



Autore: Dr. Bruno Brando  
Data: 15 Maggio 2023  
Riferimento: UK NEQAS LI

**OGGETTO: Spunti e aggiornamenti dal "13° ITALIAN UK NEQAS LI USERS MEETING L'approccio di base agli schemi educazionali UK NEQAS LI per la Citometria a Flusso – Acquisire e mantenere competenza" – 30 Marzo 2023**



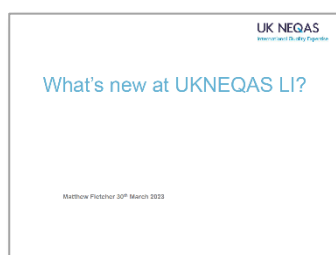
## Introduzione ai lavori

**Dr. Bruno Brando:** data la grande ricchezza di nuovi argomenti ed il crescente numero di partecipanti è stato necessario dividere il tradizionale Italian Users Meeting UK NEQAS LI in tre distinti incontri, per disporre di tutto il tempo per i necessari approfondimenti: il primo, svoltosi il 30 Marzo, dedicato alle analisi citometriche di base, un secondo previsto a fine Settembre 2023 dove verranno trattate tematiche di oncoematologia di secondo livello e l'ultimo nell'Ottobre 2023 dedicato alle indagini molecolari.

Questa suddivisione, tuttavia, non deve e non vuole essere vista come un distanziamento tra i diversi settori della diagnostica, che al contrario devono continuare a interagire e ad arricchirsi reciprocamente: è solo un modo per avere migliori e più ampi spazi di discussione.

L'incontro del 30 Marzo ha visto la partecipazione di quasi 250 utenti, in rappresentanza dei 258 laboratori iscritti in tutte le regioni italiane.

Un breve sondaggio, distribuito prima dell'incontro, ha mostrato una sostanziale soddisfazione dei partecipanti per l'attuale offerta di schemi EQA/PT e per la completezza informativa dei report, con richieste per un maggior numero di esercizi educazionali, di maggiori approfondimenti nell'ambito del monitoraggio immunologico delle componenti B linfocitarie, dei linfociti T in corso di trattamenti chemioterapici e delle immunodeficienze congenite.



## What's new at UK NEQAS LI?

**Dr. Matthew Fletcher:** il Dr. Matthew Fletcher, tra i responsabili della gestione degli schemi UK NEQAS LI molecolari della sede di Sheffield, ha presentato una dettagliata revisione delle metodologie di laboratorio che devono essere applicate nel trattamento dei campioni liofilizzati inviati, ricca di preziosi consigli, utili soprattutto nella gestione ordinaria dei campioni clinici. La sua presentazione costituisce un importante punto di riferimento per la risoluzione dei frequenti problemi di efficienza nell'estrazione degli acidi nucleici che vengono riportati da molti partecipanti. Matthew ha poi

brevemente illustrato i nuovi schemi molecolari pilota che saranno lanciati prossimamente: Malattia minima misurabile della AML, Pannelli genici della LLC, Espansione dei pannelli genici della MDS/AML, Test diagnostici delle malattie mieloproliferative croniche. Nella sua relazione si è potuto apprezzare come la struttura dei nuovi schemi sia stata fin dall'inizio allineata alle nuove classificazioni della quinta linea guida WHO, recentemente pubblicata, come ad esempio riguardo ai cambiamenti nel valore interpretativo dell'allelic ratio per FLT3. È stata infine discussa la crescente diffusione dei sistemi di analisi in Droplet Digital, che sembrano fornire prestazioni spettacolari in termini di riproducibilità e semplicità di esecuzione.



## Schema EQA/PT UK NEQAS LI per la verifica della malattia residua misurabile nel Mieloma Multiplo (PCM)

In ciascun esercizio saranno presenti tre diversi campioni: un campione di esordio (tuttavia non agli stessi livelli quantitativi di reali malattie all'esordio) assieme a due campioni di follow-up.

I due campioni di follow-up rappresentano diversi stadi di malattia misurabile registrabili in corso di trattamento, e sono diretti a valutare l'abilità di riconoscere e quantificare la condizione, da definire come percentuale di plasmacellule mielomatose sul totale della popolazione cellulare.



## Dal controllo interno di qualità ai proficiency testing

**Dr. Bruno Brando:** le normative nazionali e regionali stabiliscono una serie di obblighi per il laboratorio clinico: esecuzione regolare di controlli interni di qualità e adesione a schemi di External Quality Assessment per ogni linea analitica che generi referti. Oltre agli obblighi normativi il laboratorio è oggi tenuto a seguire la strada indicata dalla ISO15189, che pur non essendo ancora di applicazione tassativa in Italia declina una serie di azioni virtuose dirette all'ottenimento e al mantenimento dell'eccellenza prestazionale.

La qualità nel laboratorio di citometria non si limita alle sole attività strettamente analitiche, ma deve estendersi a tutta una serie di operazioni preliminari (accettazione, conformità delle richieste, aderenza ai nomenclatori tariffari) e successive all'analisi vera e propria (refertazione, annotazione e interpretazione del risultato, comunicazione col clinico richiedente). I sistemi EQA/PT UKNEQAS LI assistono il laboratorio di analisi citometriche in tutte queste fasi del processo diagnostico.



## Immune Monitoring: utilità oltre i "soliti" linfociti

**Dr.ssa Arianna Gatti:** lo schema "IMMUNE MONITORING UK NEQAS LI" tramite l'analisi dei "soliti linfociti T, B e NK" permette di individuare eventuali problematiche insite nei nostri laboratori che possono avere un impatto negativo sulla qualità del risultato prodotto e di provvedere quindi ad azioni correttive o di miglioramento che eliminino gli inconvenienti identificati. A tale scopo UK NEQAS ha introdotto il nuovo schema "CAIV-Competency

Assessment and Instrument Validation Panel" che basandosi sull'analisi dei "soliti linfociti" CD3 CD4 e CD8 fornisce un mezzo per la qualifica del personale, per il mantenimento delle competenze individuali e per la convalida di nuovi strumenti o nuovi pannelli utilizzati per il monitoraggio delle sottopopolazioni di base. Tuttavia, lo studio delle immunodeficienze primarie e/o secondarie non HIV correlate o l'analisi dell'interazione tra neoplasia e microambiente, richiede l'utilizzo di pannelli complessi che permettano di analizzare contemporaneamente molteplici subset linfocitari. Con l'ampio utilizzo dell'immunoterapia questi test sono sempre più richiesti dai clinici per il monitoraggio terapeutico ritagliato sullo specifico protocollo farmacologico. In tale contesto è in corso di definizione il nuovo schema "PLUS Immune monitoring UK NEQAS LI" che dovrà includere l'analisi di altri subset funzionali linfocitari oltre ai 'soliti' T, B e NK.



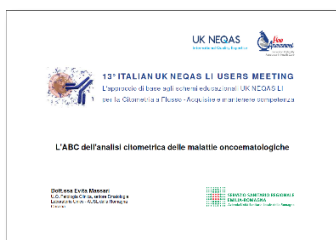
## Schema EQA/PT UK NEQAS LI per il monitoraggio immunologico e valutazione della performance del laboratorio

Il conteggio delle sottopopolazioni linfocitarie è importante in diverse condizioni, tra cui le immunodeficienze primitive (ad es. SCID-Severe Combined Immunodeficiency) o nel monitoraggio di terapie farmacologiche (ad es. Rituximab nelle malattie autoimmuni). Tuttavia, l'impiego più frequente di queste indagini è ancora quello nel monitoraggio della immunodeficienza acquisita da infezione da virus HIV. Il programma assicura la copertura delle esigenze di tutti i partecipanti, con la richiesta di identificazione e conteggio delle sottopopolazioni linfocitarie CD3+, CD3+/CD4+, CD3+/CD8+, CD19+ e CD16+/CD56+.



## Schema EQA/PT UK NEQAS LI per la valutazione immediata della correttezza del conteggio dei CD3+, CD3+CD4+ e CD3+CD8+

Il nuovo programma Competency Assessment and Instrument Validation Panel for Immune Monitoring, disponibile da Aprile 2022, è un utile strumento costituito da 6 campioni che possono venire analizzati singolarmente, in duplicati o triplicati, con predefiniti livelli di CD3+, CD3+CD4+ e CD3+CD8+ individualizzando il tipo di conteggio (percentuale, assoluto o entrambi) in funzione della routine di ciascun laboratorio. Il monitoraggio prestazionale mediante z scores verrà mostrato immediatamente al partecipante subito dopo l'inserimento dei dati. Questo programma ha lo scopo di fornire continua assistenza professionale a chi deve familiarizzare con i conteggi cellulari, in caso di problemi che generano scadenti prestazioni, durante i processi di validazione dei metodi e delle analisi strumentali.



## L'ABC dell'analisi citometrica delle malattie oncoematologiche

**Dr.ssa Evita Massari:** la presentazione è rivolta in particolare a chi si sta avvicinando al mondo della citofluorimetria oncoematologica.

Nella prima parte sono messe in luce alcune raccomandazioni metodologiche, in particolare il suggerimento di eseguire sempre preliminarmente una valutazione morfologica dei campioni che vengono processati al citofluorimetro. La morfologia del sangue periferico è utile anche se i campioni analizzati sono rappresentati da sangue midollare o liquidi cavitari, considerata l'elevata probabilità di contaminazione ematica.



La citofluorimetria oncoematologica si pone come principali obiettivi diagnostici l'assegnazione della linea di differenziazione e la discriminazione di anormali fenotipi che differiscono da un pattern normale sia per gli aspetti maturativi che per l'associazione di antigeni asincroni o aberranti.

L'introduzione della citofluorimetria multicolore ci permette di raggiungere questi obiettivi e consente di evidenziare la contemporanea presenza di popolazioni cellulari eterogenee. Bisogna tuttavia porre attenzione alla scelta delle combinazioni di marcatori e fluorocromi ed alla validazione dei pannelli.

Nella seconda parte della presentazione sono discussi alcuni casi clinici esemplificativi, che possono essere affrontati nella routine di un grande laboratorio di citofluorimetria. Quadri più o meno frequenti, per i quali sono presentate le immagini morfologiche su sangue periferico e/o midollo, l'immunofenotipo alla diagnosi, la conclusione ed i relativi riferimenti bibliografici. Per alcuni di questi sono inoltre riportati dei casi analoghi che sono stati oggetto di recenti esercizi Leukaemia Immunophenotyping.

L'ultima parte della presentazione è incentrata sulla revisione di un recente esercizio Leukaemia Immunophenotyping, dibattuto per alcuni aspetti che ne hanno evidenziato lo scopo educativo.



## **Schema EQA/PT UK NEQAS LI per la fenotipizzazione e interpretazione diagnostica delle leucemie**

Il programma è concepito per simulare in modo realistico l'iter diagnostico morfologico e immunofenotipico delle emopatie maligne. Chi è registrato per la Prima Parte dell'esercizio viene automaticamente iscritto anche per la Seconda Parte ed è tenuto a fornire le risposte a entrambe le sezioni.



### **L'approccio citometrico alle analisi cellulari in condizioni "difficili"**

**Prof. Francesco Buccisano:** il laboratorio di citometria può spesso trovarsi ad analizzare campioni che presentano elevate difficoltà dal punto di vista tecnico-analitico, interpretativo per la rarità della patologia o clinicamente critici per la scarsità e non ripetibilità del campione. Queste sfide possono mettere a dura prova l'abilità tecnica del citometrista, ma sono oggi affrontabili con grande sicurezza, a patto di applicare con rigore i protocolli analitici, le linee-guida e le raccomandazioni delle società scientifiche. La prima e più frequente sfida è quella dell'analisi degli "eventi rari", in cui gli

elementi cellulari significativi stanno al disotto dello 0,1% fino allo 0,001% o meno ancora. La tecnica di analisi degli eventi rari è oggi di enorme importanza per la definizione della malattia minima misurabile in molte patologie oncoematologiche. Per queste analisi, sempre più frequentemente richieste, esistono ormai indicazioni molto standardizzate, che consentono analisi attendibili e di alto valore diagnostico. Sono stati descritti in dettaglio gli esperimenti di standardizzazione multicentrici eseguiti dall'European Leukemia Net in collaborazione con UK NEQAS LI. Una condizione del tutto particolare, di analisi di eventi 'scarsi' più che 'rari' è l'analisi del liquor, spesso sede di colonizzazione occulta nel follow-up clinico dei linfomi e delle leucemie acute. Il protocollo ESCCA/ISCCA pubblicato nel 2020 costituisce oggi la linea guida più aggiornata per questa delicata e critica analisi diagnostica. Una patologia di raro riscontro, come l'emoglobinuria parossistica notturna - PNH - è stata oggetto di un intenso lavoro di standardizzazione, che permette anche al laboratorio meno esperto di eseguire con sicurezza analisi di screening di elevata sensibilità, specie per l'identificazione di piccoli cloni.



## **Schema EQA/PT UK NEQAS LI per la diagnostica dell'Emoglobinuria Parossistica Notturna (PNH)**

Il programma è utilizzabile solo dai centri che eseguono la diagnosi in citometria a flusso, e non è adatto per sistemi diagnostici alternativi. Ai partecipanti viene chiesto di identificare e riportare la percentuale dei cloni PNH eritrocitari (totale, di Tipo II e di Tipo III) e dei cloni granulocitari e monocitari. Gli invii possono includere campioni normali (0% PNH), campioni che richiedono alta risoluzione citometrica (con cloni PNH da 0,01% a 1%) e campioni 'classici' (con cloni PNH > 1%).



## **Schema EQA/PT UK NEQAS LI per la verifica della malattia residua misurabile nella Leucemia Acuta Linfoblastica (ALL)**

Questo programma distribuisce campioni per la determinazione del livello di MRD in citometria a flusso in pazienti con ALL. I campioni non sono adatti all'analisi della MRD con metodi molecolari.

Vengono inviati un campione rappresentativo della malattia all'esordio e due campioni che riflettono il follow-up dello stesso paziente in due diversi momenti del suo iter clinico. Ai partecipanti viene chiesto di riportare il livello di MRD nei due campioni di follow-up come percentuale dei leucociti totali.



## **Schema EQA/PT UK NEQAS LI per la verifica della malattia residua misurabile nella Leucemia Linfatica Cronica (CLL)**

Questo programma pilota distribuisce campioni per la determinazione del livello di MRD in citometria a flusso in pazienti con CLL. I campioni non sono adatti all'analisi della MRD con metodi molecolari. Ogni invio include due campioni di follow-up di un caso con nota CLL, rappresentativi di prelievi effettuati in momenti diversi dell'iter clinico. Ai partecipanti viene chiesto di riportare il livello di MRD nei due campioni di follow-up come percentuale dei leucociti totali.



## **Schema EQA/PT UK NEQAS LI per la verifica della malattia residua misurabile nella Leucemia Mieloide Acuta (AML)**

Questo programma pilota distribuisce campioni per la determinazione del livello di MRD in citometria a flusso in pazienti con AML. I campioni non sono adatti all'analisi della MRD con metodi molecolari. Ogni invio include un campione di riferimento, rappresentativo del fenotipo della malattia all'esordio e due campioni di follow-up, che simulano prelievi effettuati in momenti diversi dell'iter clinico.

Seguiranno a stretto giro maggiori informazioni riguardo i prossimi eventi (sia italiani che inglesi).

La partecipazione ed il confronto tra colleghi devono necessariamente continuare ad essere il motore principale di questi congressi

Dr. Bruno Brando  
Referente scientifico UK NEQAS for Leucocyte Immunophenotyping



**CASELLA DI POSTA PER INFORMAZIONI SCIENTIFICHE:** [supporto.tecnico@flowassessment.it](mailto:supporto.tecnico@flowassessment.it)

### **Presentazioni 13° ITALIAN UK NEQAS USERS MEETING**

**L'approccio di base agli schemi educazionali UK NEQAS LI per la Citometria a Flusso – Acquisire e mantenere competenza**

Le presentazioni sono disponibili online e scaricabili dal sito di FLOW ASSESSMENT



[www.flowassessment.it](http://www.flowassessment.it) -> EVENTI -> ARCHIVIO EVENTI -> UK NEQAS LI – 13° UK NEQAS LI USERS MEETING -> PRESENTAZIONI

**Link:** <https://www.flowassessment.it/presentazioni-webinar-13-italian-uk-neqas-li-users-meeting/>

**PASSWORD: WEBINAR23**