

SYNLAB 



**ANALISI
GENETICHE IN
ONCOEMATOLOGIA**



SYNLAB a supporto della diagnostica ematologica

FLUSSO DIAGNOSTICO

CITOLOGIA (prima diagnosi)

ISTOPATOLOGIA (prima diagnosi)

Citologia speciale

Istopatologia (Immunochimica)

Citologia di flusso
(Overview)

Genetica molecolare
(Panel diagnosis 1)

Citogenetica
(Chromosomal analysis)

Istopatologia (Molecular Pathology)

Citologia di flusso
(Panel Diagnosis)

Genetica molecolare
(Panel diagnosis 2)

Citogenetica
(FISH-Panel 1)

Genetica molecolare
(Panel diagnosis 3)

Citogenetica
(FISH-Panel 2)

ONCOEMATOLOGIA quesiti clinici:

- + Leucocitosi, trombocitosi o poliglobulia
- + Anemia o citopenia
- + Conta differenziale delle cellule del sangue
- + Microangiopatia trombotica
- + Diagnostica differenziale su aghi aspirati o lavaggi (liquor, fluido pleurico, ascite, lavaggio bronchiale ecc)
- + Disordini del midollo osseo (leucemie, neoplasie mieloproliferative, mielodisplasie, ecc)
- + Malattie linfoproliferative (linfoma, mieloma ecc)
- + Fattori prognostici e monitoraggio diagnostico delle neoplasie ematologiche
- + Quesiti ematologici particolari (emoglobinuria parossistica notturna, mastocitosi, ecc)
- + Diagnostica istologica e molecolare dei tessuti solidi
- + Monitoraggio diagnostico di tumori solidi nel sangue periferico (biopsie liquide)

SOSPETTO CLINICO. Parametri che richiedono ulteriori approfondimenti diagnostici:

- + Poliglobulia (emoglobina >16,0/16,5 G/dl; ematocrito >49% (uomini) o >48% (donne)
- + Trombocitosi (conta piastrinica >450 x 10⁹ G/l)
- + Granulocitosi
- + Linfocitosi
- + Monocitosi
- + Eosinofilia
- + Basofilia
- + Deviazioni qualitative nella conta differenziale di cellule di sangue al microscopio
- + Alti valori di Ig



Le Leucemie

La leucemia è un tumore del sangue che nella maggior parte dei casi origina da una cellula staminale emopoietica. Esistono diversi tipi di leucemia: alcune forme sono più comuni nel bambino, altre nell'adulto. Quando si sviluppa una leucemia il midollo osseo produce grandi quantità di globuli bianchi che non funzionano correttamente. Inoltre, queste cellule prive di controllo, impediscono la normale crescita delle altre cellule prodotte dal midollo osseo, ossia globuli rossi e piastrine.

Le conseguenze sono l'insorgenza di infezioni, la stanchezza e le emorragie. In Italia vengono diagnosticati 4.700 nuovi casi ogni anno tra gli uomini e 3.400 tra le donne. Le diverse forme di leucemia possono classificate in base alla velocità con cui si manifesta la malattia e in base al tipo di cellula di origine.

Le leucemie presentano differenze sulla base della biologia, dell'epidemiologia, del decorso clinico e della prognosi e la loro eziologia è ancora in gran parte sconosciuta. Non v'è dubbio che l'esposizione ad agenti chimici mutageni (come agenti alchilanti, benzene) e radiazioni ionizzanti, così come l'associazione a disordini genetici costituzionali, aumentino il rischio di sviluppare particolari tipi di leucemia.



LEUCEMIE ACUTE

Nella leucemia acuta c'è un accumulo nel sangue, nel midollo osseo e talora anche nella milza e nei linfonodi di cellule immature, denominate "blasti" leucemici. Queste cellule non funzionano correttamente, hanno una vita media lunga e una grande capacità di moltiplicarsi, per cui la malattia insorge e progredisce rapidamente. La leucemia acuta richiede una terapia tempestiva e aggressiva.



LEUCEMIE CRONICHE

Le leucemie croniche sono caratterizzate dall'accumulo nel sangue, nel midollo osseo, nella milza e spesso nei linfonodi di globuli bianchi che maturano in modo quasi normale, che crescono indefinitamente, e tendono ad accumularsi in quanto sopravvivono a lungo. Spesso, in fase iniziale, le leucemie croniche non danno sintomi e non danno segno di sé per un lungo periodo prima della diagnosi.



I marcatori molecolari disponibili nelle leucemie croniche BCR-ABL1 t(9;22) positive e nelle leucemie acute



BCR-ABL1 t(9;22) CROMOSOMA PHILADELPHIA

Il Cromosoma Philadelphia definisce una peculiare alterazione dell'assetto genico della cellula. Si origina a seguito di una traslocazione cromosomica, cioè il trasferimento di due sezioni di cromosoma che invertono la loro posizione. La mutazione Ph⁺ caratterizza la Leucemia Mieloide Cronica (CML) ed è presente in circa il 30% dei casi di Leucemia Linfoide Acuta (LLA) con una frequenza che, nell'adulto, aumenta all'aumentare dell'età.



LA MALATTIA MINIMA RESIDUA NELLE LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA

Con l'introduzione nella pratica clinica degli inibitori specifici per BCR-ABL, ha assunto importanza rilevante la valutazione precoce del residuo di malattia, che costituisce sia un fattore prognostico della risposta alla terapia che di predittività riguardo alla sopravvivenza libera dalla malattia. Come conseguenza, il monitoraggio della risposta alla terapia ha richiesto una valutazione sempre più precisa della "quantità" di trascritto ibrido BCR-ABL mediante l'uso delle tecniche di biologia molecolare più sensibili, favorendo tra l'altro la sinergia tra laboratorio di biologia molecolare clinica e la clinica. Il dato quantitativo per il trascritto ibrido p210 viene normalmente espresso in scala internazionale (IS).

TEST DISPONIBILI

BCR-ABL1	t(9;22) test qualitativo
BCR-ABL1	t(9;22) test quantitativo

PML- RARa t(15;17)

La traslocazione reciproca bilanciata t(15;17), che fonde il gene PML sul cromosoma 15 al gene RARA sul cromosoma 17 è caratteristica della leucemia acuta promielocitica (LAP), un sottotipo specifico di Leucemia Mieloide Acuta (LMA). La traslocazione PML-RARa, a seconda del punto di rottura all'interno del gene PML, esiste in 3 isoforme: bcr1, bcr2 e bcr3, che rappresentano rispettivamente il 55%, 5% e 40% dei casi. L'insorgenza della malattia è inoltre spesso caratterizzata da una grave coagulopatia, che espone i pazienti ad alto rischio di emorragie fatali. La precisione e la velocità del work-up diagnostico è di vitale importanza per garantire che il trattamento salvavita (con acido trans-retinoico combinato con antraciclina o triossido di arsenico) possa essere avviato quanto prima.

TEST DISPONIBILI

PML-RARa

t(15;17) test qualitativo

AML1-ETO t(8;21) RUNX1 - RUNX1T1

La traslocazione t(8;21) è stata descritta la prima volta nel 1973 ed è presente in quasi il 7% delle nuove diagnosi di LMA ed è più comune nei pazienti giovani. E' associata a una prognosi relativamente favorevole ed a una risposta particolarmente buona ad alcuni agenti terapeutici. La ricerca della traslocazione AML1-ETO t(8;21) è inserita nelle raccomandazioni dell'European Leukemia Network (ELN) 2017 per la valutazione ai fini prognostici nei pazienti con LMA.

TEST DISPONIBILI

AML1-ETO

t(8;21) test qualitativo

FLT3

Il gene FLT3 codifica per un importante recettore coinvolto nella emopoiesi normale. Le mutazioni in questo gene sono comuni nella leucemia mieloide acuta (LMA) e lo screening per le mutazioni di FLT3 è inserito nelle raccomandazioni ELN 2017 nei pazienti con LMA. Le mutazioni FLT3-ITD sono state associate a prognosi peggiore in LMA.

Lo screening mutazionale di FLT3 è raccomandato per la somministrazione dei nuovi farmaci inibitori selettivi per FLT3 che hanno dimostrato di migliorare significativamente la sopravvivenza nei pazienti più giovani con LMA FLT3-mut quando somministrata in associazione a chemioterapia citotossica standard.

TEST DISPONIBILI

FLT3 ITD

analisi qualitativa

FLT3 TDK

analisi qualitativa



NPM1

Il gene per la nucleofosmina (NPM1) codifica per una proteina nucleocitoplasmatica multifunzionale, che migra tra nucleo cellulare e citoplasma con prevalente localizzazione nucleolare. È stato dimostrato che il 60% dei pazienti LMA con cariotipo normale hanno una mutazione all'interno dell'esone 12 del gene NPM1. La mutazione più comune (mutazione A) è presente nel 70-80% dei casi NPM1 mutati. Le mutazioni B e D sono state osservate circa nel 10% e nel 5% dei casi rispettivamente. Lo screening a fine di stratificazione prognostica per le mutazioni in questo gene è inserito nelle raccomandazioni ELN 2017 nei pazienti con LMA.

TEST DISPONIBILI

NPM1

stato mutazionale esone 12 analisi qualitativa



MALATTIA MINIMA RESIDUA E RIPRESA DI MALATTIA NELLE LEUCEMIE ACUTE

Come per le leucemie croniche, il monitoraggio quantitativo di marcatori specifici nelle leucemie acute ha necessità di utilizzare le tecniche di biologia molecolare più sensibili.

Alcuni marcatori possono essere utilizzati per studi di MRD oppure per identificare precocemente la ripresa di malattia.

TEST DISPONIBILI

PML-RARa

test quantitativo

AML1-ETO

test quantitativo

NPM1

test quantitativo



MUTAZIONI DEL GENE IGHV

Lo stato mutazionale dei geni codificanti la porzione variabile della catena pesante delle immunoglobuline (IGHV) è un fattore prognostico di sicuro interesse per alcune neoplasie ematologiche tra cui la Leucemia Linfatica Cronica (LLC). In relazione alla storia naturale della patologia, la LLC ha un decorso clinico estremamente variabile, con un intervallo di sopravvivenza che va da mesi a decenni e una mediana di sopravvivenza di 7,5 anni .

Nel 1999, diversi lavori hanno riportato, in maniera indipendente, l'impatto prognostico dello stato mutazionale delle IGHV nella LLC. Infatti, sulla base della presenza o assenza di mutazioni a carico dei geni IGHV, i casi di LLC sono stati suddivisi in due sottogruppi che correlano con decorsi clinici differenti: pazienti con geni IGHV non mutati mostrano una malattia più aggressiva e una sopravvivenza media inferiore rispetto a pazienti con geni IGHV mutati (8 anni vs 24 anni).

TEST DISPONIBILI

Stato mutazionale IGHV

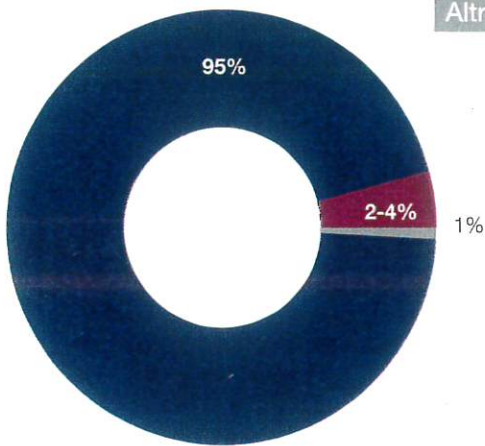


Neoplasie mieloproliferative croniche BCR-ABL1 t(9;22) negative

PV Policitemia Vera

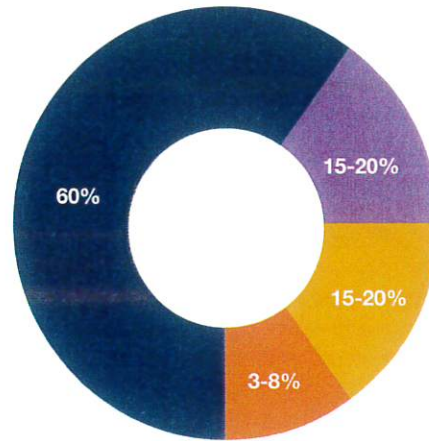
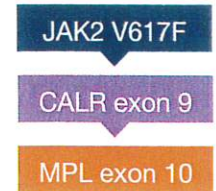
Patologie
e frequenza:

Flusso
diagnostico:



ET Trombocitemia Essenziale

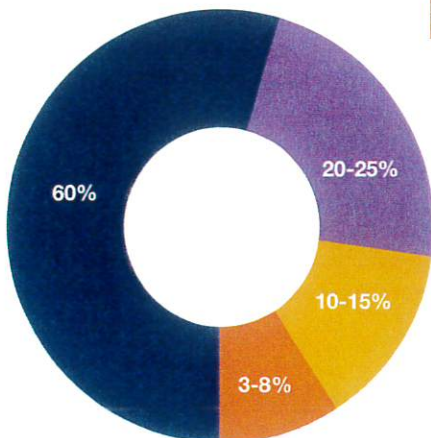
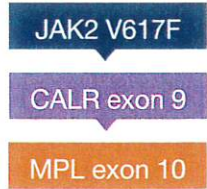
Patologie
e frequenza:



MF Mielofibrosi

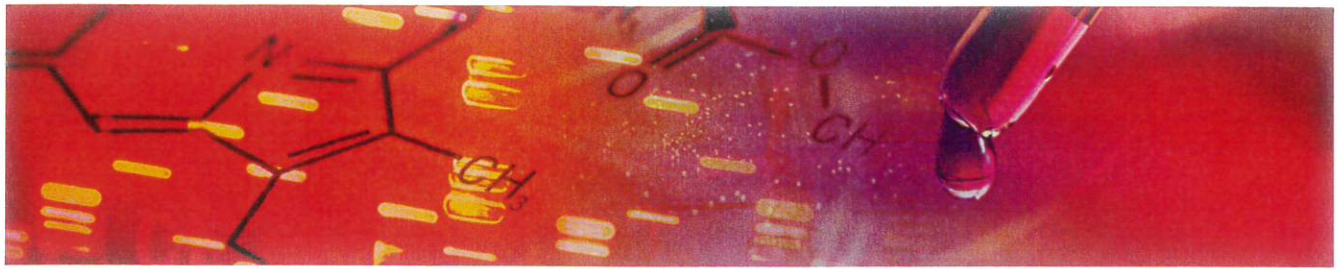
Patologie
e frequenza:

Flusso
diagnostico:



Legenda:

- JAK2 V617F
- JAK2 exon 12
- MPL W515X
- CALR
- Non note
- Altre



I MARCATORI MOLECOLARI DISPONIBILI NELLE NEOPLASIE MIELOPROLIFERATIVE Ph-

MUTAZIONI DEL GENE JAK2

JAK2, localizzato sul cromosoma 9p24, è un gene appartenente alla famiglia delle Janus Kinasi, codificante una tirosinchinasi citoplasmatica necessaria per la trasduzione del segnale che si attiva in risposta al legame di diverse molecole della famiglia delle citochine di tipo I, quali l'eritropoietina, la trombopoietina e il fattore stimolante le colonie granulocitarie (G-CSF). Mutazioni in specifici tratti del gene JAK2 sono caratteristiche di alcune forme di malattie mieloproliferative caratterizzate dall'assenza della traslocazione t(9;22).

JAK2 V617F

La mutazione puntiforme V617F origina da una sostituzione G>T al nucleotide 1849 dell'esone 14, causando la sostituzione della valina con la fenilalanina alla posizione 617 della proteina JAK2. È la mutazione più frequente nei pazienti affetti da malattie mieloproliferative ph- , essendo presente in oltre il 95% di pazienti con Policitemia Vera (PV) e in circa il 50%-60% dei pazienti affetti da Trombocitemia Essenziale (TE) e Mielofibrosi (MF) Primaria. In alcuni casi selezionati e attualmente solo in protocolli sperimentali è previsto, come per la Leucemia Mieloide Cronica BCR-ABL1 positiva, l'utilizzo di "farmaci intelligenti" capaci di interferire direttamente con il metabolismo alterato della cellula tumorale, gli inibitori di JAK2. La rilevazione della mutazione V617F è inserita nei criteri maggiori diagnostici WHO per PV, TE e MF.

TEST DISPONIBILI

Gene JAK2	identificazione qualitativa di V617F
Gene JAK2	identificazione quantitativa di V617F

JAK2 ESONE 12

In circa il 4% dei pazienti con sospetto diagnostico di Policitemia Vera, la mutazione V617F di JAK2 è assente, mentre è un altro tratto del gene ad essere mutato, nello specifico l'esone 12. La rilevazione di mutazioni nell'esone 12 è inserita all'interno dei criteri maggiori diagnostici WHO 2016 per la Policitemia Vera.

TEST DISPONIBILI

JAK2 Esone 12

stato mutazionale analisi qualitativa

MUTAZIONI DEL GENE CALRETICULINA

Localizzato sul cromosoma 19p32.2, il gene CALR codifica per Calreticulina, una proteina coinvolta nella sintesi di glicoproteine, nella omeostasi del calcio e nella morte cellulare programmata. Nel 2013 sono state descritte le mutazioni somatiche di CALR ed è stato dimostrata la presenza di mutazioni in questo gene nel 30% di pazienti con Trombocitemia Essenziale e Mielofibrosi Primaria risultati negativi per le mutazioni di JAK2. Le mutazioni a carico di CALR, sono inserzioni o delezioni dell'esone 9 e le due principali mutazioni costituenti circa l'85% di tutti i casi mutati sono delezioni di 52 basi – tipo 1, o inserzioni di 5 basi – tipo 2. I pazienti CALR positivo sono meno affetti da eventi trombotici delle Trombocitemie Essenziali e hanno una sopravvivenza complessivamente migliore rispetto a quelli JAK2 o MPL positivi. La rilevazione delle mutazioni in CALR è inserita nei criteri maggiori diagnostici WHO per TE e MF.

TEST DISPONIBILI

CALRETICULINA

stato mutazionale esone 9 analisi qualitativa

GENE MPL

Il gene MPL codifica per il recettore per la trombopoietina, che promuove la crescita e la proliferazione cellulare. Questo recettore è importante per la proliferazione dei megacariociti. Il recettore della trombopoietina svolge un ruolo anche nel mantenimento delle cellule staminali ematopoietiche all'interno del midollo osseo che hanno il potenziale di svilupparsi in globuli rossi, globuli bianchi e piastrine.



MUTAZIONI DEL GENE MPL ESONE 10 (W515)

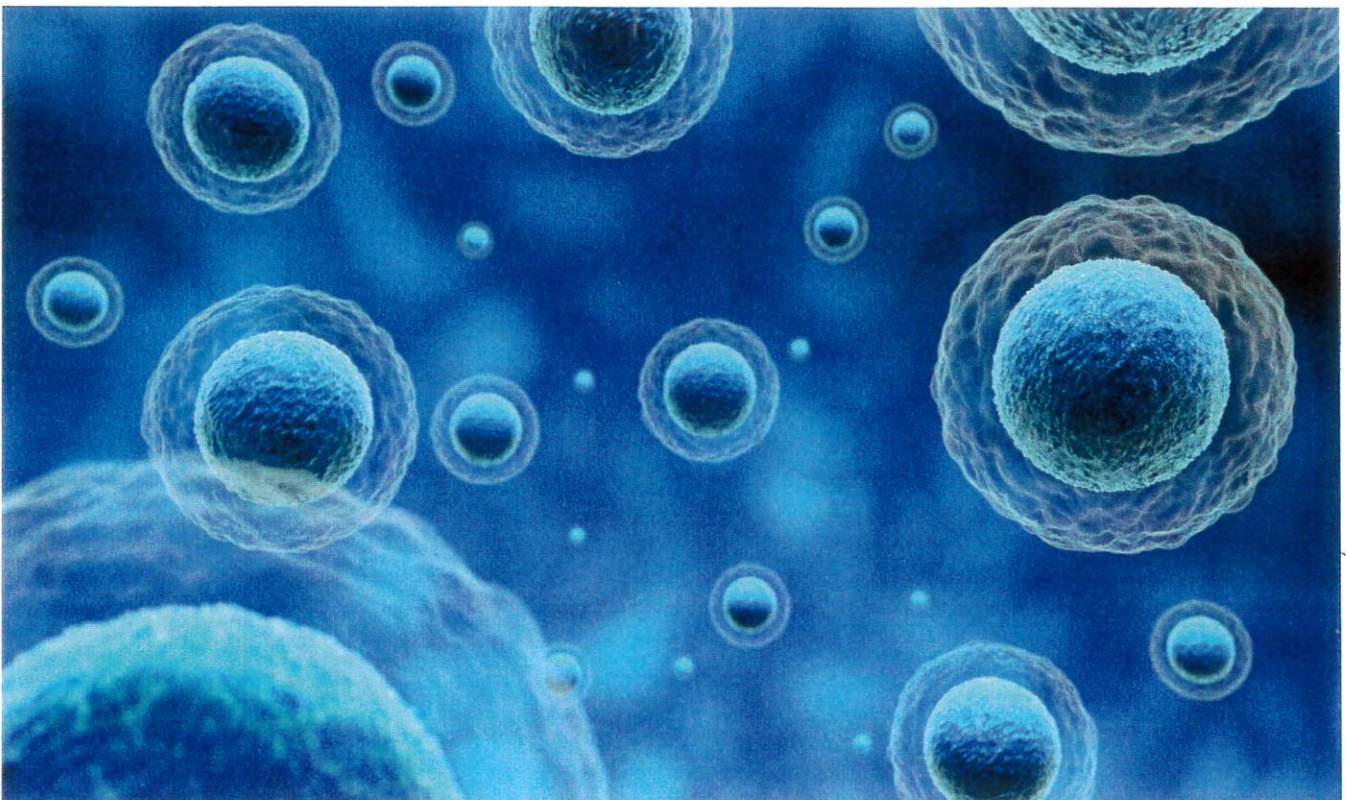
Le mutazioni somatiche nel gene MPL sono presenti nel 3%-8% di pazienti affetti da trombocitemie essenziali e mielofibrosi primaria. Si tratta di mutazioni a carico dell'esone 10, con sostituzione di un triptofano in posizione 515 con una leucina o arginina.

La sequenza amminoacidica sede della mutazione gioca un ruolo importante nella conformazione citosolica di MPL e ne previene l'attivazione spontanea del recettore: la sostituzione del triptofano con un altro amminoacido porta alla perdita dell'attività inibitoria e risulta in un gene MPL costitutivamente attivo. La rilevazione delle mutazioni del gene MPL è inserita nei criteri maggiori diagnostici WHO per TE e MF.

TEST DISPONIBILI

MPL W515L/K

analisi qualitativa





Sindrome Ipereosinofila (HES)



Gli eosinofili sono un tipo di leucociti coinvolti nelle reazioni allergiche e nella risposta immunitaria verso alcuni parassiti. In queste patologie il numero di eosinofili nel sangue può quindi essere elevato. L'iperesinofilia è caratterizzata dall'eccessiva produzione di eosinofili; questi possono invadere organi e tessuti e determinare lo sviluppo di HES. L'HES è una patologia causata dall'infiltrazione di eosinofili con il conseguente danno a molti organi e tessuti, inclusi il cuore, i polmoni e il sistema nervoso.

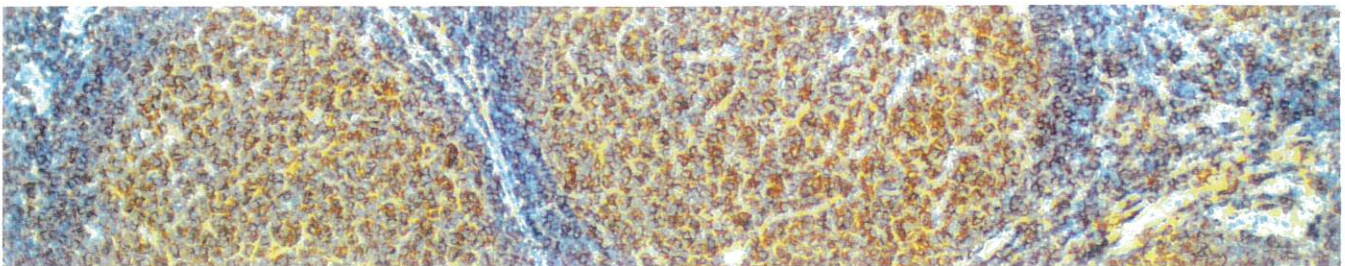
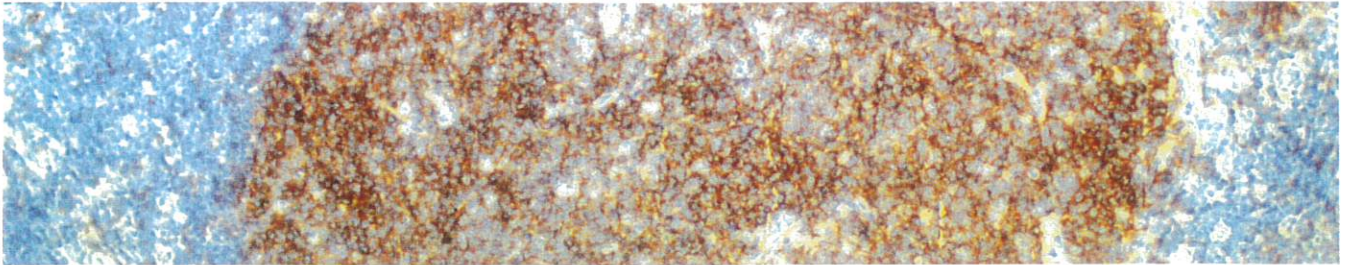
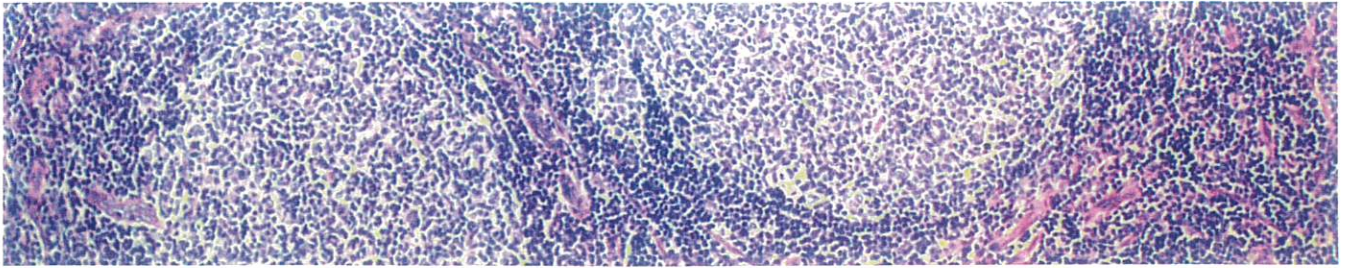


RIARRANGIAMENTO FIP1L1-PDGFRa

FIP1L1-PDGFRa è un gene di fusione anomalo che determina la crescita eccessiva degli eosinofili, un tipo di leucociti. Il gene di fusione FIP1L1-PDGFRa, produce una proteina funzionante ma attivata in maniera incontrollata e quindi in grado di fornire continuamente i segnali per l'attivazione della crescita e divisione cellulare. Sotto questi segnali di crescita incontrollati, gli eosinofili (e talvolta anche altre cellule del sangue) crescono eccessivamente determinando ipereosinofilia (HE) o sindrome ipereosinofila (HES) che, se non trattata, può essere fatale. Solo lo 0,4% delle persone con un numero eosinofili persistentemente alto presentano il riarrangiamento genico FIP1L1-PDGFRa. Questa condizione è maggiormente frequente nei pazienti di età compresa tra i 20 e i 50 anni. Sebbene la presenza di questa alterazione genetica sia un evento raro, se non diagnosticata può comportare conseguenze anche fatali. Pertanto la diagnosi deve essere effettuata il prima possibile in modo da somministrare prontamente il trattamento con il farmaco Imatinib.

TEST DISPONIBILI

Ricerca qualitativa del gene di fusione PDGFRa/FIP1L1



Con il termine linfoma si indica un tumore che interessa il sistema linfatico e, più precisamente, i linfociti, le cellule preposte alle difese nei confronti delle infezioni. I linfociti si trovano nei linfonodi (ghiandole linfatiche), nella milza, nel timo e nel midollo osseo.

Il linfoma può pertanto interessare queste aree, ma anche gli altri organi.

I linfomi sono classificati in due categorie, i linfomi di Hodgkin e i linfomi non Hodgkin. I linfomi non Hodgkin hanno un'incidenza di 5 volte superiore rispetto al linfoma di Hodgkin, e il 95% dei pazienti colpiti da questa malattia sono adulti. I linfomi possono nascere da tutti i tipi di linfociti (B, T e NK); i più comuni nel nostro Paese sono i linfomi di derivazione dai linfociti B.

I MARCATORI MOLECOLARI DISPONIBILI PER LA DIAGNOSI DEI LINFOMI

LA CLONALITÀ B - IGH

Il test di clonalità valuta il riarrangiamento VDJ delle catene pesanti del BCR nelle cellule B al fine di determinare se la maggioranza dei profili di riarrangiamento delle cellule B sono diversi o identici. Questa informazione, insieme ai segni e sintomi clinici e ai risultati di altri test, può aiutare a chiarire la diagnosi del paziente e può essere utilizzata per valutare la persistenza o la recidiva di linfoma.

TEST DISPONIBILI

Riarrangiamento IGH test qualitativo

LA TRASLOCAZIONE BCL1-JH t(11;14)

La traslocazione t(11;14) è presente nel 50-70% dei casi di linfoma mantellare. Il linfoma mantellare è una rara forma di linfoma maligno non-Hodgkin che interessa i linfociti B in una regione dei linfonodi definita "zona mantellare". Rappresenta il 2-10% dei linfomi e la prevalenza stimata è circa 1/25.000. Il linfoma mantellare colpisce gli adulti di mezza età, soprattutto attorno ai 65 anni (età compresa tra 35 e 85 anni). Nella traslocazione t(11;14), nella quale il locus IgH si riarrangia con il gene BCL-1 (denominato anche PRAD-1 o Cyclin-D1). Quest'ultimo codifica per una proteina coinvolta nel ciclo cellulare. Una de-regolazione di BCL-1 può quindi contribuire all'aumento incontrollato della proliferazione cellulare.

TEST DISPONIBILI

BCL1-JH

t(11;14) test qualitativo

LA TRASLOCAZIONE BCL2-JH t(14;18)

La traslocazione t(14;18) è presente nel 60-80% dei linfomi follicolari e nel 20% dei linfomi diffusi a grandi cellule B. Questa anomalia genetica causa la giustapposizione del gene bcl-2 (situato sul cromosoma 18) al gene delle catene pesanti delle immunoglobuline, posto sul cromosoma 14q32. Questa traslocazione è responsabile della sovra-espressione del gene bcl-2 nei linfomi follicolari, con conseguente deregolazione del turn-over delle cellule centrollicolari che divengono resistenti al processo apoptotico che fisiologicamente le regola.

TEST DISPONIBILI

BCL2-JH

t(14;18) test qualitativo

Riferimenti bibliografici

- + Lo Coco, F. et al. The biology of acute promyelocytic leukemia and its impact on diagnosis and treatment. Hematology ASH Educ. Program 2006
- + JJM van Dongen et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease Leukemia (1999) 13, 1901–1928
- + Registro tumori - I tumori in Italia, rapporto 2006
- + Hartmut Döhner et al. Diagnosis and Management of AML in Adults: 2017 ELN Recommendations from an International Expert Panel Blood. 2017
- + Cool J et al. A Tyrosine Kinase Created by Fusion of the PDGFRA and FIP1L1 Genes as a Therapeutic Target of Imatinib in Idiopathic Hypereosinophilic Syndrome N Engl J Med 2003
- + Gabert J et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – A Europe Against Cancer Program Leukemia (2003) 17, 2318–2357
- + van der Velden, V.H. et al. (2003) Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. Leukemia 17, 1013.
- + Tatsuya Suzuki et al. Clinical characteristics and prognostic implications of NPM1 mutations in acute myeloid leukemia, Blood October 2005
- + Thompson PA1 et al. Fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab treatment achieves long-term disease-free survival in IGHV-mutated chronic lymphocytic leukemia. Blood 2016
- + WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Revised 4th Edition 2017
- + Klampfl et al. Somatic Mutations of Calreticulin in Myeloproliferative Neoplasms N Engl J Med 2013
- + James, C., et al. (2005) A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. Nature 434, 1144.
- + Levine, R.L., et al. (2005) Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. Cancer Cell 7, 387.
- + Kralovics, R., et al. (2005) A gain of function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. N. Engl. J. Med. 352, 1779.
- + Baxter, E.J., et al. (2005) Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. Lancet 36, 1054
- + Pietra D. et al. Somatic mutations of JAK2 exon 12 in patients with JAK2 (V617F)-negative myeloproliferative disorders. Blood 2008
- + Nangalia, J., et al. (2013) Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. N. Engl. J. Med. 369, 2391.
- + Arber, D.A., et al. (2016) The 2016 revision to the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood 127, 2391.
- + Jemal A, et al. Cancer Statistics, 2008
- + JJM van Dongen Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936 Leukemia 2003
- + JHJM van Krieken et al. Improved reliability of lymphoma diagnostics via PCR-based clonality testing: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936 Leukemia 2007
- + AW Langerak et al. EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations Leukemia 2012