



Newsletter

UK NEQAS
International Quality Expertise

Autore: Dr. Bruno Brando
Data: 16 Novembre 2023
Riferimento: UK NEQAS LI

OGGETTO: Spunti e aggiornamenti dal "13° ITALIAN UK NEQAS LI USERS MEETING L'integrazione tra Citometria e Diagnostica Molecolare" – 16 Novembre 2023

Presentazioni 13° ITALIAN UK NEQAS LI USERS MEETING L'integrazione tra Citometria e Diagnostica Molecolare

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



www.flowassessment.it -> EVENTI -> ARCHIVIO EVENTI -> UK NEQAS LI – 13° UK NEQAS LI USERS MEETING - L'integrazione tra Citometria e Diagnostica Molecolare -> PRESENTAZIONI
Link: <https://www.flowassessment.it/eventi/uk-neqas-li-13-uk-neqas-li-users-meeting-integrazione-tra-citometria-e-diagnostica-molecolare/>

PASSWORD: WEBINAR23



Introduzione ai lavori - B. Brando:

Nell'ultimo anno UK NEQAS LI ha prodotto una notevole quantità di materiale didattico e di aggiornamento scientifico di alto livello, liberamente accessibile. Ricordo il webinar del 4 Ottobre 2022 sulla MRD nella AML, con ben 12 presentazioni visibili su YouTube; la serie di quattro webinar Flow Cytometry Hot Topics, anch'essa presto disponibile su YouTube, e il lavoro su Blood Advances oggetto della successiva presentazione. Oltre a ciò, Flow Assessment ha segnalato e reso disponibili altri importanti lavori scientifici

sulla revisione delle indagini molecolari nella LMC e sull'analisi delle popolazioni B linfocitarie in corso di trattamento con Rituximab. Presentazioni recenti su aggiornamenti nella diagnosi di PNH sono inoltre scaricabili. Flow Assessment sostiene i corsi di citometria ISCCA (Urbino 10-12 Dicembre 2023), per la formazione di base di coloro che si avvicinano per la prima volta alla citometria a flusso.



Risultati dello Studio Multicentrico UK NEQAS LI sulla MRD di AML con Tecniche Molecolari - B. Brando:

Il lavoro recentemente pubblicato da Stuart Scott, responsabile dei programmi di diagnostica molecolare di UK NEQAS LI (Blood Adv 2023; 7(14): 3686-3694) ha studiato la fattibilità di studi multicentrici sulla MRD di AML in biologia molecolare. Nella estrema eterogeneità mutazionale della AML, solo alcune varianti si sono dimostrate utilizzabili per gli studi di MRD: RUNX1::RUNX1T1, CBFB::MYH11, CBFA2T3-GLIS2, PML::RARA, NPM1 tipo A

Esone11 e pochissime altre. Lo studio ha impiegato linee cellulari liofilizzate portatrici delle mutazioni da identificare e quantificare ad alta risoluzione (Neg, Low e High), diluite in una linea-matrice negativa. Venivano inoltre forniti scenari clinici teorici per associare il risultato di laboratorio ad una specifica condizione da includere nel referto. In breve, lo studio si è dimostrato fattibile e globalmente soddisfacente (75% di risposte corrette). Tuttavia, dal 4,5 all'8,7% di falsi negativi erano osservabili per 3 mutazioni su 4 a livello 'Low' e ben il 26,1% di falsi negativi era presente per i campioni negativi per NPM1. I numerosi aspetti metodologici e clinici di questo studio, liberamente scaricabile, sono discussi in dettaglio e costituiscono una solida base educativa e di riflessione per l'utilizzo pratico di questa delicata procedura, ancora in fase di assestamento e revisione continua.



Schema EQA/PT UK NEQAS LI per la verifica della Malattia residua misurabile per Neoplasie Linfoide con metodi molecolari

UK NEQAS LI ha lanciato nuovo programma pilota per valutare la capacità dei laboratori di identificare e quantificare i riarrangiamenti di IgH, IgK e IgL in un contesto di analisi di MRD nelle malattie linfoproliferative croniche, per la valutazione delle modifiche indotte dal trattamento. Lo schema prevede inizialmente un solo invio per anno, costituito da quattro campioni: un campione di DNA diagnostico per identificare il clonotipo target, e tre campioni cellulari liofilizzati, di cui due MRD-positivi ed uno MRD-negativo.

Non accontentarti della qualità per crescere ... cresci in formazione per crescere in qualità!



Lo schema Myeloid Gene Panels: Utilità e Informazioni - E. Ronda:

La relazione presentata si è focalizzata su quattro argomenti: una breve introduzione in merito all'utilità clinica dei dati derivati dall'analisi NGS, come la profilazione genomica ha influenzato la conoscenza delle neoplasie mieloidi, dettagli del trial Myeloid Gene Panels ed infine a conclusione un breve commento sull'interpretazione e refertazione dei risultati NGS. Allo scopo di integrare in maniera responsabile ed efficace la genomica nelle politiche della sanità pubblica e nella pratica clinica, sono state predisposte una serie di azioni per valutare l'appropriatezza del suo utilizzo e contribuire

alla realizzazione di raccomandazioni e linee-guida. In molti di questi documenti emerge l'imprescindibilità di effettuare verifiche interne ed esterne di qualità dei test (EQA) non solo a garanzia dei laboratori erogatori ma anche come requisito riportabile nel referto. Nel caso delle neoplasie mieloidi la profilazione genomica è entrata in pratica clinica grazie all'ampia diffusione delle analisi NGS ed è rivolta a scopi di diagnosi e classificazione, di definizione di marker prognostici, target terapeutici e marker monitorabili in follow-up. Sono state elencate le più recenti raccomandazioni WHO ed ICC e le linee guida ELN che descrivono il ruolo di numerosi target genetici. In questo panorama lo schema Myeloid Gene Panels consente ai laboratori partecipanti non solo un esercizio tecnico-metodologico ma anche un approfondimento e studio dei geni coinvolti nei disordini mieloidi e di definirne il livello di utilità clinica. Questi aspetti sono infine parte integrante del referto; diverse evidenze raccomandano di riportare non solo le definizioni e limiti del metodo analitico ma anche una chiara e precisa classificazione delle varianti in relazione al contesto clinico. Nonostante le recenti raccomandazioni la rilevanza clinica di alcuni geni e le modalità di refertazione delle analisi NGS rimane una discussione ancora aperta.



Schema EQA/PT UK NEQAS LI di biologia molecolare per lo studio dei pannelli genetici per la Leucemia Mieloide Acuta

Questo programma è diretto prevalentemente agli utilizzatori di pannelli in Next Generation Sequencing (NGS) per la diagnosi e la classificazione prognostica della AML. Ogni esercizio contiene un campione di AML o di una linea cellulare, nel quale i partecipanti dovranno valutare e riportare con i propri sistemi in-house ogni alterazione genica o regolatoria di significato patologico, come mutazioni puntiformi, micro-inserzioni, delezioni e duplicazioni.



Le Leucemie Mieloidi Core Binding Factor: Associazioni Fenotipiche e Molecolari - Dr.ssa A. Gatti:

Le AML Core Binding Factor (CBF) sono caratterizzate dalla presenza dei geni di fusione RUNX1::RUNX1T1 (AML1/ETO) e CBFb/MYH11, derivanti dalle rispettive alterazioni citogenetiche t(8;21) e inv(16). Costituiscono il 12-15% di tutte le AML, hanno globalmente una buona prognosi a breve termine ma tendono a recidivare nel tempo. In entrambe le forme è possibile l'analisi della

MRD sia con metodo molecolare che in citometria a flusso ad alta sensibilità. Malgrado la comune categorizzazione le due forme sono molto differenti: la t(8;21) è morfologicamente una AML con differenziamento, esprime CD56 e CD19, ha una maggiore aggressività e una prognosi peggiore; la inv(16) è più spesso una forma mielomonocitica con eosinofilia, senza ricorrenti aberrazioni fenotipiche. Entrambe le forme presentano tuttavia ampia eterogeneità fenotipica nel proprio ambito. E' in corso di completamento un trial multicentrico italiano sul trattamento delle AML CBF con aggiunta di Midostaurina, nel quale viene confrontata l'analisi della MRD con metodo citometrico e molecolare. La correlazione tra i due metodi sembra debole nelle forme RUNX1::RUNX1T1, mentre risulta migliore in quelle CBFb/MYH11. Questo dimostra una sostanziale complementarità tra le due tecniche di analisi, che si giovano entrambe del supporto di sistemi di controllo EQA diretti alla sempre maggiore affidabilità e standardizzazione.



Highlights da ESCCA 2023: Non solo Flow - Dr.ssa E. Massari:

La presentazione riprende alcune tematiche discusse nel recente convegno ESCCA tenutosi ad Utrecht nel mese di settembre 2023. La prima parte è incentrata sui concetti di standardizzazione ed armonizzazione in citofluorimetria, che sono stati oggetto di un'intera sessione del congresso, ed in particolare sul loro ruolo nella valutazione della MRD. Tuttavia, il raggiungimento di una standardizzazione è difficile, se consideriamo anche la complessità delle classificazioni ICC e WHO aggiornate nel corso del 2022: su queste si concentra la seconda parte della presentazione, in particolare

sulle principali novità che coinvolgono anche l'analisi citofluorimetrica. L'ultima parte si focalizza su due importanti aggiornamenti presentati ad ESCCA 2023: una recentissima scoperta sul ruolo del recettore IL-7Ra nell'ambito della SCID, ed il potenziale supporto dell'analisi citofluorimetrica del C3d nei pazienti EPN resistenti alla terapia con inibitori del complemento e con emolisi extravascolare. Il processo di integrazione delle tecniche citofluorimetriche e molecolari deve tenere conto delle linee guida e delle classificazioni in continuo aggiornamento, senza mai perdere di vista le implicazioni ed i progressi in ambito clinico.



Varianti Minori della BCR-ABL1 - Dr.ssa E. Toffoletti:

Il gene di fusione BCR::ABL1 è il risultato di una traslocazione bilanciata t(9;22)(q34;q11), nota da tempo come cromosoma Philadelphia. Questa traslocazione si ritrova in oltre il 97% delle leucemie mieloidi croniche e in una piccola percentuale di leucemie linfoblastiche dell'adulto e del bambino. Produce una proteina con alta attività tirosino-chinasica, che svolge un ruolo patogenetico nello sviluppo delle malattie e che costituisce il bersaglio delle terapie con inibitori specifici. Sono stati nel tempo individuati diversi possibili punti di rottura nei processi che generano BCR::ABL1. Da qui derivano un gran numero di diversi trascritti, distinti in

maggiori, minori e atipici, con diverse frequenze e variabile impatto prognostico. E' molto importante focalizzare le indagini di laboratorio su queste varianti minori, poiché ancora poco studiate, ma di grande importanza ai fini delle prospettive di trattamento. Lo studio delle varianti minori di BCR::ABL1 è tuttavia condizionato, oltre che dalla loro rarità, dalla scarsità di linee-guida chiare e di kit diagnostici commerciali. Le raccomandazioni in proposito sono di caratterizzare sempre l'esatto trascritto all'esordio mantenendo sempre la stessa metodica durante il follow-up e facendo riferimento al dato quantitativo all'esordio. UK NEQAS LI ha recentemente lanciato un programma pilota, accreditato ISO17043 dall'anno prossimo, per l'identificazione e quantificazione della variante minore p190 (e1a2), che attualmente interessa circa 100 partecipanti. I primi studi mostrano un alto grado di dispersione dei risultati quantitativi, derivanti dalla grande eterogeneità dei metodi impiegati.



Schema EQA/PT UK NEQAS LI di biologia molecolare per lo studio quantitativo dei trascritti minori di BCR/ABL1

I riarrangiamenti di BCR-ABL1 al punto di rottura minore (m-BCR) che portano alla produzione della proteina di fusione p190 sono associati con frequenza a leucemie acute linfoblastiche (ALL) Philadelphia Positive e ad un piccolo gruppo di leucemie mieloidi croniche (CML). La quantificazione dei livelli di espressione dei trascritti minori di BCR-ABL1 è usata per valutare la risposta di questi pazienti al trattamento e per monitorare l'eventuale recidiva di malattia. Nel materiale inviato per questo esercizio vanno identificati e quantificati i trascritti minori di BCR-ABL1, espressi come percentuale rispetto al gene di controllo. Nell'esercizio sono richiesti i dettagli della metodologia

La partecipazione ed il confronto tra colleghi devono necessariamente continuare ad essere il motore principale di questi incontri, sia con modalità a distanza che in presenza.

Dr. Bruno Brando

Referente scientifico UK NEQAS for Leucocyte Immunophenotyping



CASELLA DI POSTA PER INFORMAZIONI SCIENTIFICHE: supporto.tecnico@flowassessment.it