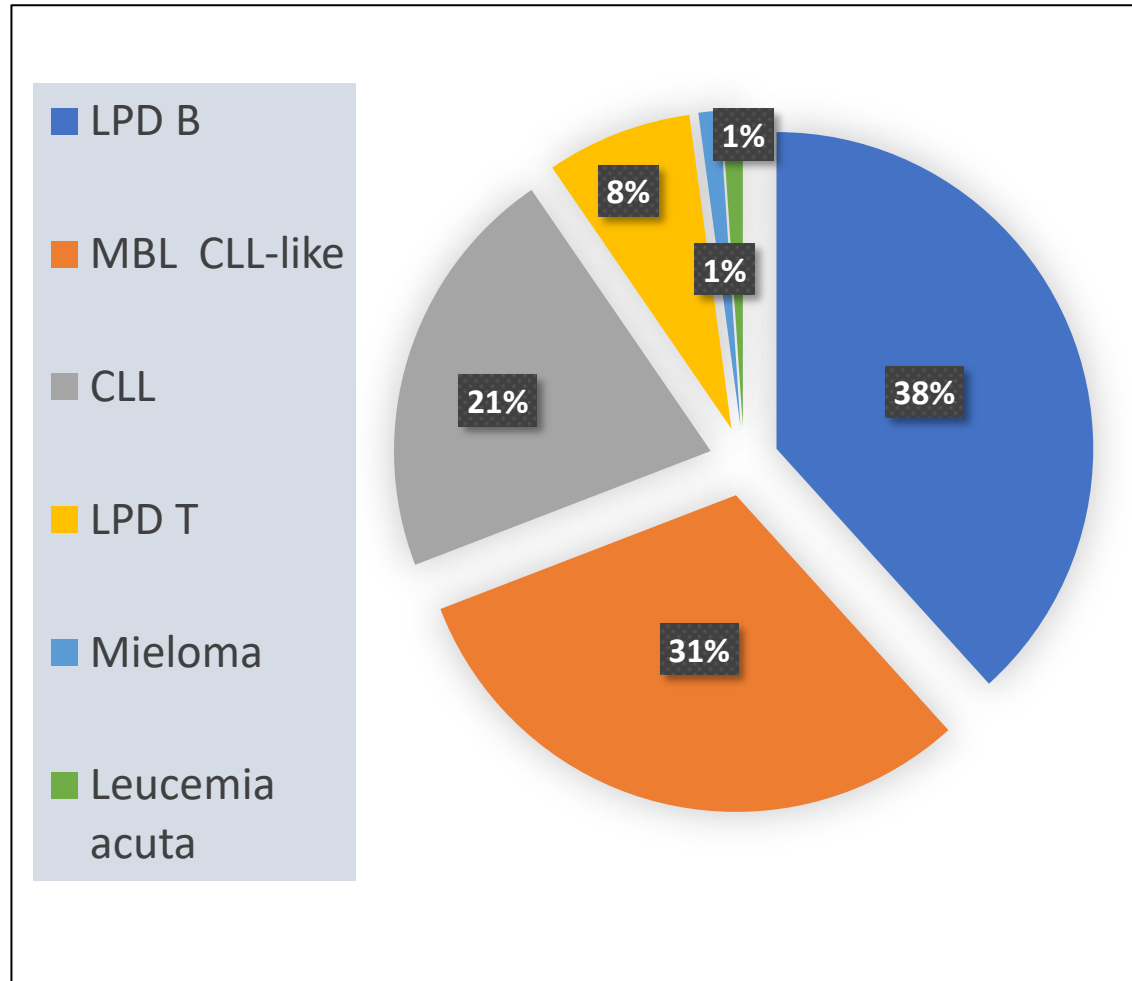
| | |
|-------------|-----|
| TL positiva | 94 |
| TL negativa | 38 |
| TL dubbia | 4 |
| Totale | 136 |



Tipizzazioni “positive”

Casistica relativa al biennio ottobre 2016-ottobre 2018

| | |
|-------------------|----|
| LPD B | 36 |
| MBL CLL-like | 29 |
| CLL | 20 |
| LPD T | 7 |
| Mieloma | 1 |
| Leucemia acuta | 1 |
| Totale | 94 |



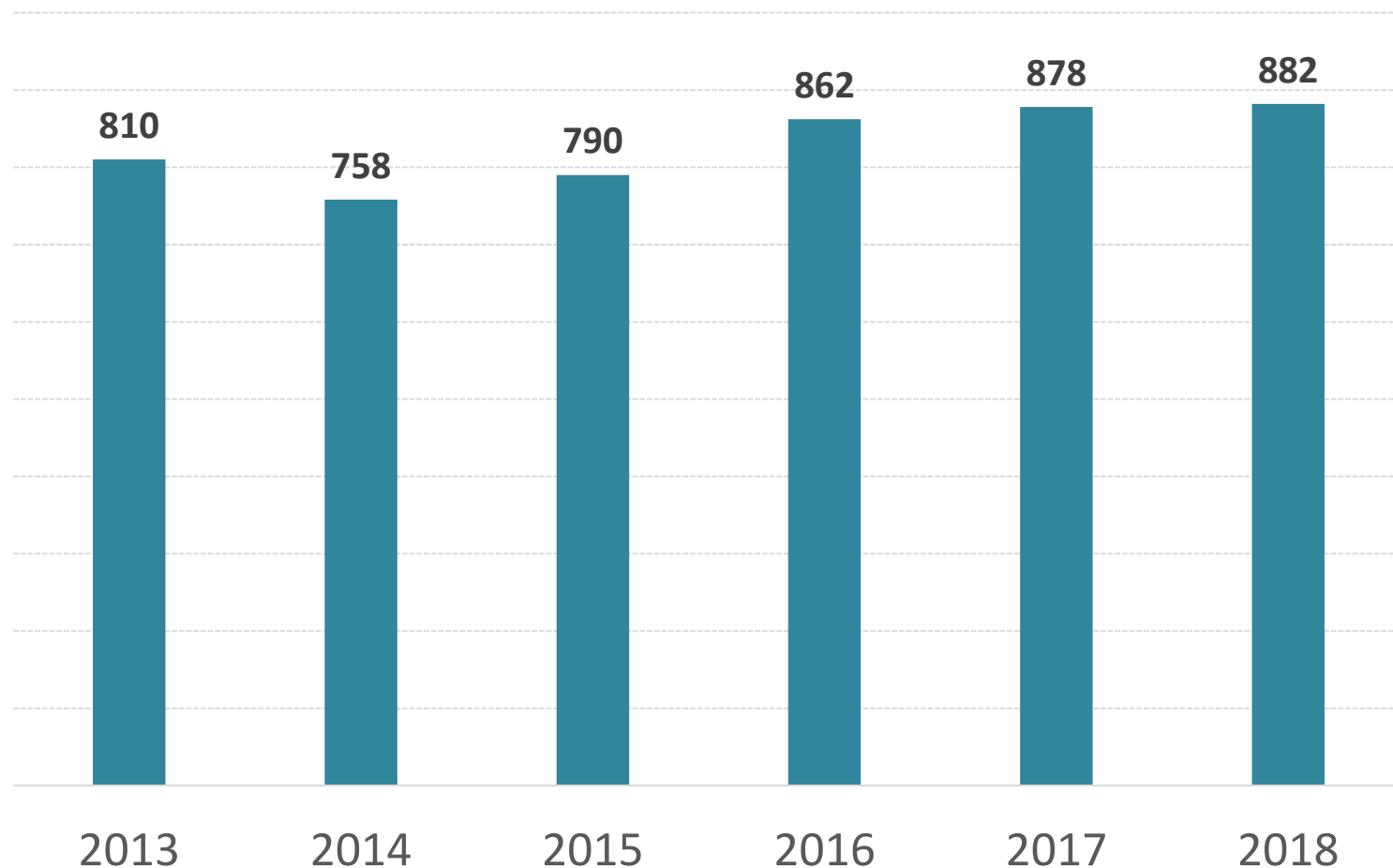
COMPLETAMENTO DIAGNOSTICO

Aspirato midollare

- citomorfologia
- analisi citofluorimetrica
- biologia molecolare

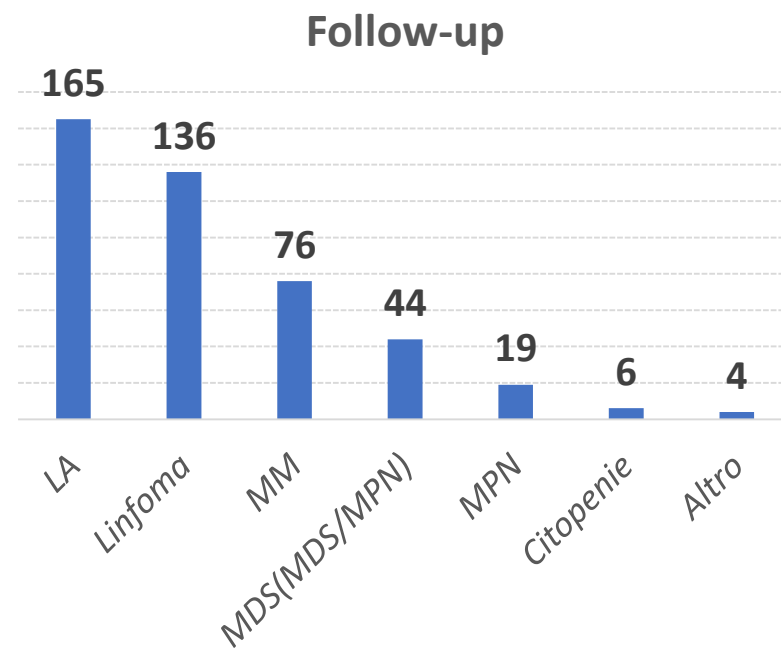
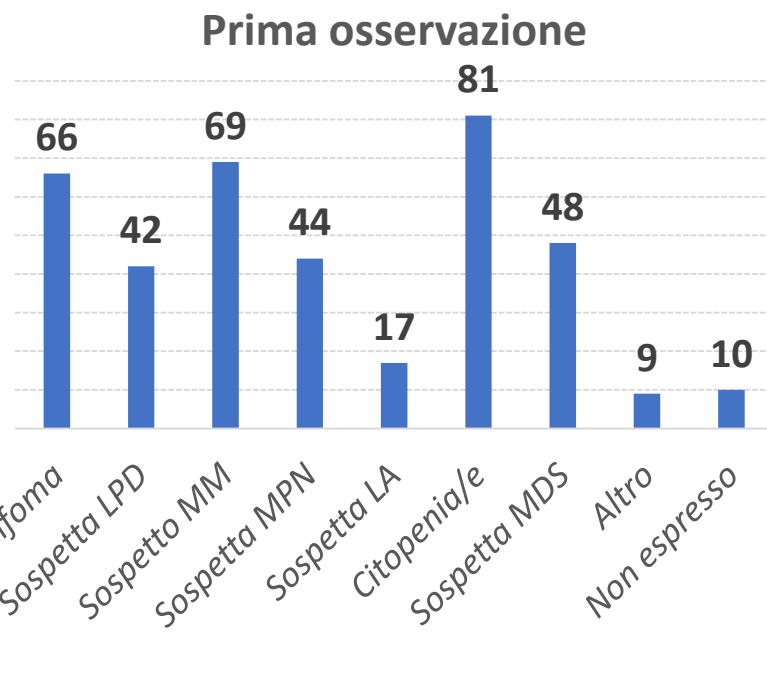
ALCUNI DATI

Numero tipizzazioni su sangue midollare

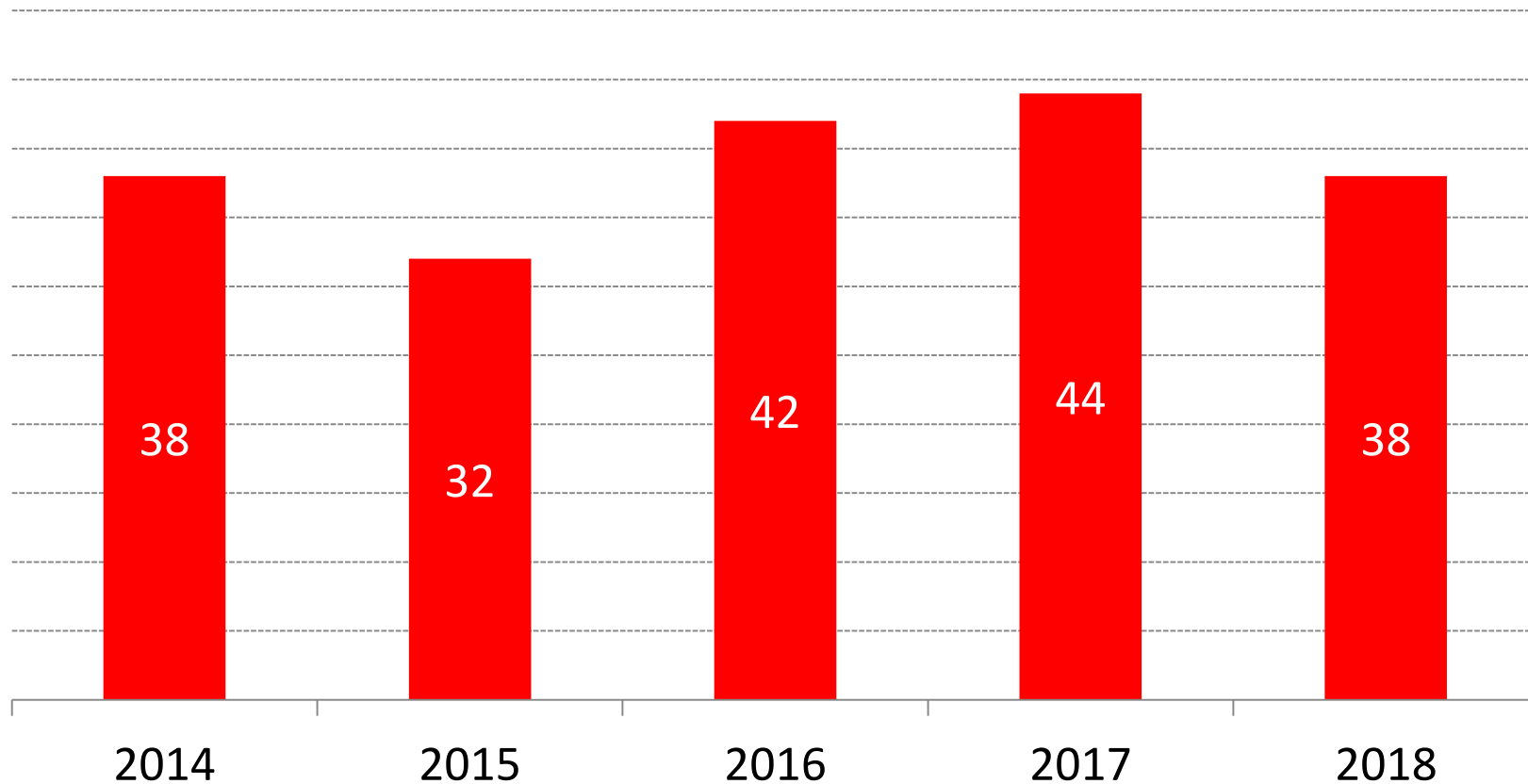


Immunofenotipo su sangue midollare (anno 2017)

Ripartizione per quesito diagnostico



Nuove diagnosi di leucemie acute 2014-2018



CASI CLINICI

CASO 1

Donna di anni 41
Esegue esami di controllo per gravidanza al primo trimestre.

Dati emocromocitometrici

Leucociti = 13070/ μ L

Hb= 13,3 g/dL

Piastrine= 144000/ μ L

Formula al microscopio

Neutrofili 13%

Linfociti 15%

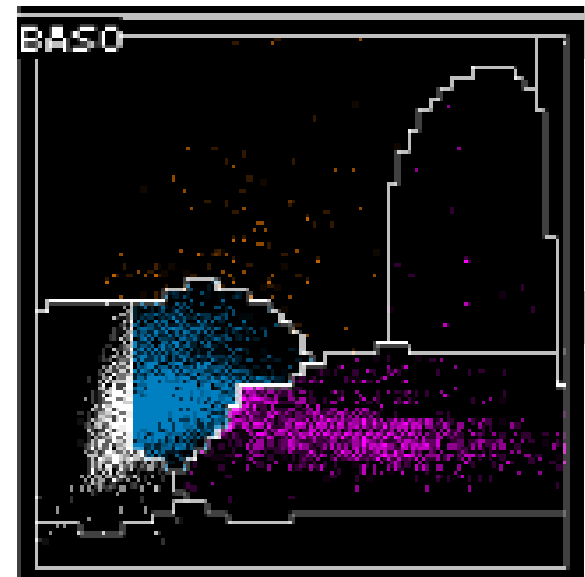
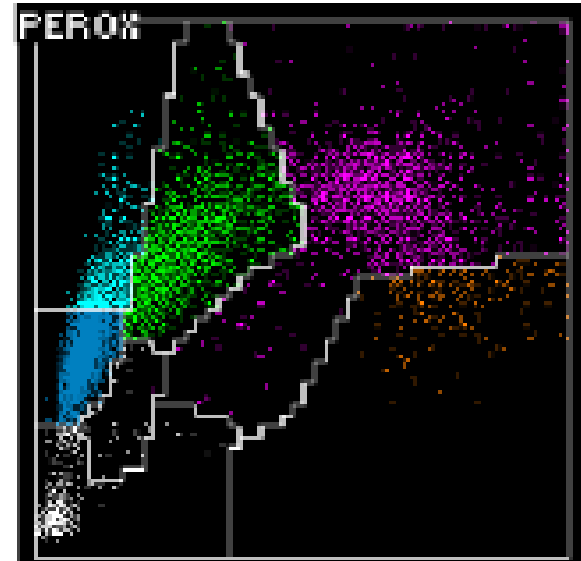
Monociti 1%

Eosinofili 0%

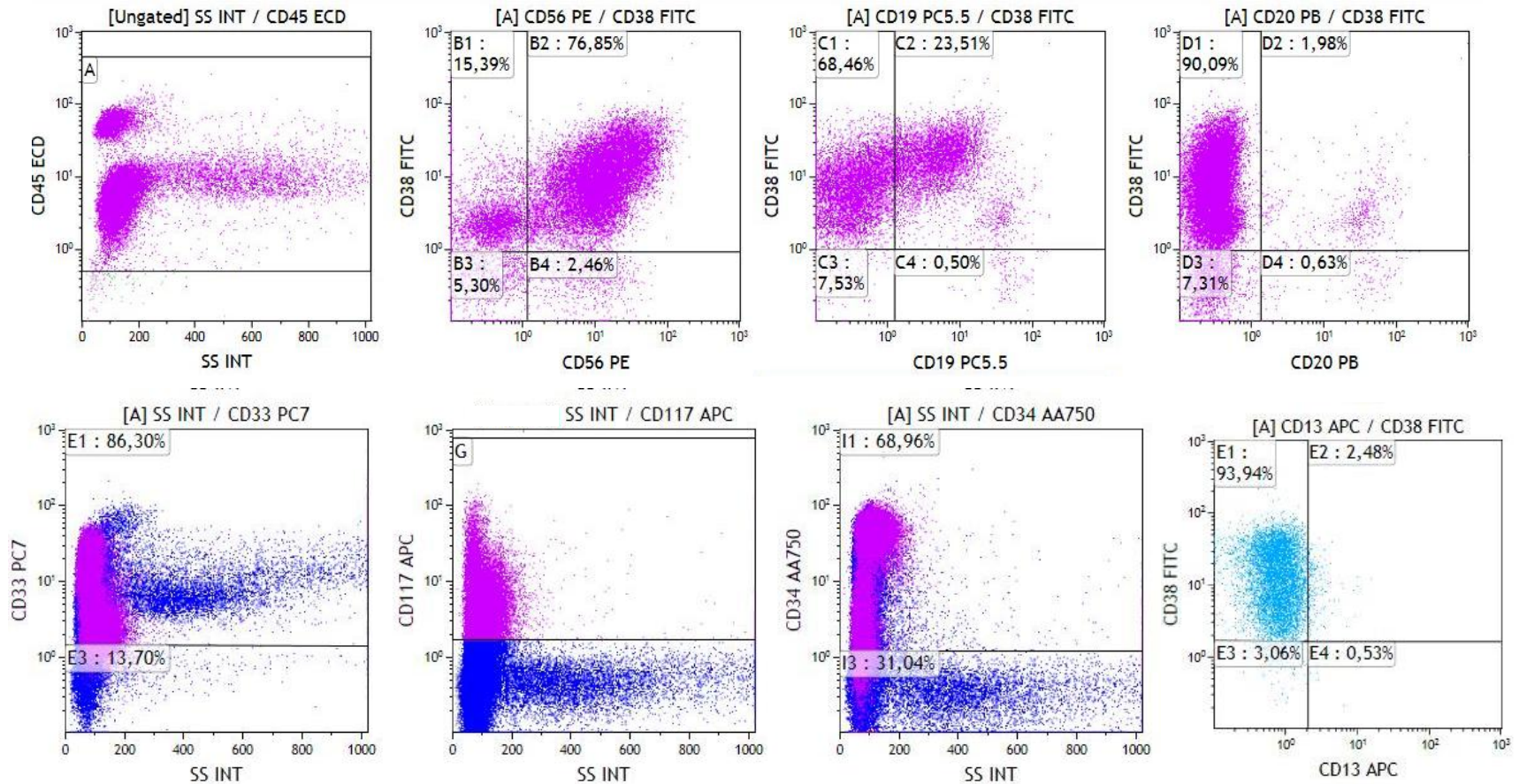
Basofili 0%

Blasti 71%

Metamielociti <1%



Immunofenotipo su sangue periferico



Sintesi dei risultati

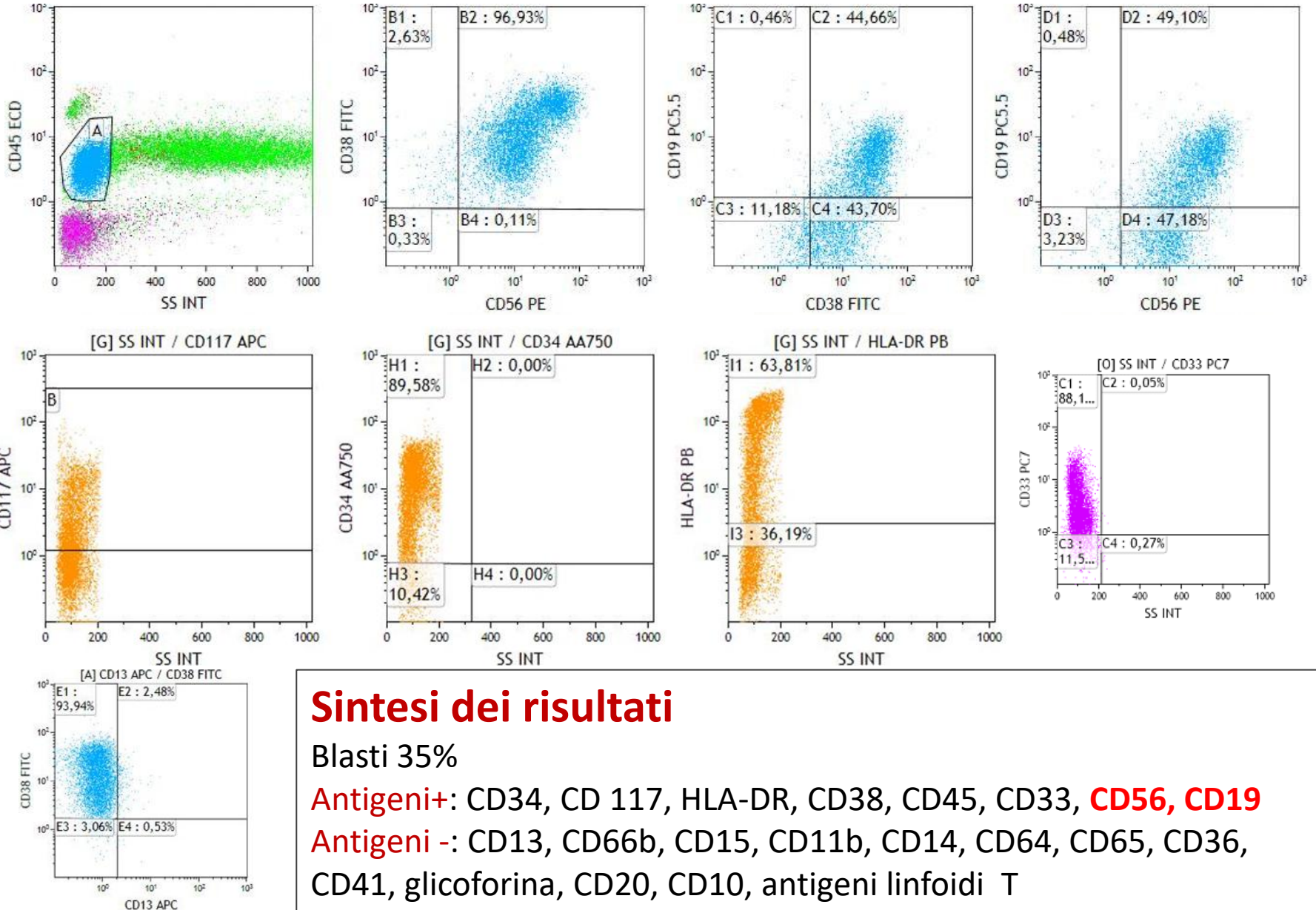
Blasti 73%

Antigeni+: CD34, HLA-DR, CD38, CD45, CD33, **CD56**

Antigeni +/-: CD117, **CD19**

Antigeni -: CD13, CD66b, CD15, CD11b, CD14, CD64, CD65, CD36, CD41, glicoforina, CD20, CD10, antigeni linfoidi T

Immunofenotipo su sangue midollare



Sintesi dei risultati

Blasti 35%

Antigeni+: CD34, CD 117, HLA-DR, CD38, CD45, CD33, **CD56, CD19**

Antigeni -: CD13, CD66b, CD15, CD11b, CD14, CD64, CD65, CD36, CD41, glicoforina, CD20, CD10, antigeni linfoidi T

Analisi molecolare su sangue midollare

RICERCA TRASCritto AML1-ETO

Materiale:

Sangue midollare

Trascritto AML1-ETO t (8;21)

Positiva

E' stata eseguita l'estrazione di RNA e l'analisi mediante tecniche di Nested-PCR e rivelazione su gel di agarosio.

Tipo di trascritto:

AML1-ETO = 222 bp

RICERCA MUTAZIONI FLT3

Materiale:

Sangue midollare

Mutazione FLT3 ITD

Presente

Mutazione FLT3 TKD

Assente

Classificazione secondo WHO 2017

AML with recurrent genetic abnormalities

AML with t(8;21)(q22;q22.1); *RUNX1-RUNX1T1*

AML with inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); *CBFB-MYH11*

APL with *PML-RARA*

AML with t(9;11)(p21.3;q23.3); *MLLT3-KMT2A*

AML with t(6;9)(p23;q34.1); *DEK-NUP214*

AML with inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); *GATA2, MECOM*

AML (megakaryoblastic) with t(1;22)(p13.3;q13.3); *RBM15-MKL1*

Provisional entity: AML with BCR-ABL1

AML with mutated *NPM1*

AML with allelic mutations of *CEBPA*

Provisional entity: AML with mutated RUNX1

CASO 2

Uomo di anni 33

Esegue esami di controllo per febbre serotina, astenia, dispnea da sforzo dopo gli allenamenti da due settimane.

Dati emocromocitometrici

Leucociti = 32520/ μ L

Hb = 15,4 g/dL

Piastrine = 208000/ μ L

Formula al microscopio

Neutrofili 6%

Linfociti 20%

Monociti 3%

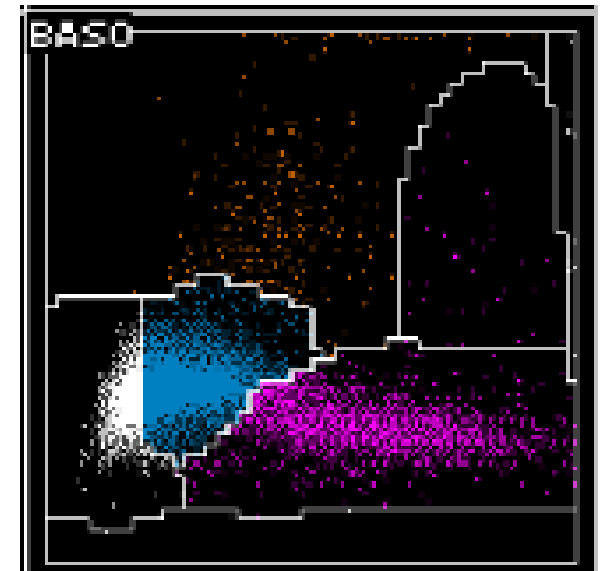
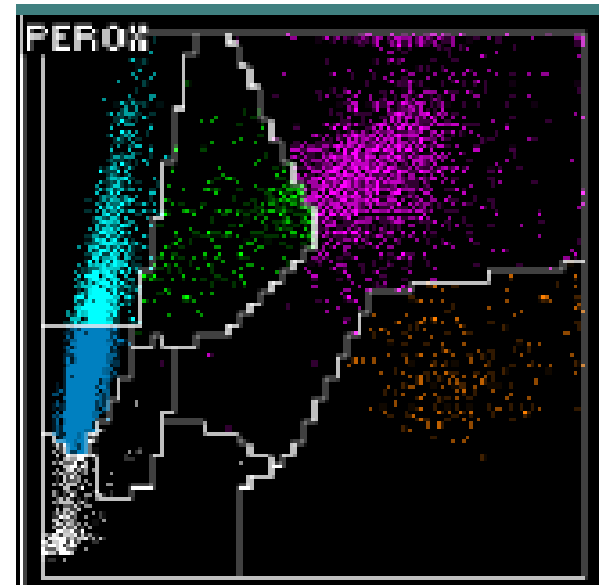
Eosinofili 3%

Basofili 0%

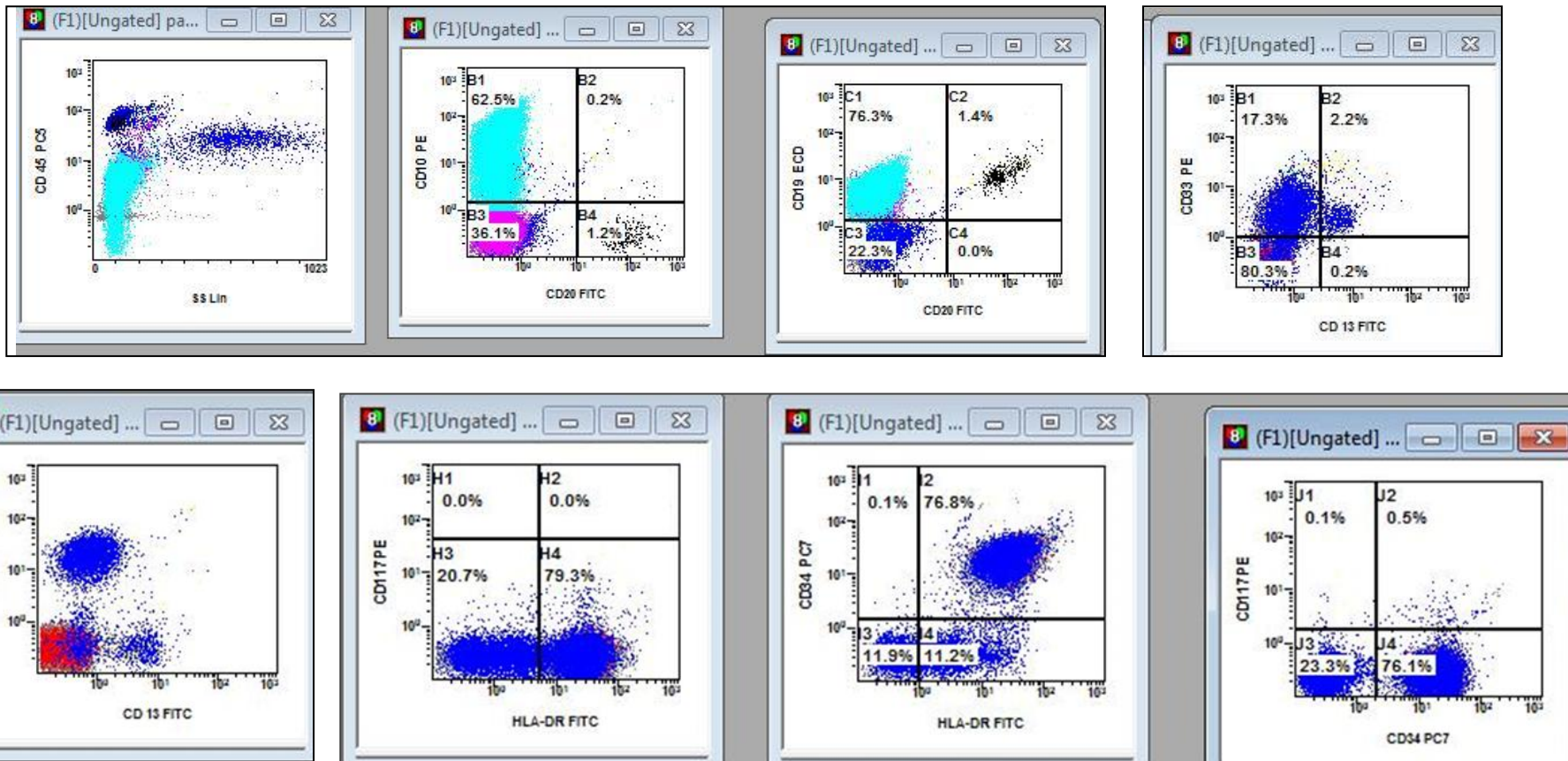
Blasti 66%

Metamielociti 1%

Mielociti 1%



Immunofenotipo su sangue periferico



Antigeni+: CD34, HLA-DR, CD19, CD10

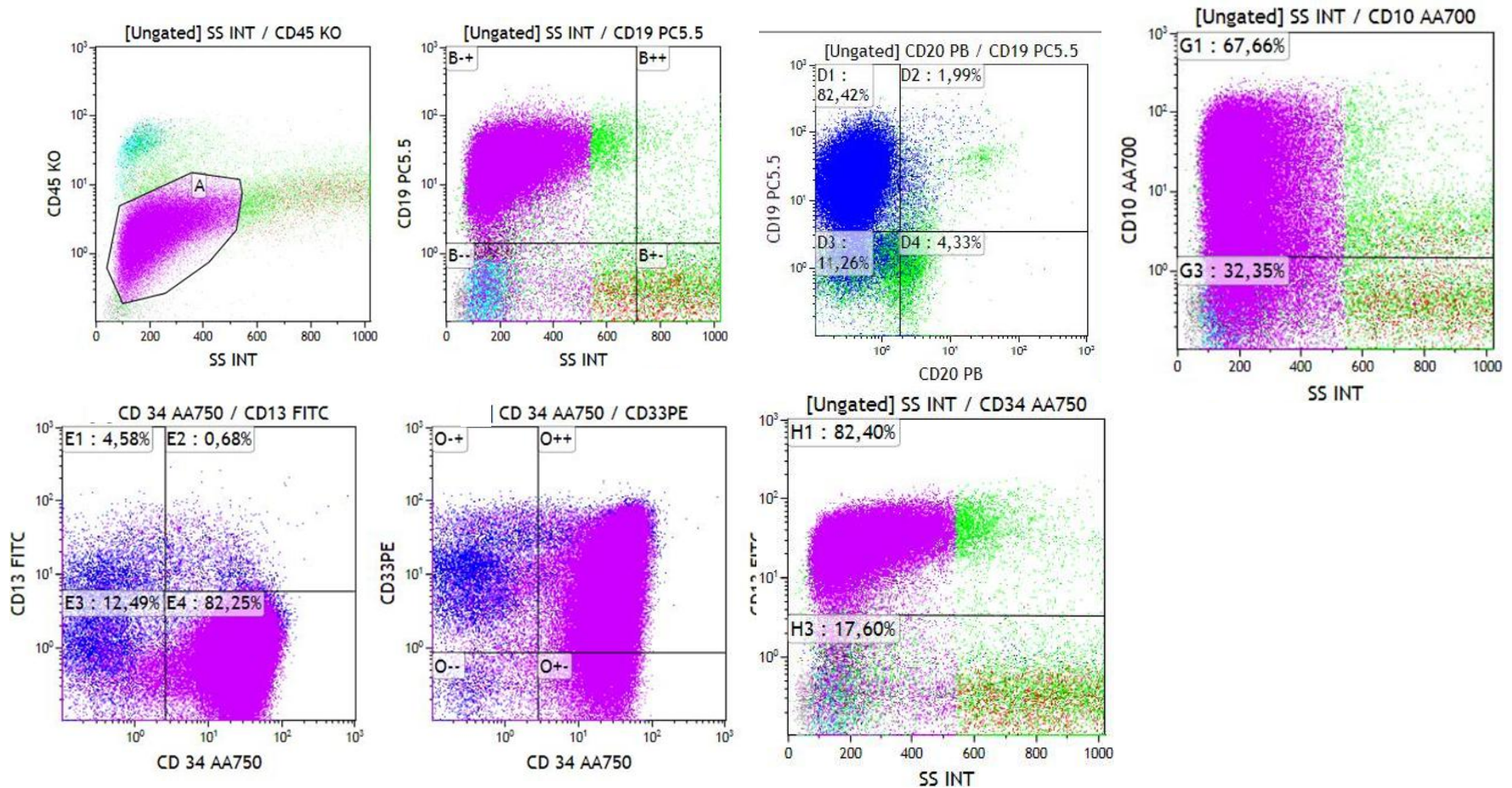
Antigeni +/-: CD45, CD33

Antigeni -: CD117, CD13, CD14, CD61, CD20, antigeni linfoidi T

Sintesi dei risultati

Blasti 70%

Immunofenotipo su sangue midollare



Sintesi dei risultati

Blasti 85%

Antigeni+: CD34, HLA-DR, CD38, CD33, CD19, CD10, TdT

Antigeni +/-: CD45, cCD79 α

Antigeni -: CD20, CD22, cIgM, cMPO, cCD3, CD1a, CD13, CD14, CD61, antigeni linfoidi T

Analisi molecolare su sangue midollare

RICERCA TRASCritto BCR ABL(LMC)

Isoforme esaminate: a2-b2, a3-b2, e1-a2

Materiale:

Sangue midollare

Trascritto BCR-ABL t(9;22)

POSITIVO

E' stata eseguita l'estrazione di RNA e l'analisi mediante Real-Time qualitativa.

L'analisi ha dimostrato la presenza di trascritto BCR-ABL.

Tipo di trascritto:

e1-a2 = 190 bp per p190

PCR QUANTITATIVA GENE BCR/ABL

Materiale:

Sangue periferico

Risultati espressi secondo l'International Scale (BCR - ABL % IS)

PCR quantitativa gene ibrido bcr-abl (mber p190)

526,100 %

Risultato della PCR quantitativa del gene bcr-abl rispetto al gene di controllo abl per 100.

Classificazione secondo WHO 2017

B-lymphoblastic leukemia/lymphoma

B-lymphoblastic leukemia/lymphoma, NOS

B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with recurrent genetic abnormalities

B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(9;22)(q34.1;q11.2):BCR-ABL1

B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(v;11q23.3);KMT2A rearranged

B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(12;21)(p13.2;q22.1); ETV6-RUNX1

B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with hyperdiploidy

B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with hypodiploidy

B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(5;14)(q31.1;q32.3) IL3-IGH

B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(1;19)(q23;p13.3);TCF3-PBX1

Provisional entity: B-lymphoblastic leukemia/lymphoma, BCR-ABL1-like

Provisional entity: B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with iAMP21

CASO 3

Donna di aa 75
Esegue la tipizzazione
linfocitaria per la
segnalazione di linfociti
atipici all'emocromo
eseguito in altra sede

Dati emocromocitometrici

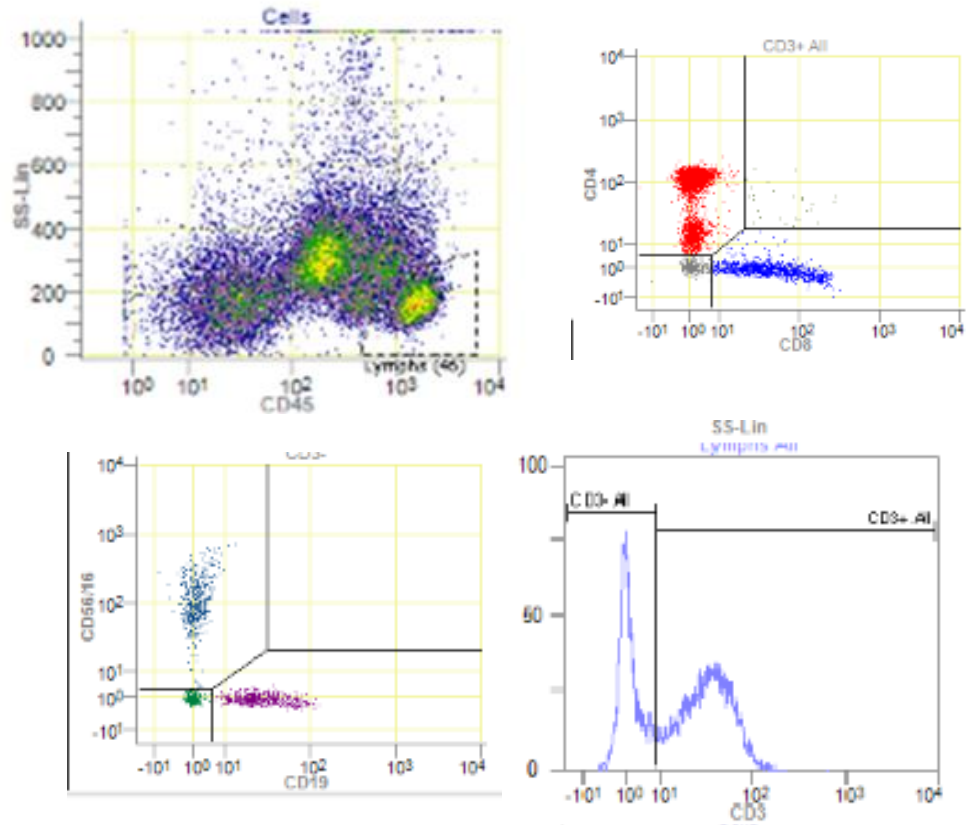
Leucociti = 5260/ μ L

Hb= 12,8 g/dL

Piastrine= 126000/ μ L

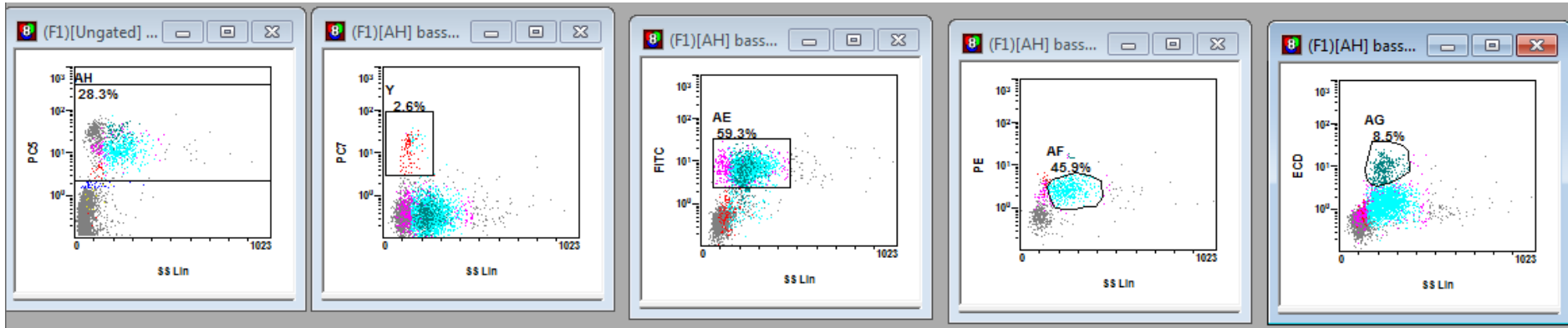
Risultati

L'analisi non evidenzia
anomalie della popolazione
linfocitaria, bensì della
linea granulocitica.



- Revisione microscopica dello striscio di SP
- Approfondimento in citofluorimetria

Approfondimento su SP



PC5 = CD45
PC7 = CD34
FITC = CD13
PE = CD33
ECD = CD14

Risultati:

- Blasti mieloidi= 2.6 %
- Alterazioni riferibili a displasia della linea granulocitica

Esame morfologico del mieloaspirato

MDS-EB-1

GRAZIE PER L'ATTENZIONE!!!!

