



# Invito alla lettura

a cura del Gruppo Aggiornamento e Formazione

 Hematology, ASH Education Program

## When does a PNH clone have clinical significance?

Daria V Babushok

Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2021 Dec 10;2021(1):143-152.doi: 10.1182/hematology.2021000245

L'Emoglobinuria Parossistica Notturba (PNH) è un raro disordine ematologico acquisito della cellula staminale emopoietica. Insorge come conseguenza dell'espansione clonale non maligna di una o più cellule staminali che hanno acquisito una mutazione a carico del gene PIG-A, localizzato sul cromosoma X. Tali mutazioni sul gene PIG-A hanno come conseguenza la mancata formazione dell'ancora GPI e l'impossibilità a molte proteine di legarsi alla membrana. La PNH è considerata come una delle sindromi da insufficienza midollare come l'anemia aplastica (AA) e le sindromi mielodisplastiche che hanno in comune un midollo ipoplastico ed ematopoiesi clonale. La diagnosi di PNH rimane una diagnosi clinica. Necessita, tuttavia, della documentata assenza parziale o totale di molecole GPI linked sulla membrana plasmatica di almeno due linee cellulari. La metodica "gold standard" per l'individuazione del clone PNH è la Citometria a flusso che grazie all'approccio multiparametrico e all'ampia disponibilità di marcatori, consente di valutare su più linee cellulari più proteine "GPI-linked" contemporaneamente. La valutazione del significato clinico di un clone PNH rimane più sfumata poiché l'interpretazione dei risultati richiede una comprensione della patogenesi della PNH e della sua relazione con l'insufficienza midollare. Solo circa un terzo dei pazienti con cloni PNH presenta una malattia "PNH classica" ossia con emolisi conclamata e con sintomi correlati. I pazienti con "PNH classica" traggono il massimo beneficio dagli inibitori del complemento. Al contrario, due terzi dei cloni PNH individuati, si osservano in pazienti la cui manifestazione clinica è quella di un'insufficienza midollare con pochi o nessun sintomo correlato ma associabile alla dimensione del clone. Sebbene si verificano delle eccezioni, i pazienti con insufficienza midollare, di solito, hanno cloni PNH subclinici più piccoli. Questa revisione affronta gli scenari comuni che si presentano nella valutazione del significato clinico dei cloni PNH individuati e fornisce linee guida pratiche per avvicinarsi a un paziente con un risultato positivo per PNH.

**Rachele Amodeo**

rachele.amodeo@ospedalesantandrea.it

 Cancer Medicine

## A new score including CD43 and CD180: Increased diagnostic value for atypical chronic lymphocytic leukemia

Li Y, Tong X, **Huang L**, Li L, Wang C, He C, Liu S, Wang Z, Xiao M, Mao X, Zhang D.

Cancer Medicine 2021 Jul;10(13):4387-4396. doi: 10.1002/cam4.3983.

La Leucemia Linfatica Cronica (LLC) è una delle più comuni patologie linfoproliferative coinvolgente i linfociti di tipo B ed è il disordine linfoproliferativo che maggiormente si avvale dello studio immunofenotipico mediante Citometria a flusso per la sua diagnosi. Nel 1994 Matutes et al. proposero uno score citometrico basato sull'espressione di cinque marcatori (CD5, CD23, CD22, FMC7 ed immunoglobuline di superficie) sensibile e potenzialmente capace di discriminare la leucemia linfatica cronica da altri disordini linfoproliferativi. Nel 1997 Moreau EJ et al. hanno migliorato la sensibilità di questo score introducendo l'anticorpo monoclonale CD22 al posto del CD79b. Recentemente un nuovo punteggio diagnostico "CLL flow Score" ha introdotto ulteriori accorgimenti al fine di migliorarne l'accuratezza. Questi score, con i limiti che caratterizzano tutti i punteggi diagnostici, sono importanti nella diagnostica immunofenotipica della LLC. Lo scopo di questo lavoro è di introdurre un nuovo score maggiormente rispondente alle esigenze diagnostiche soprattutto della popolazione asiatica. Gli anticorpi monoclonali utilizzati da Yi Li e collaboratori in questo nuovo score LLC sono il CD43, CD200, FMC7, CD79b e CD180. La peculiarità che ha attirato la mia attenzione è la sostituzione del CD5 e del CD23 (anticorpi cardine della nostra indagine fenotipica) con il CD43 ed il CD180. Questo score proposto da Yi Li ha una sensibilità del 91,8% ed una specificità dell'83,1%. Il nuovo score LLC ha mostrato una migliore sensibilità rispetto al punteggio di Moreau e al punteggio CLL flow, rispettivamente del 41,2% e del 47,1%. La sensibilità risulta del 61,4% e del 64,9% se si applica questo score al gruppo di pazienti con LLC atipica. Gli autori concludono che tale score da loro proposto ha contribuito, insieme a tecniche morfologiche e molecolari, alla diagnostica differenziale tra LLC e sindromi linfoproliferative diverse, soprattutto in pazienti cinesi con immunofenotipo atipico.

Punto di riflessione: Il fatto che in Cina la sostituzione di due monoclonali cardine dell'immunofenotipo routinariamente utilizzato in Europa dia un eccellente risultato diagnostico può essere determinato da un'eterogeneità della LLC frutto dell'interazione di un corredo genetico diverso con differenti fattori ambientali?

*Buona lettura*

**Giuseppe Coppola**

giuseppe.coppola@sangiovannieruggi.it

### **Multiparameter Flow Cytometry Applications in the Diagnosis of Mixed Phenotype Acute Leukemia**

Anna Porwit and Marie C. Béné

Cytometry Part B (Clinical Cytometry) 96B:183–194 (2019), DOI: 10.1002/cyto.b.21783

In questo lavoro emerge l'importanza di allestire un pannello citometrico molto ampio, che comprenda tutti i marcatori indispensabili per identificare il lineage cellulare, le infedeltà di linea, l'espressione di molecole mature su cellule immature, al fine di effettuare una diagnosi ematologica ottimale. In particolar modo, gli autori si sono soffermati sulla diagnosi delle leucemie acute a fenotipo misto (MPAL). Le leucemie acute a fenotipo misto rappresentano un raro sottogruppo di leucemie acute con prognosi infausta. La morfologia e la citometria riconoscono due tipi di MPAL:

- le leucemie bilineari caratterizzate dalla coesistenza di due popolazioni di blasti differenti;
- le leucemie bifenotipiche caratterizzate da un'unica popolazione di blasti che coesprime markers appartenenti a diversi lineage.

Le MPAL rappresentano circa il 2% delle leucemie acute, con un'incidenza di 0,35 per milione di abitanti. Raccomandazioni internazionali per eseguire l'immunofenotipizzazione delle leucemie concordano che dovrebbero essere inclusi, per la diagnosi, marcatori di tutte le linee ematopoietiche, anche quando la morfologia o altre caratteristiche cliniche suggeriscono fortemente un tipo specifico di leucemia. Questo è importante per non fallire nella diagnosi di una MPAL. La mieloperossidasi (MPO) rimane il marcatore più importante per confermare il lineage mieloide. La WHO ha sottolineato la possibilità di fare diagnosi di MPAL, anche in assenza dell'espressione dell' MPO, tenendo conto della presenza di una forte espressione di altri marcatori mieloidi come CD117, CD33 e/o CD13 o marcatori della linea monocitica (CD11c, CD14, CD64). Il CD19 è il più importante marcatore per confermare il lineage B. Se il CD19 è fortemente espresso, è sufficiente la presenza soltanto di un altro marcatore della linea B, CD79a citoplasmatico, CD22 citoplasmatico o di superficie, CD10 di superficie; se il CD19 è espresso debolmente, almeno altri due marcatori del lineage B devono essere coespressi. La situazione è molto più semplice per l'attribuzione del lineage T, grazie all'eccellente specificità dell'espressione citoplasmatica del CD3.

Le MPAL B/Mieloidi sono le più frequenti, seguite dalle T/Mieloidi, mentre sono molto rare le MPAL a Triplo lineage e le B/T MPAL. Per quanto riguarda la rarità di questa malattia, è del tutto possibile che l'uso di pannelli o combinazioni immunofenotipiche troppo restrittive riduca la sensibilità della loro rilevazione. Potrebbe essere che alcune leucemie acute classiche poco responsive alla chemioterapia, siano in realtà MPAL non identificate, bifenotipiche o bilineari.

**Giulia Scalia**

scalia@ceinge.unina.it

### **Single antibody detection of T cell Receptor $\alpha\beta$ clonality by flow cytometry rapidly identifies mature T cell neoplasm and monotypic small CD8 positive subsets of uncertain significance**

Min Shi 1 et Al.

Cytometry part B (clinical cytometry) 98B:99-107 (2020), DOI: 10.1002/cyto.b.21782

Invito alla lettura di questo interessante articolo in quanto per anni (nonostante la sterminata letteratura), la variabilità dei fenotipi e quindi la mancanza di caratteristiche univoche per i diversi linfomi T maturi, hanno reso arduo il compito del citofluorimetrista nella scelta dei “pannelli” applicativi. Numerosi linfomi T a fenotipo maturo, senza atipie fenotipiche e con scarsa massa (ematica o tissutale) possono tranquillamente sfuggire alle indagini immunologiche con frustrazione del citometrista che non è in grado di supportare o confermare il sospetto. Mentre per i linfomi B la presenza di una clonalità è quasi sempre evidenziabile attraverso l'esame delle catene leggere e pesanti delle immunoglobuline, nei linfomi T l'indagine andrebbe rivolta verso la ricerca di un riarrangiamento del T-Cell Receptor (TCR), fattibile in biologia molecolare, ma incline a risultati falsi positivi nel contesto di un normale invecchiamento e di un'ampia varietà di condizioni infiammatorie benigne. La recente applicazione di NGS (next generation sequencing) nel riarrangiamento TCR è molto utile ma altamente complessa, costosa, e non applicabile facilmente nella pratica di routine laboratoristica. I fenotipi dei linfomi T periferici non presentano caratteristiche peculiari che li discriminino dal fenotipo dei linfociti T normali. Pertanto, la popolazione neoplastica bisogna “andare a cercarla”. Recentemente, lo screening con l'anticorpo monoclonale JOVI-1 permette di individuare con alta specificità la regione costante della catena beta (TRBC1) del TCR, semplificando l'immunofenotipo delle malattie T clonali, con un approccio simile all'individuazione delle cellule B clonali tramite Kappa e Lambda.

**Anna Maria Santonocito**

anna.santonocito12@gmail.com