



**PSDTA Mieloma Multiplo**

## **Allegato 1 : Analisi citofluorimetrica alla diagnosi di mieloma multiplo**

**A cura del Gruppo di Studio Mieloma Multiplo  
Rete Oncologica Piemonte e Valle d'Aosta**

**Anno di pubblicazione 2022**

L'esame citofluorimetrico viene eseguito per tutti i pazienti con riscontro di nuova diagnosi di Mieloma Multiplo (asintomatico e sintomatico) indipendentemente dall'età, su campione di sangue midollare per determinare la presenza dei marcatori di malattia, e nei pazienti alla recidiva di malattia a giudizio del curante se ritenuto utile per la conferma della progressione.

I laboratori nella regione Piemonte che eseguono l'immunofenotipo alla diagnosi (XXXX) utilizzano la seguente istruzione operativa:

- **ISTRUZIONE OPERATIVA MIELOMA-DIAGNOSI**

In laboratorio devono pervenire almeno 1 provetta di sangue midollare intero, preferibilmente con anticoagulante EDTA, il campione va processato entro 24-48 ore dal prelievo.

Eseguire il conteggio dei leucociti totali con un analizzatore contaglobuli

Per ogni campione allestire 2 tubi con i seguenti anticorpi mandatori:

**Tube 1:** CD45, CD38, CD138, CD56, CD19 (CD117 opzionale)

**Tube 2:** CD45, CD38, CD138, CD56, CD19, cytoplasmatic Kappa, cytoplasmatic Lambda.

Se la cellularità è >15.000 WBC/uL, diluire il campione con PBS/BSA 0,5% (in alternativa soluzione fisiologica, Isoflow, FacsFlow), in modo da ottenere una concentrazione cellulare di  $1,5 \times 10^6$  cellule per tubo, con volume massimo 100uL.

Se la cellularità è <10.000 WBC/uL, prelevare 100uL in toto di campione dalla provetta madre, per ciascun tubo.

#### **TUBE 1**

Marcare il campione di sangue midollare con gli anticorpi monoclonali del proprio pannello.

Incubare 15' al buio a temperatura ambiente

Aggiungere alle provette 3 mL di lisante al Cloruro d'Ammonio o equivalenti

Vortexare

Incubare per 15' al buio a temperatura ambiente

Centrifugare per 5' a 1500 rpm

Decantare

Aggiungere alle provette 3 mL di PBS/BSA 0,5% (in alternativa soluzione fisiologica, Isoflow, FacsFlow)

Centrifugare per 5' a 1500 rpm

Decantare

Aggiungere alle provette 200uL di PBS/BSA 0,5% (in alternativa soluzione fisiologica, Isoflow, FacsFlow)

Conservare a +4°C fino all'acquisizione

#### **TUBE 2 Determinazione delle catene leggere intracitoplasmatiche**

Mettere gli anticorpi monoclonali contro gli antigeni di superficie

Aggiungere il campione nelle provette, secondo la formula sopra descritta per ottenere  $1,5 \times 10^6$  cellule per tubo

Vortexare o agitare bene le provette

Incubare per 15' al buio a temperatura ambiente

Aggiungere alle provette 3 mL di PBS/BSA 0,5% (in alternativa soluzione fisiologica, Isoflow, FacsFlow)

Centrifugare per 5' a 1500 rpm

Decantare

Aggiungere 100uL di reagente 1 Fissativo

Vortexare

Incubare 15' al buio a temperatura ambiente

Aggiungere alle provette 3 mL di PBS/BSA 0,5% (in alternativa soluzione fisiologica, Isoflow, FacsFlow)

Centrifugare per 5' a 1500 rpm

Decantare

Aggiungere 100uL di reagente 2 Permeabilizzante + anticorpi monoclonali coniugati diretti contro le catene

leggere intracitoplasmatiche di tipo kappa e lambda

Vortexare

Incubare 15' al buio a temperatura ambiente

Aggiungere alle provette 3 mL di PBS/BSA 0,5% (in alternativa soluzione fisiologica, Isoflow, FacsFlow)

Centrifugare per 5' a 1500 rpm

Decantare

Aggiungere alle provette 200µL di PBS/BSA 0,5% (in alternativa soluzione fisiologica, Isoflow, FacsFlow)

Conservare a +4°C sino all'acquisizione

- **ANALISI CITOFUORIMETRICA PER LA VALUTAZIONE DELLA MALATTIA MINIMA RESIDUA NEL MIELOMA MULTIPLA E LA CONFERMA DELLA REMISSIONE COMPLETA**

La valutazione della malattia minima residua (MMR) si è dimostrata utile a scopo prognostico per i pazienti che ottengono una risposta alla terapia eseguita e caratterizzarne la profondità<sup>1-2-3-4</sup>, ed è tuttora in corso il suo utilizzo negli studi clinici come determinante nella scelta ad un tipo di terapia (Midas trial: NCT04934475, MASTER trial: NCT03224507, PERSEUS trial: NCT03710603, AURIGA trial: NCT03901963, DRAMMATIC trial: NCT04071457).<sup>5</sup>

Sulla base dei risultati di diversi studi, tale valutazione è pertanto raccomandata per i pazienti candidati a terapia con autotrapianto e successiva reinfusione cellule staminali che abbiano ottenuto una risposta completa sierologica, dopo almeno 3 mesi dalla procedura trapiantologica (singolo o doppio) prima di avviare la terapia di mantenimento, o prima del trapianto a giudizio del curante se ritenuto clinicamente utile.

- **ISTRUZIONE OPERATIVA MIELOMA-VALUTAZIONE MMR SENSIBILITA'  $\geq 10^{-5}$**

In laboratorio devono pervenire almeno 4-5 ml di sangue midollare intero preferibilmente con anticoagulante EDTA, il campione va processato entro 24-48 ore dal prelievo.

Eseguire il conteggio dei leucociti totali con un analizzatore contaglobuli

## **PROTOCOLLO**

Se conta WBC  $< 5 \times 10^6$  /mL:

Marcare 100 µL di sangue con almeno i seguenti anticorpi CD38, CD138, CD19, CD45, CD34

In assenza di precursori B, precursori mieloidi, CD34+  $< 0,1\%$ , CD138+  $< 0,05\%$  non si procede con la valutazione della MMR poiché il campione non è ritenuto rappresentativo del sangue midollare.

Se conta WBC  $> 5 \times 10^6$  /mL:

Aggiungere un volume di sangue midollare pari a  $20 \times 10^6$  di cellule in falcon da 50 mL (massimo 2 mL di sangue per ogni falcon)

Lisare i globuli rossi portando a volume di 50 mL con lisante al cloruro di ammonio o equivalenti per 15' a temperatura ambiente, tenendo le falcon in posizione orizzontale

Centrifugare a 800 g per 10'

Decantare o aspirare il surnatante con pompa a vuoto, risospendere il pellet e portare a volume di 50 mL con PBS-BSA 0,5% (in alternativa soluzione fisiologica, Isoflow, FacsFlow)

Centrifugare a 800 g per 5'

Decantare o aspirare il surnatante con pompa a vuoto, risospendere il pellet in 200 µL di PBS-BSA e trasferire in ugual misura le cellule in 2 tubi

Per ogni campione allestire 2 tubi con i seguenti anticorpi mandatori:

**Tube 1:** CD45, CD38, CD138, CD56, CD19, CD117 opzionale

**Tube 2:** CD45, CD38, CD138, CD56, CD19, cytoplasmatic Kappa, cytoplasmatic Lambda.

### **Tubo 1**

Aggiungere alla sospensione cellulare gli anticorpi monoclonali, vortexare e incubare per 15 min al buio  
Lavare con 3 mL di PBS-BSA 0,5% (in alternativa soluzione fisiologica, Isoflow, FacsFlow) centrifugare per 5 min a 1500 rpm

Aspirare surnatante e aggiungere 500uL di PBS-BSA 0,5% (in alternativa soluzione fisiologica, Isoflow, FacsFlow)

Acquisire  $2,5 \times 10^6$  di cellule totali

### **Tubo 2**

Aggiungere alla sospensione cellulare gli anticorpi monoclonali contro gli antigeni di superficie

Vortexare o agitare bene le provette

Incubare per 15' al buio a temperatura ambiente

Aggiungere alle provette 3 mL di PBS/BSA 0,5% (in alternativa soluzione fisiologica, Isoflow, FacsFlow)

Centrifugare per 5' a 1500 rpm

Decantare

Aggiungere 100uL di reagente 1 Fissativo

Vortexare

Incubare 15' al buio a temperatura ambiente

Aggiungere alle provette 3 mL di PBS/BSA 0,5% (in alternativa soluzione fisiologica, Isoflow, FacsFlow)

Centrifugare per 5' a 1500 rpm

Decantare

Aggiungere 100uL di reagente 2 Permeabilizzante

Aggiungere gli anticorpi monoclonali coniugati diretti contro le catene leggere intracitoplasmatiche di tipo kappa e lambda

Vortexare

Incubare 15' al buio a temperatura ambiente

Aggiungere alle provette 3 mL di PBS/BSA 0,5% (in alternativa soluzione fisiologica, Isoflow, FacsFlow)

Centrifugare per 5' a 1500 rpm (540g)

Decantare

Aggiungere alle provette 500uL di PBS/BSA 0,5% (in alternativa soluzione fisiologica, Isoflow, FacsFlow)

Acquisire  $2,5 \times 10^6$  di cellule totali

- **REPORT DEI RISULTATI: REFERTO**

Il report dei risultati di MMR deve riportare:

- Numero dei leucociti totali acquisiti
- Plasmacellule totali acquisite
- Plasmacellule monoclonali acquisite
- % plasmacellule monoclonali
- LOD del campione ( $20/n^\circ$  eventi %)
- LOQ del campione ( $50/n^\circ$  eventi %)
- % MRD
- MRD: definita positiva (+) o negativa (-) con le seguenti regole: se  $< \text{LOD}$ : -, se  $\geq \text{LOD}$  e  $< \text{LOQ}$ : + ma non quantificabile se  $\geq \text{LOQ}$ : +

- **CRITERI DI RISPOSTA CITOFLUORIMETRICA secondo IMWG 2016 INCLUDENTI MRD NEI PAZIENTI IN CR<sup>6</sup>:**

- *Flow-MRD negative*: Absence of phenotypically aberrant clonal plasmacells by next-generation flow on BM aspirates using the EuroFlow standard operation procedure for MRD detection in MM (or validated equivalent method) with a minimum sensitivity of 1 in  $10^5$  nucleated cells or higher.

## Referenze

1. Perrot A, Lauwers-Cances V, Corre J, et al. Minimal residual disease negativity using deep sequencing is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood*. 2018;132(23):2456-2464. doi:10.1182/blood-2018-06-858613
2. Paiva B, Puig N, Cedena MT, et al. Measurable residual disease by next-generation flow cytometry in multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2020;38(8):784-792. doi:10.1200/JCO.19.01231
3. Oliva S, Hofstede op Bruinink D, Rihova L, et al. Minimal Residual Disease Assessment by Multiparameter Flow Cytometry in Transplant-Eligible Myeloma in the EMN02/HOVON 95 MM Trial, *Blood Cancer J*. 2021 Jun 3;11(6):106. doi: 10.1038/s41408-021-00498-0.
4. Munshi NC, Avet-Loiseau H, Anderson KC, et al. A large meta-analysis establishes the role of MRD negativity in long-term survival outcomes in patients with multiple myeloma. *Blood Adv*. 2020;4(23):5988-5999. doi:10.1182/bloodadvances.2020002827
5. Costa LJ, Chhabra S, Medvedova E, Daratumumab, Carfilzomib, Lenalidomide, and Dexamethasone With Minimal Residual Disease Response-Adapted Therapy in Newly Diagnosed Multiple Myeloma, *J Clin Oncol*. 2021 Dec 13;JCO2101935. doi: 10.1200/JCO.21.01935
6. Kumar S, Paiva B, Anderson KC, et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2016;17(8):e328–46.