



PSDTA Neoplasie Mieloproliferative Croniche

Allegato 9 : Definizione anatomopatologica e di laboratorio

**A cura del Gruppo di Studio Sindromi Mieloproliferative
Rete Oncologica Piemonte e Valle d'Aosta**

Anno di pubblicazione 2022

ANALISI ISTO-PATOLOGICA

Introduzione

Le Neoplasie Mieloproliferative (MPN) corrispondono a distinte entità patologiche, la cui diagnosi richiede l'interpolazione dei seguenti fattori: morfologia, caratteristiche molecolari, citogenetica ed informazioni cliniche. Tale assunto è stato adottato dalla Organizzazione Mondiale della Sanità, che ha codificato nella "The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasm and acute leukemia" tutti i criteri (morfologici, clinici e molecolari) necessari per la diagnosi delle MPN. Da ciò ne consegue che la diagnosi deve essere posta da centri con particolare expertise. La responsabilità della diagnosi istologica del disordine mieloproliferativo è della Struttura di Anatomia Patologica, che deve essere in grado di gestire in modo ottimale il materiale biotico. Sono, inoltre, indispensabili risorse ed esperienza per far fronte alla diagnostica delle MPN che necessita di indagini di immunocitofluorimetria, citogenetica, FISH, biologia molecolare e genomica.

Raccomandazioni

Il prelievo biotico deve essere:

- un prelievo adeguato: il materiale prelevato deve essere significativo (vedi Foucar et al, ref a fine testo) con lunghezza di almeno 1-1,5 cm (escluso l'osso corticale, i tessuti molli periossei, il tessuto adiposo sottocorticale ecc.)
- accompagnato dall'invio di ulteriore materiale (sangue periferico o midollare) per lo screening delle mutazioni driver e di altre mutazioni somatiche.
- accompagnato da notizie cliniche dettagliate e complete, comprese le indicazioni circa eventuali biopsie precedenti con i relativi referti, documentazione delle terapie pregresse o in atto e segnalazione di eventuali richieste particolari.
- Se non in casi di urgenza il referto dovrebbe concludersi entro 20-30 gg lavorativi.

La classificazione WHO ha indicato un completo schema dei criteri diagnostici per Trombocitemia Essenziale (ET), Policitemia Vera (PV) e Mielofibrosi Primitiva (PMF), raccomandando inoltre l'esame del midollo osseo al momento della diagnosi di MPN (T0) e suggerendo la ripetizione della procedura durante il follow-up, in presenza di segni di progressione della malattia.

LMC

Alla **diagnosi** è necessario ottenere:

- un campione di sangue periferico con conferma della positività per Ph cromosoma e/o BCR/ABL
- un aspirato di sangue midollare per cariotipo e valutazione morfologica della fase di malattia
- la biopsia è importante per definire la fase di malattia (cronica, accelerata, blastica); può non essere necessaria, a meno che non si riesca ad ottenere un aspirato o vi siano dei reperti atipici su sangue periferico.

Nel **follow-up**, la ripetizione della biopsia osteomidollare viene effettuata se clinicamente opportuno.

MPN Ph-NEGATIVE

Policitemia Vera

Alla diagnosi, la BOM può essere omessa a scopo diagnostico se Hb >18.5 g/dL (maschio) o >16.5 g/dL (femmina), o Hct >55.5% (maschio) e >49.5% (femmina) in presenza di mutazione di JAK2 e ridotti livelli di Eritropoietina (WHO 2017). Tuttavia si ricorda che la biopsia ha un ruolo prognostico, in particolare nell'individuare le forme di mielofibrosi iniziale, presenti nel 20% dei pazienti; infatti la presenza di mielofibrosi iniziale predice una progressione più rapida verso la mielofibrosi conclamata (mielofibrosi post-PV).

Trombocitemia Essenziale

Alla diagnosi, la BOM è raccomandata ed indispensabile, anche se la biologia molecolare è positiva, per distinguere TE da MF-prefibrotica o nelle MPN con molecolare negativa.

Mielofibrosi in fase pre-fibrotica e fibrotica

Alla diagnosi, la BOM è raccomandata ed indispensabile per una corretta definizione diagnostica.

Criteri morfologici di risposta al trattamento

L'aspetto istologico del midollo nella terapia nelle MPN non sempre riflette il quadro clinico: la riduzione della splenomegalia o dei sintomi può avvenire anche senza modifiche nella fibrosi e cellularità.

Riferimenti bibliografici

- WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, revised 4th Edition, Lyon 2017
- Kathryn Foucar's Bone Marrow Pathology, 4th Edition,

ANALISI MOLECOLARE

LMC

Procedure diagnostiche e caratterizzazione molecolare

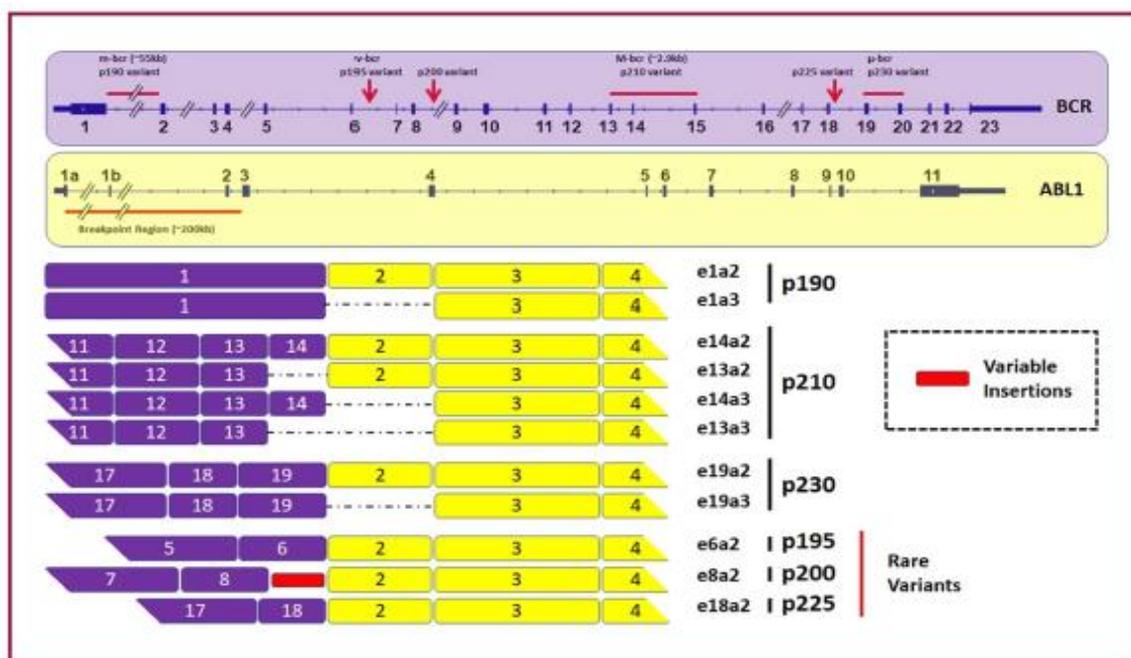
La diagnosi di LMC richiede la valutazione dei seguenti fattori: morfologia, caratteristiche molecolari, citogenetiche, informazioni cliniche e di laboratorio secondo le ELN 2013 e 2020 e WHO 2016. Da ciò consegue che la diagnosi e la gestione del paziente devono essere eseguite da centri con particolare expertise, dove è possibile eseguire:

- ◆ **Analisi morfologica** dell'aspirato midollare in un servizio di Anatomia Patologica con esperienza nella diagnostica dei disordini mieloproliferativi.
- ◆ **Analisi di citogenetica** classica per la ricerca del cromosoma Ph' secondo le ELN 2013 o eventuale analisi mediante FISH.
- ◆ **Analisi Molecolari** (Laboratori che eseguono analisi di biologia molecolare in Piemonte e Valle d'Aosta):
 1. *Screening qualitativo molecolare*: Laboratori afferenti alla rete CML LabNet Gimema.
 2. *Quantificazione del trascritto ed il monitoraggio del riarrangiamento BCR-ABL1 metodica RQ-PCR*: Laboratori afferenti alla rete CML LabNet Gimema.
 3. *Ricerca delle mutazioni del gene BCR/ABL1 tramite sequenziamento diretto*: Laboratorio Analisi Chimico-cliniche e Microbiologiche (area specialistica 3), AOU San Luigi Gonzaga (Orbassano, TO).

Analisi qualitativa molecolare: eseguita alla diagnosi di patologia su sangue periferico o midollare per identificare correttamente il tipo esatto di breakpoint *BCR/ABL1*, con metodologie in grado di identificare gli eventuali breakpoint rari (Figura 1).

Figura 1. Loci di rottura più frequenti dei geni *BCR* e *ABL1* e le proteine che ne originano (p190, p210, p230).

Qualitative PCR



Monitoraggio molecolare

Secondo le Linee Guida ELN 2013 e 2020 il monitoraggio molecolare svolge un ruolo essenziale nella gestione clinica dei pazienti affetti da CML, guidando la maggior parte delle decisioni cliniche e la RQ-PCR rimane la metodica di elezione.

Dosaggio molecolare quantitativo: la Real-time PCR quantitativa (RQ-PCR) non è obbligatoria alla diagnosi, ma obbligatoria durante il follow-up terapeutico del paziente. L'analisi deve essere eseguita con metodiche di Real-time PCR e il dato finale deve essere espresso in percentuale come rapporto fra le copie di BCR/ABL1 e le copie di ABL in Scala Internazionale (IS).

Il livello di risposta deve essere anche nel report finale dal criterio internazionalmente riconosciuto di MR (Risposta Molecolare) ad oggi basata su due criteri: N° di copie assoluto del gene di controllo e livello di trascritto di BCR/ABL1 in IS (Tabella 1).

Tabella 1 MR (Risposta Molecolare)

	MMR (MR3)	MR4	MR4.5	MR5
N° copie assolute del gene di riferimento ABL1 (X) (somma dei due replicati)	$X > 20000$	$20000 < X < 32000$	$32000 < X < 100000$	$X > 100000$
Livello di trascritto BCR-ABL1 in IS (International Scale)	$\leq 0.1\%$	$\leq 0.01\%$	$\leq 0.0032\%$	$\leq 0.001\%$

La citogenetica (CBA delle metafasi su sangue midollare) da sola non è sufficientemente sensibile per monitorare la risposta, ma deve essere effettuata in pazienti con traslocazione atipica, trascritti BCR-ABL1 rari o atipici che non possono essere misurati con RQ-PCR, in caso di fallimento/resistenza al trattamento per escludere ACA e in presenza di progressione verso AP o BP.

Timepoints

Il monitoraggio molecolare dei livelli di trascritto BCR-ABL1 in IS a 3, 6 e 12 mesi (Tabella 2) determina se il trattamento corrente deve essere continuato (risposta ottimale), modificato (fallimento/resistenza), a seconda delle caratteristiche, comorbidità e tolleranza dei pazienti (warning).

Ulteriori test in RQ-PCR possono essere richiesti se la cinetica della risposta non è chiara o se la tossicità/intolleranza causano la sospensione del farmaco o riduzioni della dose. Le stesse definizioni sono raccomandate per il trattamento in seconda linea.

Tabella 2. Indicazioni al trattamento espresso come presenza di trascritto BCR-ABL1 in IS

	Optimal	Warning	Failure
Baseline	NA	High-risk ACA, high-risk ELTS score	NA
3 months	≤10%	>10%	>10% if confirmed within 1–3 months
6 months	≤1%	>1–10%	>10%
12 months	≤0.1%	>0.1–1%	>1%
Any time	≤0.1%	>0.1–1%, loss of ≤0.1% (MMR) ^a	>1%, resistance mutations, high-risk ACA

For patients aiming at TFR, the optimal response (at any time) is BCR-ABL1 ≤ 0.01% (MR⁴).

A change of treatment may be considered if MMR is not reached by 36–48 months.

NA not applicable, ACA additional chromosome abnormalities in Ph+ cells, ELTS EUTOS long term survival score.

^aLoss of MMR (BCR-ABL1 > 0.1%) indicates failure after TFR

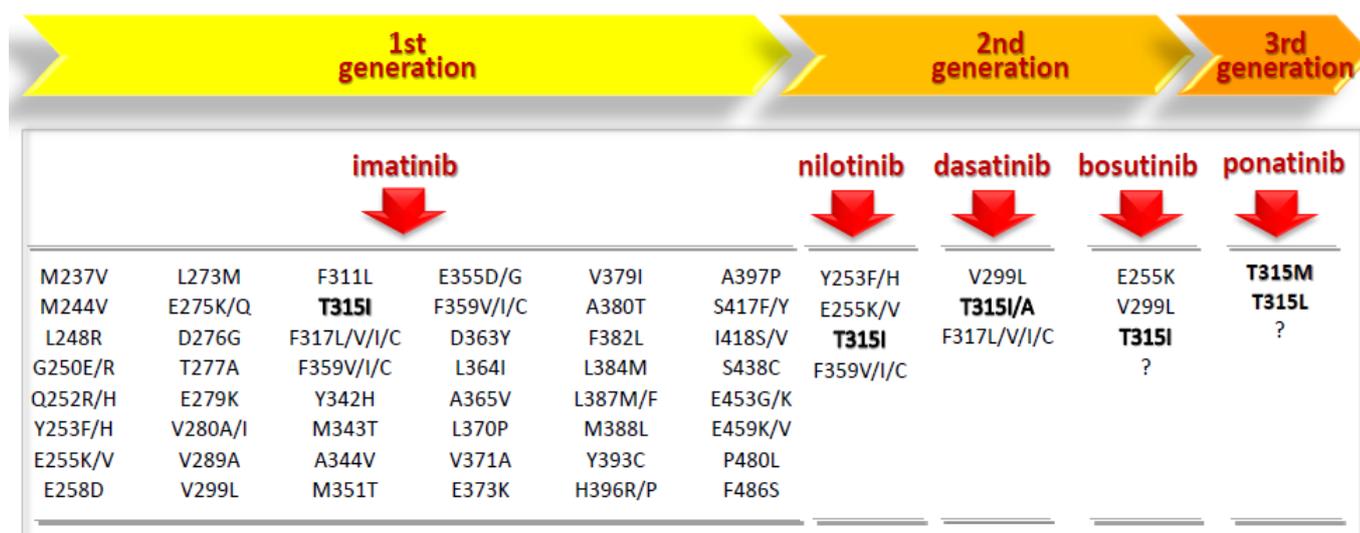
Sequenziamento di nuova generazione (NGS) e il suo utilizzo nella LMC

Lo scenario delle nuove tecnologie molecolari impiegate nella LMC è stato recentemente arricchito dalla Next Generation Sequencing (NGS), metodi che permettono di sequenziare un gran numero di molecole di RNA o DNA. Nel campo della resistenza, un ruolo di primo piano è svolto dall'NGS (Next Generation Sequencing) che consente l'identificazione di qualsiasi mutazione nel dominio ABL1, anche a livelli sub-clonali.

Diverse mutazioni puntiformi del KD sono state associate alla resistenza all'imatinib, ma anche al nilotinib (Y253H, E255K, E255V, F359V e F359C), dasatinib (V299L, T315A, F317L, F317I, F317V e F317C) o bosutinib (Y253H, V299L, F317V) (Figura 2). Anche se queste mutazioni specifiche sono presenti nel 10% dei casi che non raggiungono la risposta ottimale, è importante identificarle e caratterizzarle, al fine di valutare che tipo di TKI deve essere impiegato al momento dello switch in caso di resistenza.

Attualmente le mutazioni nel KD di ABL1 sono comunemente rilevate sequenziando il trascritto BCR-ABL1 secondo il metodo Sanger. Questa tecnica, tuttavia, può rilevare solo le mutazioni presenti in una percentuale superiore al 10-20%.

Figura 2. BCR-ABL KD mutation status and TKI choice (da Soverini et al, Mol Cancer, 2018)



La diagnosi precoce delle mutazioni BCR-ABL1 è molto importante per le decisioni terapeutiche. L'analisi delle mutazioni deve essere eseguita in presenza di scarsa risposta o fallimento del trattamento (Tabella 3).

Tabella 3. Quando effettuare l'analisi mutazionale (da Bacarani et al. Blood 2013; NCCN V.1, 2019)

ELN 2013	NCCN 2018
<ul style="list-style-type: none"> In case of treatment failure in chronic phase In case of disease progression to accelerated or blast phases When considering to switch to alternate TKI therapy 	<ol style="list-style-type: none"> Chronic phase <ul style="list-style-type: none"> Failure to reach response milestones Any sign of loss of response (defined as hematologic or cytogenetic relapse) 1-log increase in <i>BCR-ABL1</i> transcript levels and loss of MMR Disease progression to accelerated or blast phase

Riferimenti bibliografici

- A. Hochhaus, M. Bacarani, R.T. Silver, C. Schiffer et al. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. *Leukemia* (2020) 34:966–984.
- E. Jabbour, H. Kantarjian. Chronic myeloid leukemia: 2020 update on diagnosis, therapy and monitoring. *Am J Hematol.* (2020) 95:691–709.
- C. Cumbo, L. Anelli, G. Specchia, F. Albano Monitoring of Minimal Residual Disease (MRD) in Chronic Myeloid Leukemia: Recent Advances. *Cancer Management and Research* (2020) 12:3175–3189.
- S. Soverini, L. Bavaro, C. De Benedittis, M. Martelli et al. Prospective assessment of NGS-detectable mutations in CML patients with nonoptimal response: the NEXT-in-CML study. *Blood* (2020) 135(8)
- Vardiman et al. *Blood* 2009
- B. Izzo, E.M. Gottardi et al. Monitoring Chronic Myeloid Leukemia: How Molecular Tools May Drive Therapeutic Approaches. *Frontiers in Oncology* (2019) 9:833.
- J. Radich, C. Yeung, and D. Wu. New approaches to molecular monitoring in CML (and other diseases). *Blood* (2019) 134(19).

MPN Ph-NEGATIVE

Procedure diagnostiche e caratterizzazione molecolare

Laboratori che eseguono analisi di biologia molecolare in Piemonte e Valle d'Aosta:

◆ **Mutazione JAK2V617F qualitativo:** Lab Analisi, Osp. SS Antonio e Biagio e Cesare Arrigo (Alessandria); Lab Analisi, Azienda USL Valle d'Aosta (Aosta); Osp. San Giovanni Bosco (Torino); Lab Ematologia, AOU Maggiore della Carità di Novara (Novara).

◆ **Mutazione JAK2V617F quantitativo:** Lab Analisi, AO S. Croce e Carle (Cuneo); Lab A.P., Ospedale Cardinal Massaia (Asti); Lab Patologia Molecolare A.P., AOU Città della Salute e della Scienza di Torino (Torino); Laboratorio Analisi Chimico-cliniche e Microbiologiche, (area specialistica 3), AOU San Luigi Gonzaga (Orbassano, TO); Lab Analisi, Osp. SS Antonio e Biagio e Cesare Arrigo (Alessandria).

◆ **Mutazioni JAK2 EX12:** Lab Patologia Molecolare A.P., AOU Città della Salute e della Scienza di Torino (Torino); Laboratorio Analisi Chimico-cliniche e Microbiologiche, (area specialistica 3), AOU San Luigi Gonzaga (Orbassano, TO); Lab Ematologia, AOU Maggiore della Carità di Novara (Novara); Lab Analisi, AO S. Croce e Carle (Cuneo).

◆ **Mutazioni CALR:** Lab Patologia Molecolare A.P., AOU Città della Salute e della Scienza di Torino (Torino); Laboratorio Analisi Chimico-cliniche e Microbiologiche, (area specialistica 3), AOU San Luigi Gonzaga (Orbassano, TO); Lab A.P., Ospedale Cardinal Massaia (Asti), Lab Ematologia, AOU Maggiore della Carità di Novara (Novara); Lab Analisi, AO S. Croce e Carle (Cuneo);

◆ **Mutazioni MPL (W515L/K):** Lab Patologia Molecolare A.P., AOU Città della Salute e della Scienza di Torino (Torino); Laboratorio Analisi Chimico-cliniche e Microbiologiche (area specialistica 3), AOU San Luigi Gonzaga (Orbassano, TO); Lab A.P., Ospedale Cardinal Massaia (Asti), Lab Ematologia, AOU Maggiore della Carità di Novara (Novara); Lab Analisi, AO S. Croce e Carle (Cuneo).

Ruolo del sequenziamento di nuova generazione nelle MPN

I pannelli di geni analizzabili in NGS permettono di descrivere le alterazioni di diversi geni coinvolti nella regolazione trascrizionale e nelle vie di segnalazione cellulare e queste informazioni possono essere utilizzate per prevedere il rischio di trasformazione leucemica, per guidare il trattamento mirato e per ipotizzare uno studio clinico personalizzato.

Laboratori che eseguono analisi di NGS in Piemonte e Valle d'Aosta:

Lab Patologia Molecolare A.P., AOU Città della Salute e della Scienza di Torino (Torino). Laboratorio Analisi Chimico-cliniche e Microbiologiche (area specialistica 3), AOU San Luigi Gonzaga (Orbassano, TO)

Riferimenti bibliografici

J. Grinfeld, J. Nangalia, E.J. Baxter, et al. Disease heterogeneity and personalized prognosis in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med.* (2018) 379(15): 1416–1430.

L. Kjær. Clonal Hematopoiesis and Mutations of Myeloproliferative Neoplasms. *Cancers* (2020) 12, 2100.

G.A. Palumbo, S. Stella, M.S. Pennisi, C. Piroso et al. The Role of New Technologies in Myeloproliferative Neoplasms. *Frontiers in Oncology* (2019) 9: 321.

W. Limvorapitak, J. Parker, C. Hughesman, et al. No Differences in Outcomes Between JAK2 V617F Positive Patients with Variant Allele Fraction < 2% Versus 2-10%: A 6-Year Province wide Retrospective Analysis. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia* (2020).

A.E. Marneth and A. Mullally. The Molecular Genetics of Myeloproliferative Neoplasms. *Cold Spring Harb Perspect Med* (2020) 10.

Z. Zuo, S. Li, J. Xu, M. J. You, J. D. Khoury, C. C. Yin. Philadelphia-Negative Myeloproliferative Neoplasms: Laboratory Workup in the Era of Next-Generation Sequencing. *Current Hematologic Malignancy Reports* (2019) 14:376–385.

T. Barbui, J. Thiele, H. Gisslinger, et al. The 2016 WHO classification and diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms: document summary and indepth discussion. *Blood Cancer Journal* (2018) 8:15.

N. Gangat and A. Tefferi. Myelofibrosis biology and contemporary management. (2020) *British Society for Haematology and John Wiley & Sons Ltd*.

A.Tefferi, P. Guglielmelli, T.L. Lasho et al. Mutation-enhanced international prognostic systems for essential thrombocythaemia and polycythaemia vera. (2020) *BJH*

P. Bose and S. Verstovsek. The Evolution and Clinical Relevance of Prognostic Classification Systems in Myelofibrosis. (2016) *Cancer* 681.

A.Tefferi, P. Guglielmelli, T. L. Lasho, et al. MIPSS70+ Version 2.0: Mutation and Karyotype-Enhanced International Prognostic Scoring System for Primary Myelofibrosis. (2018) *Journal Of Clinical Oncology*. 36 (17).

A.Tefferi, P. Guglielmelli, M. Nicolosi et al. GIPSS: genetically inspired prognostic scoring system for primary myelofibrosis. *Leukemia* (2018) 32:1631–1642.

P. Guglielmelli, T. L. Lasho, G. Rotunno, et al. MIPSS70: Mutation-Enhanced International Prognostic Score System for Transplantation-Age Patients With Primary Myelofibrosis. (2018) *Journal Of Clinical Oncology*. 36 (4).

D.A Arber, A. Orazi, R. Hasserjian, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. (2016) *Blood*. 127:2391-2405.