

LINEE DI INDIRIZZO DIAGNOSTICO-TERAPEUTICHE REGIONALI

LABORATORIO DI DIAGNOSTICA SPECIALISTICA INTEGRATA DELLE NEOPLASIE EMATOLOGICHE

La presente Linea di Indirizzo Diagnostico-Terapeutica Regionale (LIDTR), promossa dalla Commissione LABORATORIO, è stata inoltrata al Coordinatore Tecnico Scientifico della REV (Prof. Mauro Krampera) dal Dr. Omar Perbellini, dalla D.ssa Laura Bonaldi e dal Prof. Marco Pizzi (Coordinatori della Commissione) il 16/6/2025 (*prima versione*) e il 31/8/2025 (*dopo revisione esterna*).

N° rev: 0 (prima emissione)	Data di prima approvazione da parte della Commissione Coordinamento della REV: 25/09/2025
	Data di approvazione da parte della Regione e formalizzazione con nota regionale di gennaio 2026
	Data di applicazione: a partire da 30 giorni successivi alla data di approvazione

CONTENUTI

1. Glossario	4
2. Gruppo di lavoro	6
3. Scopo e Destinatari	7
4. Indicazioni generali per la valutazione cito/istologica, fenotipica e citogenetico-molecolare nelle neoplasie ematologiche	7
4.1 Indicazioni generali per la valutazione citologica del midollo osseo e del sangue periferico	7
4.2 Indicazioni generali per la valutazione istologica del midollo osseo	8
4.3 Indicazioni generali per la valutazione istologica di linfonodi	8
4.4 Indicazioni per l'analisi immunofenotipica nelle neoplasie ematologiche	9
4.5 Indicazioni per l'analisi citogenetica e l'analisi FISH nelle neoplasie oncoematologiche	10
4.6 Indicazioni per l'analisi molecolare nelle neoplasie oncoematologiche	11
5. Leucemie Acute	12
5.1 Valutazione citologica/istologica del midollo osseo	12
5.2 Valutazione immunofenotipica	15
5.3 Citogenetica delle leucemie mieloidi acute	18
5.4 Genetica Molecolare delle leucemie mieloidi acute	22
5.5 Citogenetica e genetica molecolare delle leucemie linfoblastiche acute	25
6. Sindromi mielodisplastiche	30
6.1 Valutazione citologica/istologica del midollo osseo	30
6.2 Valutazione immunofenotipica	33
6.3 Valutazione citogenetica	35
6.4 Valutazione molecolare	37
7. Linfomi di Hodgkin	42
7.1 Valutazione citologica/istologica	42
7.2 Valutazione immunofenotipica	45
7.3 Valutazione genetica	45
8. Linfomi non-Hodgkin	47
8.1 Valutazione citologica/istologica	48
8.2 Valutazione immunofenotipica	61
8.3 Citogenetica e genetica molecolare	62
8.4 Malattia di Castleman	65
9. Leucemia Linfatica Cronica	69
9.1 Valutazione citologica/istologica del midollo osseo	69

9.2 Valutazione immunofenotipica	70
9.3 Valutazione Genetica	75
9.4 Analisi molecolare	77
10 Mieloma Multiplo e discrasie plasmacellulari	82
10.1 Valutazione citologica/istologica del midollo osseo	82
10.2 Valutazione immunofenotipica	83
10.3 Valutazione Genetica	86
11 Leucemia Mieloide Cronica	89
11.1 Valutazione citologica/istologica del midollo osseo	89
11.2 Valutazione immunofenotipica	90
11.3 Valutazione Genetica	91
12 Neoplasie Mieloproliferative Croniche Philadelphia-negative	96
12.1 Valutazione citologica/istologica del midollo osseo	96
12.2 Immunofenotipo	99
12.3 Citogenetica	101
12.4 Analisi Molecolare	102
12.5 Alterazioni genetiche nei disordini eosinofili	105
13 Mastocitosi	107
13.1 Valutazione citologica/istologica del midollo osseo	108
13.2 Valutazione immunofenotipica	109
13.3 Valutazione Genetica	110
14 Bibliografia	113
15 Modalità di diffusione	120
16 Monitoraggio della LIDTR: definizione degli indicatori	120
17 Verifiche, revisioni, raccolta dati	120

1. Glossario

ACA/Ph+	Alterazioni cromosomiche aggiuntive in Ph+	IMWG	International Myeloma Working Group
AITL	Linfoma angioimmunoblastico	IPSS	International Prognostic Scoring System
ALCL	Linfoma anaplastico a grandi cellule	IPSS-M	Molecular International Prognostic Scoring System
ASO-qPCR	PCR quantitativa -Allele specifica	IPSS-R	International Prognostic Scoring System - Revised
ATLL	Leucemia/linfoma a cellule T dell'adulto	ISCN	International System for Human Cytogenomic Nomenclature
AUL	Leucemie acute inclassificabili	ITD	Internal tandem duplication
BOM	Biopsia osteomidollare	LAIP	Identificazione di fenotipi leucemia-associati
BPDCN	Neoplasia a cellule plasmocitoidi dendritiche blastiche	LB	Linfoma di Burkitt
CCA/Ph-	Cromosomiche clonali in cellule Philadelphia negative	LBL	Linfoma linfoblastico
CEL	Leucemia eosinofila cronica	LH	Linfoma di Hodgkin
CHIP	Clonal hematopoiesis of indeterminate potential	LLA	Leucemie linfoblastiche acute
cHL	Linfoma di Hodgkin classico	LLC	Leucemia linfatica cronica
CTC	Circulating Tumor Plasma Cells	LLOQ	Lower limit of quantification
ddPCR	Digital droplet polymerase chain reaction	LMA	Leucemie mieloidi acute
DfN	Fenotipi diversi dal normale	LMC	Leucemia mieloide cronica
DLBCL	Linfoma B diffuso a grandi cellule	LNH	Linfomi non-Hodgkin
dPCR	Digital PCR	LOD	Limit of Detection
ELN	European Leukemia Network	LPL	Linfoma linfoplasmocitoide
ENKTL	Linfoma a cellule T/NK extra-nodale	MC	Malattia di Castleman
FISH	Fluorescence in situ hybridization	MCL	Linfoma delle cellule mantellari
FL	Linfoma follicolare	M-CLL	Mutati-CLL
HCL	Leucemia a cellule capellute	MCM	Malattia di Castleman multicentrica
HES	Sindrome ipereosinofila idiopatica	MCU	Malattia di Castleman unicentrica
HGBL	Linfoma B di alto grado	MDS	Sindromi mielodisplastiche/neoplasie mielodisplastiche
HMR	High-molecular-risk	MEITL	Linfoma a cellule T intestinale epiteliotropo monomorfo
HRS	Cellule di Hodgkin e Reed-Sternberg	MFP	Mielofibrosi Primitiva
ICC	International Consensus Classification	MGUS	Gammopatia monoclonale di significato indeterminato
IGHV	Regione variabile dei geni della catena pesante delle immunoglobuline	MLN-eo-TK	Neoplasie mieloidi/linfoidi con eosinofilia e fusioni dei geni tirosin kinasici
IL-2	Interleuchina 2	MM	Mieloma multiplo
IMCM	Malattia di Castleman multicentrica idiopatica	MPAL	Leucemie acute con fenotipo misto
IMR	Individual Molecular Response		
IMS	International Myeloma Society		

MPN	Neoplasie mieloproliferative	qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
MRD	Measurable residual disease, malattia residua misurabile	R2-ISS	Second Revised International Staging System
MS	Mastocitosi sistemiche	REV	Rete Ematologica Veneta
MS-AMM/AME	Mastocitosi sistemica associata a neoplasia mieloide/ematologica	R-ISS	Revised International Staging System
MW	Macroglobulinemia di Waldenström	RT-dPCR	Reverse transcription digital PCR
MZL	Linfoma della zona marginale	RT-PCR	PCR quantitativa real-time
NGF	Next generation flow	RT-qPCR	Reverse Transcription quantitative polymerase chain reaction
NGS	Next Generation Sequencing	SHM	Mutazioni somatiche
NLPBL	Linfoma a cellule B a predominanza linfocitaria nodulare	SLL	Linfoma a piccoli linfociti
NLPHL	Linfoma di Hodgkin a predominanza linfocitaria nodulare	T/NK-LGLL	Leucemia a linfociti T o NK grandi e granulati
OS	Overall survival	TCR	Recettore T per l'antigene
PAS	Acido periodico di Schiff	TE	Trombocitemia Essenziale
PCR	Polymerase chain reaction	TKD	Tirosin kinase domain
PFS	Progression-free survival	T-LGL	Leucemia a grandi linfociti granulari T
PTCL, NOS	Linfoma/leucemia a cellule T dell'adulto e i linfomi a cellule T periferiche non altrimenti specificati	T-PLL	Leucemia prolinfocitica T
PTD	Partial tandem duplication	T-PLL	Leucemia prolinfocitica a cellule T
PV	Policitemia Vera	TTFT	Time to first treatment, tempo al primo trattamento
		U-CLL	Non mutati-CLL
		U-MRD	MRD non identificabile
		VAF	Variant allele frequency
		WHO	World Health Organization

2. Gruppo di lavoro

Partecipanti	Struttura	Ruolo	Contatto
Laura Bonaldi	UOC Immunologia e Diagnostica Molecolare Oncologica, IOV, Padova	Dirigente Medico Coordinatore	laura.bonaldi@iov.veneto.it
Omar Perbellini	UOSD Genetica Medica e Genomica, AULSS8 Berica	Dirigente Medico, Coordinatore	omar.perbellini@aulss8.veneto.it
Marco Pizzi	UOC Anatomia Patologica, AOUP Padova	Professore Associato, Coordinatore	marco.pizzi.1@unipd.it
Matilde Cacciatore	UOC Anatomia e Istologia Patologica, AULSS2 Treviso	Dirigente Medico	matilde.cacciatore@aulss2.veneto.it
Marta Campo Dell'Orto	UOC Anatomia e Istologia Patologica, AULSS2 Treviso	Dirigente Biologo	marta.campodellorto@aulss2.veneto.it
Ilaria Cavallari	UOC Immunologia e Diagnostica Molecolare Oncologica IOV, Padova	Dirigente Biologo	ilaria.cavallari@iov.veneto.it
Giovanna De Matteis	UOC Laboratorio Analisi, AOUI Verona	Dirigente Biologo	giovanna.dematteis@aovr.veneto.it
Laura Del Pup	UOC Medicina Trasfusionale, AULSS2 Treviso	Dirigente Biologo	laura.delpup@aulss2.veneto.it
Monica Facco	UOC Ematologia, AOUP Padova	Professore Associato	monica.facco@unipd.it
Barbara Famengo	UOC Anatomia e Istologia Patologica, AULSS 8 Berica	Dirigente Medico	barbara.famengo@aulss8.veneto.it
Ilaria Giaretta	UOC Ematologia, ULSS 8 Berica	Dirigente Biologa	ilaria.giaretta@aulss8.veneto.it
Elisa Pagnin	UOC Ematologia, AOUP Padova	Dirigente Chimico	elisa.pagnin@aopd.veneto.it
Francesco La Marra	UOC Anatomia e Istologia Patologica, AULSS3 Mestre	Dirigente Medico	francesco.lamarra@aulss3.veneto.it
Annalisa Martines	UOC Immunologia e Diagnostica Molecolare Oncologica IOV, Padova	Dirigente Biologo	annalisa.martines@iov.veneto.it
Emanuela Meneghelli	UOC Laboratorio Analisi, AOUI Verona	Dirigente Biologo	emanuela.meneghelli@aovr.veneto.it
Elisabetta Novella	UOSD Diagnostica Genetica e Genomica, AULSS 8 Berica	Dirigente Biologo	elisabetta.novella@aulss8.veneto.it
Giorgia Pantano	UOC Medicina di Laboratorio, ULSS3 Mestre	Dirigente Biologo	giorgia.pantano@aulss3.veneto.it
Alice Parisi	UOC Anatomia Patologica, AOUI Verona	Dirigente Medico	alice.parisi@aovr.veneto.it
Marco Pocci	UOC Anatomia Patologica CFV IOV	Dirigente Medico	marco.pocci@iov.veneto.it
Manuela Riccardi	UOC Anatomia e Istologia Patologica, AULSS3, Venezia	Dirigente Biologo	manuela.riccardi@aulss3.veneto.it
Anna Russignan	UOC Ematologia, AOUI Verona	Tecnico funzionario socio-sanitario	anna.russignan@univr.it

Cristina Salbe	UOSD Genetica e Citogenetica, AULSS3 Mestre	Dirigente Biologo	sai_cristina.salbe@aulss3.veneto.it
Lucia Zanatta	UOC Anatomia e Istologia Patologica, AULSS2 Treviso	Dirigente Biologo	lucia.zanatta@aulss2.veneto.it

3. Scopo e destinatari

Lo scopo del presente documento è offrire una panoramica chiara, aggiornata e dettagliata delle attività svolte dai laboratori afferenti alla Rete Ematologica Veneta (REV), con particolare riferimento al "chi fa cosa", "dove" e "come", nell'ambito delle Linee di Indirizzo Diagnostico-Terapeutiche Regionali (LIDTR) approvate dalla Regione Veneto.

Il documento è rivolto sia agli ematologi che necessitano di orientarsi tra le diverse strutture di laboratorio per l'invio di esami specialistici o per la definizione di percorsi condivisi di diagnosi e monitoraggio, sia agli altri laboratori territoriali e ospedalieri che collaborano con i centri *hub* nell'ambito della rete regionale.

L'obiettivo è promuovere una maggiore integrazione e collaborazione tra i diversi attori coinvolti nella rete, facilitando l'accesso alle competenze specialistiche presenti nei laboratori hub, la condivisione delle informazioni e l'armonizzazione delle pratiche diagnostiche secondo gli standard previsti dalle LIDTR.

Attraverso una mappatura dettagliata delle competenze, delle tecnologie disponibili e delle modalità di accesso ai singoli laboratori, il documento intende supportare un uso più efficace e appropriato delle risorse della Rete, contribuendo così al miglioramento complessivo della qualità dell'assistenza ematologica erogata sul territorio.

4. Indicazioni generali per la valutazione cito/istologica, fenotipica e citogenetico-molecolare nelle neoplasie ematologiche

Questo capitolo fornisce indicazioni generali per la valutazione citologica, istologica, immunofenotipica, citogenetica e molecolare delle neoplasie ematologiche dell'adulto. Tali specifiche si applicano a tutte le patologie della LIDTR e, ove necessario, sono integrate da raccomandazioni specifiche per ciascuna malattia.

4.1 Indicazioni generali per la valutazione citologica del midollo osseo e del sangue periferico

Per la valutazione delle serie emopoietiche e per il conteggio dei blasti midollari, *gold standard* diagnostico è l'analisi citologica di strisci di sangue midollare. All'esame del midollo osseo, è consigliato affiancare in tutti i casi possibili anche la valutazione citologica del sangue periferico.

Gli strisci citologici di midollo osseo e/o sangue periferico vanno fissati all'aria. Colorazione raccomandata è quella di May-Grunwald/Giemsa. La valutazione citologica del sangue periferico deve considerare almeno 200 cellule nucleate. La valutazione di aspirati midollari deve invece considerare un minimo di 500 cellule nucleate (*Döhner H et al, 2022*). In casi selezionati (e.g. caratterizzazione dei blasti midollari o circolanti), si può ricorrere a colorazioni citochimiche speciali, quali quelle con mieloperossidasi, Sudan black, cloroacetato o naftilacetato esterasi. Tali colorazioni sono di particolare importanza nei casi in cui non siano disponibili analisi citofluorimetriche o immunoistochimiche.

4.2 Indicazioni generali per la valutazione istologica del midollo osseo

La valutazione istologica del midollo osseo si basa su preparati fissati in formalina, decalcificati secondo protocolli standardizzati e inclusi in paraffina.

Le sezioni istologiche devono avere uno spessore indicativo 5 µm e devono essere colorate con ematossilina/eosina e/o Giemsa. Per la valutazione della fibrosi interstiziale, si raccomanda il ricorso a colorazione con impregnazione argentea secondo Gomori. In casi selezionati, si può ricorrere a colorazioni istochimiche aggiuntive, quali la colorazione con acido periodico di Schiff (PAS) o la colorazione con Rosso Congo/tioflavina per la ricerca depositi di sostanza amiloide.

La valutazione morfologica del midollo osseo deve considerare i seguenti parametri: (i) cellularità midollare (i.e. superficie bioptica occupata da elementi emopoietici sul totale della superficie occupata dalle lacune inter-trabecolari); (ii) rapporto mielo:eritroide; (iii) maturazione della granulopoiesi e dell'eritropoiesi; (iv) quantità e caratteristiche citologiche della megacariocitopoiesi; (v) presenza di eventuali infiltrati linfoidi/mastocitari atipici; (vi) presenza di eventuali infiltrati neoplastici di natura non-ematologica; (vii) presenza e grado della fibrosi midollare.

Alla valutazione morfologica deve affiancarsi la caratterizzazione immunoistochimica mediante pannelli specifici per ciascuna patologia e per la risoluzione delle diagnosi differenziali suggerite dai dati clinici o dalla valutazione morfologica (cfr sezioni relative a ciascuna entità).

4.3 Indicazioni generali per la valutazione istologica di linfonodi

L'esame istologico di tessuto linfonodale è di primaria importanza per la diagnosi delle neoplasie linfoidi. In tutti i casi possibili, si raccomanda il ricorso a biopsie escissionali/incisionali di tessuto linfonodale. I prelievi agobiopistici dovrebbero essere limitati ai casi in cui la biopsia chirurgica risulti eccessivamente rischiosa o clinicamente non indicata.

Il tessuto linfonodale deve essere tempestivamente posto in formalina, in modo da evitare eventuali alterazioni preanalitiche da ipofissazione/fissazione ritardata. Alternativamente, il campione può essere inviato a fresco al laboratorio di Anatomia Patologica, assicurandosi che la procedura avvenga in maniera tempestiva e standardizzata.

La valutazione istologica del linfonodo può essere eseguita su campioni in toto o (nel caso di adenopatie voluminose) su prelievi rappresentativi del campione inviato. Le sezioni istologiche devono avere uno spessore indicativo 4-5 µm. Colorazioni standard per la valutazione morfologica del linfonodo sono quella con ematossilina/eosina o, alternativamente, con Giemsa. In base ai reperti morfologici e alle indicazioni cliniche, a tali colorazioni possono aggiungersi colorazioni istochimiche speciali, quali la colorazione con PAS o Grocott (ricerca di miceti), la colorazione di Ziehl-Neelsen (ricerca di micobatteri), o la colorazione con Rosso Congo/tioflavina (ricerca di sostanza amiloide).

La valutazione morfologica del linfonodo deve considerare i seguenti parametri: (i) architettura linfonodale; (ii) citologia delle popolazioni linfoidi; (iii) presenza e caratteristiche di cellule non-linfoidi di accompagnamento; (vi) presenza di eventuali infiltrati neoplastici di natura non-ematologica. Alla valutazione morfologica deve affiancarsi la caratterizzazione immunoistochimica mediante pannelli specifici per ciascuna patologia e per la risoluzione delle diagnosi differenziali suggerite dai dati clinici o dalla valutazione morfologica (cfr sezioni relative a ciascuna entità).

4.4 Indicazioni per l'analisi immunofenotipica nelle neoplasie ematologiche

L'analisi immunofenotipica in ambito ematologico viene eseguita per la diagnosi e/o il monitoraggio delle varie patologie su campioni di sangue midollare o periferico. In casi selezionati, per valutare la localizzazione della patologia in sedi extra ematologiche è possibile studiare il liquido cefalorachidiano (Liquor) o altri liquidi biologici (liq. pleurico, liq. ascitico, umor vitreo).

Di seguito sono riportate le indicazioni tecniche generali per l'esecuzione di uno studio immunofenotipico. Nelle singole sezioni dedicate alle varie patologie saranno successivamente descritti accorgimenti tecnici specifici. Si consiglia inoltre di fare riferimento a documenti di riferimento (Tabella 4.1) (*van Dongen J J M et al, 2012; Kalina T et al, 2012*).

Tabella 4.1.	
Tecnologia per l'analisi consigliata	Citometria multiparametrica, almeno 8 fluorescenze, con pannelli di anticorpi standardizzati/validati
Tipo di materiale consigliato	☐ Aspirato di midollo osseo o prelievo di sangue periferico anticoagulato (Eparina o EDTA) ☐ Liquor stabilizzato (es. TransFix EDTA) ☐ Altri liquidi biologici (EDTA o senza anticoagulante)
Temperatura di conservazione del campione	Temperatura ambiente
Tempi di processazione consigliati	Entro 24-48 dal prelievo
Tipo di processazione	<u>Diagnosi:</u> Marcatura – Lisi – Lavaggio (+ step di permeabilizzazione per Ag intracellulari) <u>Monitoraggio Malattia Residua Misurabile (MRD):</u> ☐ Marcatura – Lisi – Lavaggio (+ step di permeabilizzazione per Ag intracellulari) ☐ Bulk lysis

Numero di eventi acquisiti	<u>Diagnosi</u> : dipende dal tipo di patologia studiata <u>Monitoraggio MRD</u> : dipende dal tipo di patologia studiata
Tempi di refertazione	<u>Diagnosi</u> : dipende dal tipo di patologia studiata <u>Monitoraggio MRD</u> : dipende dal tipo di patologia studiata

4.5 Indicazioni per l'analisi citogenetica e l'analisi FISH nelle neoplasie oncoematologiche

Questo capitolo fornisce indicazioni generali sull'analisi citogenetica classica e molecolare, finalizzate alla valutazione delle alterazioni genetiche acquisite nelle patologie oncoematologiche dell'adulto. Le informazioni qui riportate si applicano a tutte le patologie trattate nei paragrafi successivi e, ove necessario, sono integrate da raccomandazioni specifiche. Il contenuto non ha la pretesa di essere esaustivo e si rimanda, per ulteriori approfondimenti, alla consultazione dei documenti di riferimento più aggiornati e specifici (Tabelle 4.2 e 4.3) (*Rack K A et al, 2019; Akkari Y et al, 2024*).

La descrizione delle singole alterazioni che compongono il cariotipo, la definizione di clone ed il conteggio del numero delle alterazioni cromosomiche seguono la versione più aggiornata della Nomenclatura Internazionale riportata nell'International System for Human Cytogenomic Nomenclature, (ISCN) (*Hastings R J et al, 2024*).

Tabella 4.2. Indicazioni preanalitiche per l'analisi citogenetica	
Tipo di materiale consigliato	Aspirato midollare o sangue periferico (se blastosi periferica) anticoagulati con eparina sodica (concentrazione ottimale 20IU/ml)
Temperatura di conservazione del campione	Conservare e trasportare il prelievo a temperatura ambiente, evitando temperature estreme.
Tempi di processazione	Il campione deve raggiungere il laboratorio nel più breve tempo possibile e non oltre le 24 h dal prelievo.
Tecniche di coltura	Allestire 1-2 colture di $1-2 \times 10^6$ cell/ml a seconda della cellularità del campione, con raccolta delle cellule dopo 24h o 48h di coltura; Per le neoplasie mieloidi le colture non prevedono l'utilizzo di mitogeni, per patologie linfoproliferative si rimanda al paragrafo specifico

Tabella 4.3 Indicazioni analitiche	
Numero di metafasi da analizzare	Almeno 20 metafasi se cariotipo normale
Numero di nuclei per FISH	FISH: almeno 100 nuclei alla diagnosi; almeno 200 nuclei nel monitoraggio
Criteri di clonalità	2 metafasi con la stessa alterazione strutturale, o cromosoma soprannumerario, 3 metafasi in caso di monosomia/perdita di 1 cromosoma
Definizione di cariotipo complesso	≥ 3 alterazioni cromosomiche clonali non correlate
Tempi di refertazione	Citogenetica standard: 95% dei casi urgenti entro 7-10 gg calendario; il 90% della routine entro 21 gg di calendario; FISH rapido: 3 gg lavorativi

4.6 Indicazioni per l'analisi molecolare nelle neoplasie oncoematologiche

In considerazione dell'elevata eterogeneità delle metodiche impiegate e delle specificità biologiche e cliniche proprie di ciascuna entità nosologica, non è possibile fornire indicazioni standardizzate e trasversali per l'esecuzione delle analisi molecolari dei marcatori genetici nelle patologie oncoematologiche. La scelta delle tecniche, dei target molecolari e delle tempistiche analitiche risulta fortemente condizionata dal contesto diagnostico e terapeutico, nonché dallo stadio di malattia e dall'obiettivo clinico (diagnosi, stratificazione prognostica, monitoraggio della malattia residua misurabile o MRD, ecc.).

Nella presente sezione vengono pertanto fornite esclusivamente indicazioni di carattere generale relative alla tipologia di campione biologico più idoneo per le analisi molecolari (Tabella 4.3) e delle tecniche diagnostiche utilizzate nella diagnostica oncoematologica (Tabella 4.4), senza entrare nel merito degli aspetti tecnico-analitici di base. Per le raccomandazioni specifiche, si rimanda ai capitoli dedicati alle singole patologie.

Tabella 4.4 Campione per analisi molecolare	
Tipologia di campione biologico per analisi molecolari su DNA e RNA	Aspirato midollare o sangue periferico (se sufficientemente rappresentativo della patologia) anticoagulato con EDTA; Per le patologie d'organo: tessuto fissato o congelato. Anche i liquidi biologici (es liquor e versamenti) possono essere utilizzati per le analisi molecolari, da inviare in contenitore sterile senza anticoagulanti.
Trasporto e consegna del prelievo	Trasportare il prelievo a temperatura ambiente evitando temperature estreme; il campione deve raggiungere il laboratorio nel più breve tempo possibile, generalmente non oltre le 24 h dal prelievo. Si consiglia di conservare il prelievo a +4°C se il trasporto è differito.

Tabella 4.5. Tipologia di analisi molecolari		
Metodo	Sensibilità	Applicazioni
PCR Qualitativa (RT-PCR)	0.01%	Trascritti di fusione, rileva ma non quantifica
qPCR (PCR quantitativa)	0.001%	Valutazione quantitativa geni di fusione o di varianti genetiche
ddPCR (Digital droplet PCR)	0.0001%	Valutazione quantitativa geni di fusione, varianti genetiche
ASO-PCR (Allele-Specific Oligonucleotide PCR)	1-2%	Alta sensibilità, disegnata su misura sul singolo paziente (per MRD), mutazioni note
Analisi dei frammenti	2%	Utile per inserzioni e delezioni e duplicazioni
Sequenziamento Sanger	10%	Inserzioni, delezioni, duplicazioni, mutazioni puntiformi
Next Generation Sequencing (NGS) (amplicon-based or captured based)	Dipende da copertura e tipo di libreria	Profilazione genica (pannelli mutazionali) per valutazione di varianti genetiche, fusioni geniche, Riarrangimenti IG/TR

5. Leucemie Acute

Le leucemie acute comprendono un ampio spettro di neoplasie ematologiche con caratteristiche clinico-epidemiologiche e biologiche molto variabili. Per quanto riguarda la classificazione e diagnosi delle leucemie acute, una prima e fondamentale distinzione stratifica tali patologie in: (i) leucemie mieloidi acute (LMA); (ii) linfomi (LBL) o leucemie linfoblastiche acute (LLA); (iii) leucemie acute con fenotipo misto (MPAL) o inclassificabili (AUL). All'interno di ciascuna di queste categorie, si distinguono poi numerose entità sulla base di anomalie genetiche ricorrenti, setting clinico di insorgenza, relazione con altre neoplasie ematologiche e specifica linea differenziativa.

Il campo delle leucemie acute è in rapida e continua evoluzione. I criteri applicati per la loro diagnosi fanno attualmente capo alla International Consensus Classification (ICC) 2022 (adottata anche dall'European Leukemia Network [ELN]) e alla 5° edizione della Classificazione WHO delle neoplasie ematologiche (Arber D A et al, 2022; Khoury J D et al, 2022; Döhner H et al, 2022). Tali classificazioni presentano differenze in aspetti rilevanti per la diagnosi soprattutto delle LMA, quali: (i) differenti cut-off nella quota di blasti necessari per la diagnosi di forme con anomalie genetiche ricorrenti; (ii) differenti criteri per la definizione di specifiche entità nosologiche; (iii) differente peso della mutazione di TP53 nella definizione e classificazione del sottotipo di malattia. Per quanto l'impatto di tali divergenze sia spesso limitato, si consiglia di utilizzare nella pratica clinica entrambi gli schemi classificativi per ogni nuova diagnosi di leucemia acuta.

Alla luce delle Classificazioni ICC e WHO 2022, il workup diagnostico delle leucemie acute richiede l'integrazione di multipli parametri clinici, morfologici, fenotipici e citogenetico-molecolari (Arber D A et al, 2022; Khoury J D et al, 2022). Per tale ragione, i seguenti esami sono raccomandati in ogni nuova diagnosi di leucemia acuta: (i) esame citologico di aspirato midollare o di sangue periferico; (ii) analisi fenotipica mediante citofluorimetria di sangue midollare o periferico; (iii) analisi citogenetica di prelievo di sangue midollare o periferico; (iii) analisi molecolari per la ricerca di alterazioni genetiche fondamentali per la diagnosi e stratificazione prognostica/terapeutica. A questi, si consiglia di affiancare l'esame istologico di biopsia osteomidollare (BOM) nei casi specificati nella sezione "Valutazione citologica/istologica del midollo osseo".

5.1 Valutazione citologica/istologica del midollo osseo

Rilievi Clinico-Diagnostici

Gold standard per la diagnosi morfologica di leucemia acuta è l'esame citologico di aspirato midollare o di striscio di sangue periferico. La valutazione citologica è pertanto raccomandata in tutti i casi di sospetta leucemia acuta.

Nella maggior parte dei pazienti, la valutazione citologica è sufficiente per un adeguato conteggio dei blasti e per la diagnosi morfologica di LMA o LLA. In una minoranza di casi, tuttavia, l'esame citologico può essere impossibile o non dirimente (e.g. *punctio sicca* midollare). In tali casi, l'esame istologico di biopsia osteomidollare (BOM) riveste un ruolo diagnostico fondamentale (Döhner H

et al, 2022). La BOM è anche utile per definire il grado di fibrosi midollare (colorazione con impregnazione argentica), per identificare forme rare/inusuali di LMA (e.g. leucemia eritroblastica acuta; leucemia megacarioblastica) e per la diagnosi differenziale con mimi clinici/morfologici di leucemia acuta (e.g. neoplasia a cellule plasmocitoidi dendritiche blastiche [BPDCN]; linfomi B di alto grado; metastasi midollari di neoplasie solide indifferenziate).

Secondo le classificazioni WHO e ICC 2022, la diagnosi morfologica di LMA è posta in presenza di blasti mieloidi $\geq 20\%$ delle cellule nucleate totali. In presenza di specifiche alterazioni genetiche (Tabella 1), la diagnosi di LMA può essere posta anche con conte blastiche $< 20\%$. Per tale ragione, in tutti i casi possibili si raccomanda di integrare il dato morfologico con i risultati delle analisi citogenetico-molecolari.

Nel caso di LMA definite sulla base di specifiche alterazioni genetiche (Tabella 5.1), la classificazione WHO 2022 non richiede una quota minima di mieloblasti per porre diagnosi di LMA. La classificazione ICC 2022 identifica, invece, un cut off del 10% per la diagnosi di LMA. Nei rari casi in cui vi sia una discrepanza tra le due classificazioni (i.e. neoplasia mieloide con anomalie genetiche ricorrenti in LMA e conta blastica $< 10\%$), si consiglia di indicare la categoria diagnostica della malattia secondo ciascuna delle classificazioni in vigore.

Tabella 5.1. Leucemie mieloidi acute con alterazioni genetiche ricorrenti e cutoff di blasti $< 20\%$		
Anomalia genetica	Cutoff di blasti sec. ICC 2022	Cutoff di blasti sec. WHO 2022
t(15;17)(q24.1;q21.2)/ <i>PML::RARA</i> o (per la sola ICC) altri riarrangiamenti di <i>RARA</i>	10%	nessun cutoff
t(8;21)(q22;q22.1)/ <i>RUNX1::RUNX1T1</i>	10%	nessun cutoff
inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22)/ <i>CBFB::MYH11</i>	10%	nessun cutoff
t(9;11)(p21.3;q23.3)/ <i>MLLT3::KMT2A</i> o altri riarrangiamenti di <i>KMT2A</i>	10%	nessun cutoff
t(6;9)(p22.3;q34.1)/ <i>DEK::NUP214</i>	10%	nessun cutoff
inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2)/ <i>GATA2; MECOM(EVI1)</i> o altri riarrangiamenti di <i>MECOM(EVI1)</i>	10%	nessun cutoff
Mutazione di <i>NPM1</i>	10%	nessun cutoff
Mutazione in frame di bZIP di <i>CEBPA</i>	10%	20%
t(1;22)(p13.3;q13.1)/ <i>RBM15::MRTF1</i>	10%	nessun cutoff
t(9;22)(q34.1;q11.2)/ <i>BCR::ABL1</i>	20%	20%

Tabella 5.1. Leucemie mieloidi acute con alterazioni genetiche ricorrenti e cutoff di blasti <20%		
Altre alterazioni ricorrenti rare (sec. ICC 2022)	10%	20%

La diagnosi di LLA/LBL è posta in presenza di infiltrati neoplastici di elementi linfoidi immaturi (linfoblasti) di linea B o T. In campioni di midollo osseo, il cut-off per la diagnosi differenziale tra LBL e LLA è tradizionalmente posto al 25% degli elementi emopoietici totali (infiltrati <25% sono considerati localizzazioni midollari di LBL; infiltrati $\geq 25\%$ identificano invece una LLA).

Nei campioni istologici di BOM o di lesioni extra-midollari, la diagnosi di MPAL e AUL si basa sui medesimi criteri identificati per la valutazione citofluorimetrica (v. sotto).

Rilievi Tecnico-Laboratoristici

Valutazione cito-istologica del sangue periferico e del midollo osseo

Per la valutazione citologica e istologica delle serie emopoietiche e per il conteggio dei blasti mieloidi e/o linfoidi, si rimanda al paragrafo introduttivo del presente documento (paragrafi 4.1 e 4.2). Alla valutazione morfologica deve affiancarsi la caratterizzazione immunoistochimica mediante pannelli volti a quantificare i blasti e a definirne la linea differenziativa. Marcatori di immaturità utili a quantificare la quota blastica sono CD34 e (in minor misura) CD117. Tali marcatori possono non essere espressi in una significativa quota di LMA (e.g. LMA con differenziazione monoblastica). In tali casi, la diagnosi si basa sull'integrazione di reperti morfologici alla BOM, dati citologici e clinico-laboratoristici. Marcatori utili a definire la linea differenziativa della LMA includono:

- MPO (differenziazione mieloide);
- E-Caderina, CD71 e glicoforina (differenziazione eritroide);
- CD61, CD42, CD31 o FVIII (differenziazione megacariocitaria);
- CD68-PGM1, CD14, CD163, CD4, CD56 (differenziazione monoblastica).

Per la diagnosi differenziale con la BPDCN si raccomandano inoltre colorazioni immunoistochimiche per CD303, TCL1 e/o CD304 (e in subordine CD123, CD4 e CD56), secondo i criteri WHO attualmente in vigore (*Döhner H et al, 2022; Khoury J D et al, 2022; Arber D A et al, 2022*).

Pannelli immunoistochimici per la diagnosi di LLA/LBL includono invece CD3 (e altri marcatori di linea T), CD19 (o analoghi marcatori di linea B precoce), TdT e CD34. A seconda dei casi e della linea differenziativa, si consiglia inoltre il ricorso ad altri marcatori di immaturità (e.g. CD10 o CD1a), a marcatori mieloidi aberrantemente espressi in linfoblasti neoplastici (e.g. CD33, CD117) o a pannelli utili a definire la diagnosi differenziale con MPAL/AUL o con linfomi a cellule B o T periferiche di alto grado.

5.2 Valutazione immunofenotipica

Rilievi Clinico-Diagnostici

L'analisi immunofenotipica è fondamentale nell'inquadramento diagnostico delle leucemie acute. Inoltre, la citometria a flusso può essere impiegata nel monitoraggio della MRD e nell'identificazione di target terapeutici (*van Dongen JJM et al, 2012; Gökbuget N et al, 2024; Döhner H et al, 2022*).

Inquadramento diagnostico

Definizione del lineage dei blasti leucemici

L'espressione di specifici marcatori di linea permette la definizione del lineage (Tabella 5.2)

Tabella 5.2 Marcatori fenotipici per la definizione del lineage di leucemia acuta	
Lineage	Antigeni
Mieloide	MPO CD64, CD14, CD11c, Lisozima (almeno 2 antigeni espressi) altri marcatori mieloidi (es. CD117, CD13, CD33, almeno 3 espressi contemporaneamente)
Linfoide B	CD19 e cyCD79a o CD19 e cyCD22
Linfoide T	cyCD3 o CD3 e CD7
Mixed Lineage Acute Leukemia (MPAL)	Coespressione di antigeni di due lineage: Lineage mieloide: mieloperossidasi mieloide o almeno 2 dei seguenti antigeni: esterasi aspecifica, CD11c, CD14, CD64 e lisozima o CD13, CD33 e CD117 contemporaneamente. Lineage B: forte espressione di CD19 più almeno 1 dei seguenti antigeni fortemente espressi: CD79a, cyCD22, CD10, oppure CD19 debole, con almeno 2 dei seguenti antigeni fortemente espressi: CD79a, cyCD22, CD10; Lineage T: cyCD3 o CD3.

Quantificazione della quota blastica

La quantificazione della quota blastica richiede l'utilizzo di marcatori di immaturità da associare ai marcatori di lineage (Tabella 5.3).

Tabella 5.3 Marcatori fenotipici di immaturità

Lineage	Antigeni
Mieloide	CD34, CD117, HLA-DR, CD45dim
Linfoide B	CD34, TdT, CD10, CD45dim
Linfoide T	TdT, CD1a

Definizione del grado di differenziazione

Il grado di differenziazione viene definito mediante lo studio di specifici antigeni espressi durante i vari stadi maturativi di ogni singolo lineage (Tabella 5.4).

Tabella 5.4 Marcatori utili a definire il grado di differenziazione dei lineage emopoietici

Lineage	Antigeni
Mieloide	differenziazione granulocitaria: CD15, CD11b, CD16, CD10, CD35 differenziazione monocitaria: CD64, CD36, CD14, CD300e differenziazione eritroide: CD71, CD105, CD36, CD235a differenziazione megacariocitaria: CD61, CD42a, CD41, CD36 differenziazione basofila: CD123, CD203c, CD22, CD25 differenziazione pDC: CD123, HLA-DR, CD4, CD56
Linfoide B	lo studio della differenziazione B si basa sull'espressione di: CD10, cylgM, slg (kappa o lambda) B-I: CD10 neg, cylgM neg, slg neg B-II: CD10 pos, cylgM neg, slg neg B-III: cylgM pos, slg neg B-IV: slg kappa o lambda pos
Linfoide T	Lo studio della differenziazione T si basa sull'espressione di: CD2 e CD5, CD1a, TCR e CD3 T-I: CD2 e CD5 neg, CD1a neg, TCR e CD3 neg T-II: CD2 e CD5 pos, CD1a neg, TCR e CD3 neg T-III: CD1a pos, TCR e CD3 neg T-IV: CD1a neg, TCR e CD3 pos

Definizione dei fenotipi per il monitoraggio della malattia residua misurabile (MRD)

La definizione di fenotipi utilizzabili per il monitoraggio della malattia residua misurabile (measurable residual disease, MRD) si basa sull'integrazione dell'identificazione di fenotipi

leucemia-associati (LAIP) e di fenotipi diversi dal normale (DfN). Questo permette il monitoraggio di cloni presenti alla diagnosi, ma anche l'identificazione di nuovi cloni emersi durante il trattamento. Lo studio si basa su una caratterizzazione multiparametrica in cui si combinano marcatori di linea, marcatori di differenziazione e marcatori aberranti (tabella 5.5). (*Heuser M et al, 2021; Wood BL et al, 2020; Theunissen P et al, 2017*).

Tabella 5.5 Marcatori utili per la definizione dei fenotipi per il monitoraggio della MMR	
Lineage	Marcatori
Mieloide	CD34, CD117, CD45, CD33, CD13, CD56, CD7, HLA-DR, CD38, CD64, CD11b e CD4
Linfoide B	CD19, CD20, CD10, CD38, CD34, CD58, CD45, CD123, CD66c, CD304, CD15, CD79a, CD24, CD9, CD25 CD13, CD33
Linfoide T	cyCD3, CD5, CD2, CD4, CD8, CD99, CD1a, CD3, TdT

Studio di antigeni target di immunoterapie

L'impiego di immunoterapia (anticorpi monoclonali, bispecifici e CAR-T) nel trattamento delle leucemie acute sta diventando uno standard terapeutico. I marcatori più utili che si consiglia di valutare come target di possibili immunoterapie sono riportati in Tabella 5.6.

Tabella 5.6 Marcatori target di immunoterapia nelle leucemie acute	
Lineage	Marcatori
Mieloide	CD33, CD123
Linfoide B	CD19, CD20
Linfoide T	NA

Rilievi Tecnico-Laboratoristici

Si prega di fare riferimento a quanto riportato nel paragrafo 4.4 e nelle seguenti fonti bibliografiche: *van Dongen JJM et al, 2012; Heuser M et al, 2021; Wood B L et al, 2020; Verbeek M W C et al 2022; Kalina T et al, 2012*).

Tabella 5.7 Specifiche tecniche per l'esecuzione di test fenotipici nelle leucemie acute	
Tecnologia per l'analisi consigliata	Citometria multiparametrica, almeno 8 fluorescenze, con pannelli di anticorpi standardizzati/validati
Tipo di materiale consigliato	Aspirato di midollo osseo anticoagulato (Eparina o EDTA)
Temperatura di conservazione del campione	Temperatura ambiente
Tempi di processazione consigliati	Entro 24-48 dal prelievo
Tipo di processazione	Diagnosi: Marcatura – Lisi – Lavaggio (+ step di permeabilizzazione per Ag intracellulari) Monitoraggio MRD: Marcatura – Lisi – Lavaggio (+ step di permeabilizzazione per Ag intracellulari) o Bulk lysis
Numero di eventi acquisiti	Diagnosi: 105 cellule nucleate Monitoraggio MRD: almeno 5x10 ⁵ cellule nucleate
Tempi di refertazione	Diagnosi: entro 24 ore Monitoraggio MRD: 5 giorni

(van Dongen JJM et al, 2012; Heuser M et al, 2021; Wood B L et al, 2020; Verbeek M W C et al 2022; Kalina T et al, 2012)

5.3 Citogenetica delle leucemie mieloidi acute

Rilevi Clinico-Diagnostici

Le più recenti classificazioni della WHO e dell'ICC della leucemia mieloide acuta definiscono sottotipi di malattia sulla base di specifiche alterazioni genetiche, rendendo indispensabile un approccio diagnostico integrato che combini metodiche citogenetiche e molecolari (Tabella 5.8) (Koury JD et al, 2022; Arber DA et al, 2022).

L'analisi del cariotipo deve consentire l'identificazione delle anomalie cromosomiche associate ai sottotipi di LAM definiti da alterazioni genetiche, contribuendo così a una precisa definizione diagnostica. Nei casi in cui il cariotipo standard risulti di difficile interpretazione — ad esempio in presenza di riarrangiamenti terminali o laddove la risoluzione del bandeggio non consenta di escludere determinate anomalie — è necessario integrare l'analisi con metodiche di citogenetica molecolare, quali l'analisi FISH. L'impiego di sonde specifiche deve essere valutato caso per caso, tenendo conto della robustezza analitica e dei limiti associati a ciascun risultato.

La FISH assume un ruolo particolarmente rilevante nei campioni in cui non sia possibile ottenere un cariotipo valutabile per insufficienza del numero di metafasi analizzabili. In tali situazioni, la FISH consente di escludere sia i riarrangiamenti genetici diagnostici più frequenti, sia alterazioni non bilanciate (numeriche o strutturali) associate a mielodisplasia, garantendo così un corretto inquadramento diagnostico e prognostico.

In linea con le raccomandazioni dell'European LeukemiaNet e considerando le analisi molecolari disponibili a integrazione della citogenetica, è compito del laboratorio predisporre il più ampio e aggiornato armamentario diagnostico (*Döhner H et al, 2022*).

Parallelamente alla definizione diagnostica, cariotipo e FISH devono fornire informazioni complete per la classificazione prognostica del rischio di malattia, secondo i criteri più aggiornati dell'ELN (Tabella 5.9) (*Döhner H et al, 2022*).

Tabella 5.8 Approccio diagnostico integrato per la leucemia mieloide acuta definita da alterazioni genetiche

International Consensus Classification 2022	WHO 2022	Analisi Citogenetica/ FISH (X=applicabile)	Analisi Molecolare ^a (X=applicabile)
Leucemia Acuta Promielocitica (LAP) con t(15;17)(q24.1;q21.2)/PML::RARA	Leucemia Acuta Promielocitica con fusione PML::RARA	X ^b	X
LAP con altri riarrangiamenti di RARA		X	(X) NGS RNA
Leucemia Mieloide acuta (LAM) con t(8;21)(q22;q22.1)/RUNX1::RUNX1T1	LAM con fusione RUNX1::RUNX1T1	X	X
LAM con inv(16)(p13.1;q22) or t(16;16)(p13.1;q22)/CBFB::MYH11	LAM con fusione CBFB::MYH11	X	X
LAM con t(9;11)(p21.3;q23.3)/MLLT3::KMT2A	LAM con riarrangiamento di KMT2A	X	X
LAM con altri riarrangiamenti di KMT2A		X	X
LAM con t(6;9)(p22.3;q34.1)/DEK::NUP214	LAM con fusione DEK::NUP214	X	X
LAM con inv(3)(q21.3;q26.2) o t(3;3)(q21.3;q26.2)/GATA2::MECOM(EVI1)	LAM con riarrangiamento di MECOM	X	(X) NGS RNA
LAM con altri riarrangiamenti di MECOM		X	(X) NGS RNA
LAM con altre rare traslocazioni ricorrenti compreso il riarrangiamento di NUP98 e la fusione RBM15::MRTF1 ^c	LAM con alter alterazioni genetiche (fusioni rare)	X	(X) NGS RNA
LAM con t(9;22)(q34.1;q11.2)/BCR::ABL1	LAM con fusione BCR::ABL1	X	X
LAM con mutazione di NPM1	LAM con mutazione di NPM1		X
LAM con mutazione in-frame del dominio bZIP di CEBPA	LAM con mutazione di CEBPA		X
LAM con mutazione di TP53			X
LAM con mutazioni dei geni associati a mielodisplasia (ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1, or ZRSR2)	LAM associata a mielodisplasia		X
LAM con alterazioni citogenetiche associate a mielodisplasia ^d		X	

^a Si fa riferimento alle metodiche molecolari raccomandate da ELN 2022 e riportate nella tabella 3

^b può essere criptica al bandeggio e anche alla FISH

^c LAM con t(1;3)(p36.3;q21.3)/PRDM16::RPN1;

LAM con t(3;5)(q25.3;q35.1)/NPM1::MLF1;

LAM con t(8;16)(p11.2;p13.3)/KAT6A::CREBBP;

LAM con t(1;22)(p13.3;q13.1)/RBM15::MRTF1;

LAM con t(5;11)(q35.2;p15.4)/NUP98::NSD1;

LAM con t(11;12)(p15.4;p13.3)/NUP98::KMD5A;

LAM con NUP98 e altri partner;

LAM con t(7;12)(q36.3;p13.2)/ETV6::MNX1;

LAM con t(10;11)(p12.3;q14.2)/PICALM::MLLT10;

LAM con t(16;21)(p11.2;q22.2)/FUS::ERG;

LAM con t(16;21)(q24.3;q22.1)/RUNX1::CBFA2T3;

LAM con inv(16)(p13.3;q24.3)/CBFA2T3::GLIS2

^dDefinito dalla presenza di cariotipo complesso (≥3 alterazioni cromosomiche clonali in assenza di altre alterazioni che definiscono i sottotipi su base genetica) e dalle alterazioni: del(5q)/t(5q)/add(5q), -7/del(7q), +8, del(12p)/t(12p)/add(12p), i(17q), -17/add(17p) or del(17p), del(20q), e/o idic(X)(q13).

Tabella 5.9 Significato prognostico delle alterazioni cromosomiche e molecolari			
Categoria di Rischio	Alterazioni cromosomiche	Alterazioni molecolari	Note
Favorevole	-t(8;21)(q22;q22.1) -inv(16)(p13.1q22)	- <i>RUNX1::RUNX1T1</i> - <i>CBFB::MYH11</i> -Mutazione di <i>NPM1</i> in assenza di <i>FLT3 ITD</i> -Mutazione in frame nel dominio bZIP del gene <i>CEBPA</i>	
Intermedio	-t(9;11)(p21.3;q23.3) ^a -Alterazioni citogenetiche non classificate come favorevoli o sfavorevoli	- <i>MLLT3::KMT2A</i> -Mutazioni di <i>NPM1</i> e <i>FLT3 ITD</i> -Mutazione di <i>FLT3</i> in assenza di mutazione di <i>NPM1</i> -Alterazioni molecolari non classificate come favorevoli o sfavorevoli	^a mantiene il significato anche in associazione a mutazioni sfavorevoli
Sfavorevole	-t(6;9)(p23.3;q34.1) -t(v;11q23.3) -t(9;22)(q34.1;q22.1) -t(8;16)(p11.2;p13.3) -inv(3)(q21.3q26.2) o t(3;3)(q21.3;q26.2) -t(3q26.2;v) -monosomia 5/del5q -monosomia 7 -monosomia 17 /alterazioni di 17p -Cariotipo complesso -Cariotipo monosomico	- <i>DEK::NUP241</i> -Riarrangiamento di <i>KMT2A</i> - <i>BCR::ABL1</i> - <i>KAT6A::CREBBP</i> - <i>GATA, MECOM (EVI1)</i> -Riarrangiamento di <i>MECOM (EVI1)</i> -Mutazioni di <i>ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1</i> e/o <i>ZRSR2</i> [*] -Mutazioni di <i>TP53</i> [§]	Cariotipo complesso: ≥3 alterazioni cromosomiche; Cariotipo monosomico: ≥2 monosomie o 1 monosomia (escluso X,Y) e 1 alterazione strutturale; *In assenza di altre alterazioni classificate come favorevoli §con VAF di almeno 10%

Adattata da Döhner H et al, 2022

Rilievi Tecnico-Laboratoristici

Oltre alle indicazioni generali riportate nel paragrafo introduttivo (Tabella 4.3), in merito alla diagnostica citogenetica l'ELN formula le seguenti raccomandazioni:

- I risultati dell'analisi citogenetica in pazienti con LAM alla diagnosi devono essere resi disponibili entro 5–7 giorni.
- In assenza di metafasi analizzabili o in caso di impossibilità a definire un cariotipo, è raccomandabile l'impiego di tecniche FISH come alternativa per l'identificazione o l'esclusione di specifiche anomalie genetiche di rilevanza prognostica, quali le fusioni *RUNX1::RUNX1T1*, *CBFB::MYH11*, i riarrangiamenti dei geni *MECOM* e *KMT2A*, nonché le alterazioni associate a mielodisplasia.
- Ai fini della stratificazione prognostica, un cariotipo complesso è definito dalla presenza di tre o più alterazioni citogenetiche clonali non correlate, escludendo però quelle che

definiscono specifici sottotipi di AML. Inoltre, non rientrano nella definizione i casi caratterizzati da tre o più trisomie isolate, in assenza di alterazioni strutturali.

- Si definisce cariotipo monosomico la presenza di due o più monosomie (con esclusione di quelle a carico dei cromosomi sessuali), oppure di una monosomia autosomica accompagnata da almeno un'anomalia strutturale aggiuntiva, escludendo le alterazioni associate alle leucemie con coinvolgimento dei core binding factors (*Döhner H et al, 2022*).

5.4 Genetica Molecolare delle leucemie mieloidi acute

Rilievi Clinico-Diagnostici

Il laboratorio di biologia molecolare deve essere in grado di eseguire saggi analitici adeguati alla rilevazione delle alterazioni genetiche caratteristiche dei sottotipi di leucemia definiti da specifici marcatori molecolari, al fine di garantire una diagnosi accurata (*Koury J D et al, 2022; Arber D A et al, 2022*). Inoltre, è responsabile della fornitura dei dati essenziali per un corretto inquadramento prognostico, sulla base del modello prognostico più aggiornato disponibile. A tal fine, si fa riferimento alle raccomandazioni elaborate nel 2022 da un comitato internazionale di esperti per conto dell'European LeukemiaNet, sintetizzate nella Tabella 5.9 (*Döhner H et al, 2022*).

La valutazione diagnostica si avvale di saggi qualitativi finalizzati all'identificazione sia di mutazioni note, localizzate in regioni specifiche dei singoli geni, sia di mutazioni non note, da ricercare nell'intera regione codificante. Spesso risulta necessario combinare metodologie complementari per garantire un'analisi accurata e completa. L'approccio può essere mirato su singoli geni oppure esteso a livello multigenico, con la scelta della strategia influenzata dai tempi necessari per la refertazione, considerando l'urgenza di fornire un risultato diagnostico tempestivo. Un principio analogo si applica anche all'identificazione dei riarrangiamenti genici (Tabella 5.3).

Il laboratorio di biologia molecolare deve inoltre essere in grado di monitorare la MRD mediante l'analisi dei marcatori genetici validati a tale scopo, adottando saggi in grado di raggiungere una sensibilità almeno pari a 10^{-3} , come raccomandato dall'ELN. Attualmente, la metodica di riferimento è rappresentata dalla PCR quantitativa real-time (RT-qPCR), che consente di raggiungere livelli di sensibilità pari a 10^{-4} – 10^{-5} . Altre tecniche, come la digital PCR (dPCR) o il sequenziamento di nuova generazione (NGS), non sono ancora considerate sufficientemente affidabili per l'impiego routinario nella pratica clinica (*Döhner H et al, 2022*).

Sono disponibili saggi standardizzati per quattro marcatori principali, che coprono circa il 40–50% dei casi di leucemia mieloide acuta: *NPM1*, *CBFB::MYH11*, *RUNX1::RUNX1T1* e *PML::RARA*. Sono inoltre identificabili, mediante RT-qPCR, altri trascritti meno frequenti, attualmente non ancora pienamente validati, come indicato nella Tabella 5.11 (*Döhner H et al, 2022*).

Tabella 5.10 Analisi molecolari dei marcatori genetici nella leucemia mieloide acuta

MARCATORI	GRADO DI RACCOMANDAZIONE	METODICA SUGGERITA	TEMPO DI REFERTAZIONE
Analisi mutazionale			
Ricerca di mutazioni gene <i>FLT3</i> (internal tandem duplication, ITD e mutazioni del dominio tirosinchiasico, TKD)	indispensabile	PCR+EC/Sanger (NGS)	3-5gg
Ricerca di mutazioni gene <i>NPM1</i> (esone 11)		EC/AsoPCR/NGS	
Ricerca di mutazioni geni <i>IDH1</i> ed <i>IDH2</i>		Sanger/Real-time PCR/NGS	
Ricerca di mutazioni geni <i>CEBPA</i> , <i>DDX41</i> , <i>TP53</i> , <i>ASXL1</i> , <i>BCOR</i> , <i>EZH2</i> , <i>RUNX1</i> , <i>SF3B1</i> , <i>SRSF2</i> , <i>STAG2</i> , <i>U2AF1</i> , <i>ZRSR2</i>	indispensabile	NGS	Entro la fine del primo ciclo di terapia
Analisi fusioni geniche			
<i>PML::RARA/t(15;17)(q24.1;q21.2)</i>	indispensabile/ raccomandato*	Real-time PCR/RT-PCR/Multiplex PCR	1-2gg
<i>RUNX1::RUNX1T1/t(8;21)(q22;q22.1)</i>			3-5gg
<i>CBFB::MYH11/inv(16)(p13.1;q22), t(16;16)(p13.1;q22)</i>			
<i>KMT2A</i> riarrangiamenti			
<i>BCR::ABL/t(9;22)(q34.1;q11.2)</i>			
Altre fusioni geniche			
Altre mutazioni (2° livello)			
<i>ANKRD26</i> , <i>BCORL1</i> , <i>BRAF</i> , <i>CBL</i> , <i>CSF3R</i> , <i>DNMT3A</i> , <i>ETV6</i> , <i>GATA2</i> , <i>JAK2</i> , <i>KIT</i> , <i>KRAS</i> , <i>NRAS</i> , <i>NF1</i> , <i>PHF6</i> , <i>PPM1D</i> , <i>PTPN11</i> , <i>RAD21</i> , <i>SETBP1</i> , <i>TET2</i> , <i>WT1</i>	raccomandato	NGS	

*ELN considera un approccio integrato molecolare/citogenetica per la valutazione dei riarrangiamenti genici in particolar modo quando è disponibile una terapia *ad hoc*.

Per *CEBPα* specificare il tipo di variante (bZIP in frame o non bZIP)

Abbreviazioni: PCR: Polimerase Chain Reaction; EC: Elettroforesi Capillare, NGS: Next Generation Sequencing; AsoPCR:

Allele Specif Oligonucleotide PCR; RT-PCR: PCR a trascrittasi inversa;

Rilievi Tecnico-Laboratoristici

☐ Valutazione alla diagnosi

La valutazione delle mutazioni di *FLT3* deve comprendere sia l'analisi delle duplicazioni (Internal Tandem Duplication, ITD), sia l'analisi delle mutazioni del dominio tirosinchinasico (TKD). Relativamente alle prime, ELN raccomanda di continuare ad utilizzare l'elettroforesi capillare, anche nel caso in cui il risultato derivi da un'analisi NGS.

Per le mutazioni di *CEBPA* si raccomanda di riportare il tipo di mutazione in quanto solo le mutazioni *in frame* che coinvolgono la regione bZIP del gene, a prescindere siano esse mono o bi-alleliche, hanno valore prognostico.

Nell'analisi dei risultati dei pannelli multigenici è necessario porre attenzione a varianti che potrebbero essere di natura germinale per le implicazioni cliniche che ne derivano, soprattutto nel caso di pazienti candidabili a trapianto allogenico da donatore familiare (*Gurnari C et al, 2023*). In caso di sospetta variante germinale è necessario riferire il paziente ad una struttura di genetica medica che abbia predisposto un percorso di counselling e di valutazione genetica per la definizione della natura di queste varianti. Si sottolinea che oltre ai geni più frequentemente coinvolti nei disordini mieloidi associati a predisposizione ereditaria quali: *CEBPA*, *DDX41*, *TP53*, *GATA2*, *RUNX1*, *ANKRD26*, *ETV6*, altri geni possono essere coinvolti e che l'età di insorgenza non rappresenta un criterio discriminante sulla natura di queste varianti. A tal proposito, si rimanda alle indicazioni elaborate da un gruppo di esperti internazionali per quanto riguarda i criteri per la selezione dei pazienti da sottoporre a screening per le varianti germinali ed il tipo di analisi da condurre (*Gurnari C et al, 2023*).

☐ **Valutazione della MRD**

Oltre alle raccomandazioni da parte dell'European LeukemiaNet (ELN) specifici per la LAM (*Döhner H et al, 2022*) si rimanda per gli aspetti più tecnici e metodologici al documento del 2021 da parte del gruppo di lavoro dell'ELN dedicato alla valutazione della MRD. (*Heuser M et al, 2021*) (Tabella 5.11).

Tabella 5.11 MRD nella leucemia mieloide acuta con metodiche molecolari			
Marcatori di MRD per cui ci sono saggi analitici validati	Metodo	Sensibilità	Materiale
<i>NPM1</i> , <i>CBFB::MYH11</i> , <i>RUNX1::RUNX1T1</i>	RT-qPCR	10 ⁻⁴ -10 ⁻⁵	5mL di Aspirato midollare /10 mL di Sangue periferico*
<i>PML::RARA</i>	RT-qPCR	10 ⁻⁴ -10 ⁻⁵	5mL di Aspirato midollare /10 mL di Sangue periferico*
Marcatori di MRD meno validati			
<i>KMT2A::MLLT3</i> , <i>DEK::NUP214</i> , <i>BCR::ABL1</i> , <i>WT1 (espressione)</i>	RT-qPCR	10 ⁻⁴ -10 ⁻⁵	5mL di Aspirato midollare /10 mL di Sangue periferico*

*la sensibilità nel sangue periferico può essere 5-10 volte inferiore rispetto all'aspirato midollare

Tabella 5.12 LMA: Laboratori di afferenza per gli Hub ematologici della REV

	AOUP PADOVA	AOUI VERONA	ULSS2 TREVISO	ULSS3 MESTRE- VENEZIA	ULSS8 VICENZA	IOV CFV
Valutazione patologica	X	X	X		X	
Citometria a flusso	X	X	X	X	X	Lab ULSS2
Citometria a flusso, MRD	X	X	X	X	X	Lab ULSS2
Analisi Citogenetica	Lab IOV PD	X Lab IOV PD	X	Lab IOV PD	X	Lab ULSS2
Analisi Molecolare diagnosi	Lab IOV PD	X Lab IOV PD	X	Lab IOV PD	X	Lab ULSS2
NGS	Lab IOV PD	Lab IOV PD	X	Lab IOV PD	X	Lab ULSS2
Analisi molecolare, MRD	Lab IOV PD	X Lab IOV PD	X	Lab IOV PD	X	Lab ULSS2

X = presso il proprio laboratorio di competenza

5.5 Citogenetica e genetica molecolare delle leucemie linfoblastiche acute

Rilievi Clinico-Diagnostici

Negli ultimi anni, la definizione della leucemia linfoblastica acuta (LLA) ha subito una rapida evoluzione grazie all'identificazione di nuovi sottotipi caratterizzati da specifiche alterazioni genetiche, contribuendo così a delineare una patologia estremamente eterogenea dal punto di vista biologico (*Döhner H., 2022; Arber DA., 2022*).

L'elevata complessità genetica che ne deriva richiede l'impiego di sofisticate indagini molecolari, capaci di rilevare un ampio spettro di anomalie, tra cui riarrangiamenti genici, mutazioni puntiformi, alterazioni del numero di copie geniche e pattern di espressione genica, in stretta integrazione con le analisi citogenetiche. Tuttavia, la relativa rarità della LLA nell'adulto limita, di fatto, la disponibilità dei pannelli diagnostici molecolari più completi a pochi centri di riferimento presenti sul territorio italiano, in particolare per quanto concerne l'identificazione del sottotipo Ph-like e delle LLA di linea T. In compenso, i laboratori della Rete Ematologica Veneta (REV) garantiscono uno screening preliminare dei marcatori genetici più comuni, quali il riarrangiamento *BCR::ABL1* e alcuni riarrangiamenti di *KMT2A*.

Nonostante i limiti intrinseci legati a questa patologia, l'analisi del cariotipo deve essere sempre eseguita e, ove necessario, integrata mediante metodiche di citogenetica molecolare, quali FISH (Tabella 5.13). È fondamentale assicurare una stretta integrazione tra i laboratori di caratterizzazione immunofenotipica e i laboratori di genetica, poiché la definizione del lineage della malattia indirizza le successive indagini diagnostiche molecolari e citogenetiche.

Oltre all'inquadramento diagnostico, la caratterizzazione genetica della LLA riveste un ruolo centrale nella classificazione prognostica della malattia e rappresenta il presupposto per la valutazione della MRD. Il laboratorio di citogenetica deve essere in grado di identificare i sottotipi sulla base della ploidia e di definire la presenza di un cariotipo complesso, inteso come la presenza di cinque o più alterazioni cromosomiche, escludendo tuttavia i casi caratterizzati da traslocazioni diagnostiche specifiche. Questa attività si integra con il lavoro del laboratorio di genetica molecolare, responsabile dell'identificazione dei principali riarrangiamenti, come *BCR::ABL1* e le traslocazioni di *KMT2A* (con particolare attenzione a *KMT2A::AFF1*) (Tabella 5.14). Per la caratterizzazione del sottotipo Ph-like, si rimanda ai centri di riferimento nazionali.

La valutazione della MRD viene effettuata mediante metodiche molecolari di tipo quantitativo, basate sulla generazione di sonde paziente-specifiche in grado di rilevare i riarrangiamenti dei geni delle immunoglobuline o dei recettori dei linfociti T identificati al momento della diagnosi. Questo tipo di analisi viene eseguito esclusivamente presso laboratori di riferimento certificati a livello nazionale.

Nei casi di LLA Ph+, è inoltre possibile monitorare i livelli del trascritto e1a2 di *BCR::ABL1*, secondo i criteri stabiliti dal consorzio EuroMRD, mantenendo in parallelo anche la quantificazione della MRD con uno dei due metodi più standardizzati, per ovviare ai limiti legati alla variabilità del numero di trascritti di RNA presenti nelle cellule leucemiche (Gökbuget N., 2024).

Rilievi Tecnico-Laboratoristici

Sia per l'analisi citogenetica che per l'analisi molecolare valgono le stesse indicazioni riportate nelle tabelle 4.2, 4.3 e 4.4 del capitolo introduttivo con le seguenti precisazioni:

- a) l'analisi della fusione *BCR::ABL1* deve comprendere i trascritti e1a2 (p190), e13a2 ed e14a2 (p210);
- b) l'analisi molecolare del riarrangiamento di *KMT2A* deve chiaramente indicare quali trascritti il saggio è in grado di rilevare;
- c) nella descrizione del cariotipo è necessario riportare la ploidia del clone e definire il numero di alterazioni che formano il cariotipo complesso;

Nella gestione dell'inquadramento diagnostico e prognostico delle LLA è importante l'integrazione con i risultati derivati dall'analisi immunofenotipica in quanto orienta le successive analisi del laboratorio di biologia molecolare e di citogenetica.

Tabella 5.13 Approccio diagnostico dei più frequenti sottotipi di leucemia linfoblastica dell'adulto caratterizzati da alterazioni genetiche

WHO 2022	ICC 2022	Frequenza negli adulti	Analisi Citogenetica	Analisi Molecolare di 1° livello (lab REV)	Analisi molecolare di 2° livello °
B-ALL/LBL	B-ALL/LBL				
High hyperdiploidy	High hyperdiploidy	7%	X		
Hypodiploidy	Hypodiploidy	2%	X		
	Low hypodiploidy		X		
	Near haploid		X		
<i>BCR::ABL1</i> fusione	<i>t(9;22)(q34;q22.1)/ BCR::ABL1</i>	25%	X	X	
<i>BCR::ABL1</i> -Like	<i>BCR::ABL1</i> -Like con riarrangiamento di <i>ABL1</i>	10-30%			X
	<i>BCR::ABL1</i> -Like con attivazione JAK-STAT				
	<i>BCR::ABL1</i> -Like, NOS				
<i>KMT2A</i> riarrangiamento	<i>t(v;11q23.3)/ riarrangiamento KMT2A</i>	10%	X	X	
<i>TCF3::PBX1</i> fusione	<i>t(1;19)(q23.3;p13.3)/ TCF3::PBX1</i>	3%	X	X	
Altre alterazioni genetiche	Sottotipi distinti: <i>MYC</i> r, <i>DUX4</i> r, <i>MEF2D</i> r, <i>ZNF384 (362)</i> r, <i>NUM1</i> r, <i>UBTF::ATXN7L3/PAN3</i> , <i>CDX2</i> , Mutazione N159Y di <i>IKZF1</i> , Mutazione P580 di <i>PAX5</i>	Variabile			X
T-ALL/LBL	T-ALL/LBL				
Early T Precursori	Early T Precursori e riarrangiamento <i>BCL11B</i>	2%			X
NOS	NOS		(X) dei loci <i>TCR 14q11</i> ; <i>7q34</i>		X

Tabella 5.14 Principali marcatori genetici di significato prognostico nella LLA e approccio analitico

Marcatore genetico	Analisi citogenetica	Genetica molecolare
Ipodiploidia	X	
Cariotipo complesso con ≥ 5 alterazioni cromosomiche	X	
t(9;22)(q34;q11.2)/BCR::ABL1	X	X
t(4;11)(q21;q23.3)/KMT2A::AFF1	X	X
KMT2Ar	X	X

Tabella 5.15 LLA: Laboratori di afferenza per gli Hub ematologici della REV

	AOUP PADOVA	AOUI VERONA	ULSS2 TREVISO	ULSS3 MESTRE- VENEZIA	ULSS8 VICENZA	IOV CFV
Valutazione patologica	X	X	X	X	X	X
Citometria a flusso	X	X	X	X	X	Lab ULSS2
Citometria a flusso, MRD	X	X	X	X	X	Lab ULSS2
Analisi Citogenetica	Lab IOV PD	X	X	Lab IOV PD	X	Lab ULSS2
Analisi Molecolare diagnosi	Lab IOV PD	X	X	La Lab IOV PD	X	Lab ULSS2
	Rete GIMEMA; Osp S. Gerardo, Monza; Lab. Perugia	Rete GIMEMA; Osp S. Gerardo, Monza; Lab. Perugia	Rete GIMEMA; Osp S. Gerardo, Monza; Lab. Perugia	Rete GIMEMA; Osp S. Gerardo, Monza; Lab. Perugia	Rete GIMEMA; Osp S. Gerardo, Monza; Lab. Perugia	Rete GIMEMA; Osp S. Gerardo, Monza; Lab. Perugia
NGS Ph-like	Centro nazionale c/o Policlinico Umberto I, Roma					
Analisi molecolare, MRD	Rete GIMEMA	X Rete GIMEMA	X Rete GIMEMA	Rete GIMEMA	X Rete GIMEMA	Lab ULSS2 Rete GIMEMA

X=presso il proprio laboratorio di competenza

6. Sindromi mielodisplastiche

Le sindromi mielodisplastiche (sec. ICC 2022)/neoplasie mielodisplastiche (sec. WHO 2022) (MDS) sono neoplasie della cellula staminale ematopoietica, caratterizzate da una o più citopenie su sangue periferico, alterata maturazione di una o più serie emopoietiche nel midollo osseo e variabile tendenza evolutiva a leucemia mieloide acuta.

La diagnosi e la classificazione delle MDS sono attualmente basate sulla 5° edizione della Classificazione WHO delle malattie emopoietiche e sull'International Consensus Classification del 2022 (Tabelle 6.1 e 6.2). Tali classificazioni presentano significative differenze terminologiche e alcune rilevanti discrepanze nosologiche. Per quanto l'impatto di tali divergenze sia limitato, nella pratica clinica si consiglia di utilizzare sia la WHO che l'ICC 2022, riportando la categoria diagnostica e la nomenclatura prevista da entrambe le classificazioni.

La diagnosi di MDS richiede l'integrazione di parametri clinico-laboratoristici, morfologici e citogenetico-molecolari. Per tale motivo, in tutti i casi di sospetta MDS sono raccomandate: (i) la valutazione morfologica (cito/istologica) del midollo osseo; (ii) analisi citogenetiche per la ricerca di alterazioni cromosomiche delle cellule staminali emopoietiche. Per la dimostrazione della natura clonale della malattia e per l'attribuzione di una precisa caratterizzazione diagnostica, si consiglia inoltre il ricorso ad analisi molecolari per mutazioni di geni associati a neoplasie mieloidi. L'analisi citofluorimetrica, per quanto non necessaria ai fini diagnostici, costituisce una valida metodica ancillare per l'identificazione di aberrazioni fenotipiche associate a MDS.

6.1 Valutazione citologica/istologica del midollo osseo

Rilievi Clinico-Diagnostici

Gold standard per la diagnosi morfologica di displasia delle serie emopoietiche è l'esame citologico di aspirato midollare. La valutazione citologica del midollo osseo è pertanto raccomandata in tutti i casi di sospetta sindrome mielodisplastica.

Alla valutazione citologica, si raccomanda di affiancare anche l'esame istologico di biopsia osteomidollare (BOM). La BOM, infatti, contribuisce a definire la cellularità del midollo osseo, a identificare aspetti dismaturativi delle serie emopoietiche, a quantificare i mieloblasti e a definire il grado di fibrosi midollare. La BOM è inoltre fondamentale in tutti i casi in cui l'esame citologico sia impossibile o non dirimente (e.g. punctio sicca midollare) (*Valent P et al, 2017*).

Tabella 6.1 Classificazione delle MDS (sec. ICC 2022)

	Dysplastic lineages	Cytopenias	Cytoses*	BM and PB Blasts	Cytogenetics†	Mutations
MDS with mutated <i>SF3B1</i> (MDS- <i>SF3B1</i>)	Typically ≥1‡	≥1	0	<5% BM <2% PB	Any, except isolated del(5q), -7/del(7q), abn3q26.2, or complex	<i>SF3B1</i> (≥ 10% VAF), without multi-hit <i>TP53</i> , or <i>RUNX1</i>
MDS with del(5q) [MDS-del(5q)]	Typically ≥1‡	≥1	Thrombocytosis allowed	<5% BM <2% PB§	del(5q), with up to 1 additional, except -7/del(7q)	Any, except multi-hit <i>TP53</i>
MDS, NOS without dysplasia	0	≥1	0	<5% BM <2% PB§	-7/del(7q) or complex	Any, except multi-hit <i>TP53</i> or <i>SF3B1</i> (≥ 10% VAF)
MDS, NOS with single lineage dysplasia	1	≥1	0	<5% BM <2% PB§	Any, except not meeting criteria for MDS-del(5q)	Any, except multi-hit <i>TP53</i> ; not meeting criteria for MDS- <i>SF3B1</i>
MDS, NOS with multilineage dysplasia	≥2	≥1	0	<5% BM <2% PB§	Any, except not meeting criteria for MDS-del(5q)	Any, except multi-hit <i>TP53</i> ; not meeting criteria for MDS- <i>SF3B1</i>
MDS with excess blasts (MDS-EB)	Typically ≥1‡	≥1	0	5-9% BM, 2-9% PB§	Any	Any, except multi-hit <i>TP53</i>
MDS/AML	Typically ≥1‡	≥1	0	10-19% BM or PB	Any, except AML-defining¶	Any, except <i>NPM1</i> , <i>bZIP CEBPA</i> or <i>TP53</i>

*Cytoses: Sustained white blood count $\geq 13 \times 10^9/L$, monocytosis ($\geq 0.5 \times 10^9/L$ and $\geq 10\%$ of leukocytes) or platelets $\geq 450 \times 10^9/L$; thrombocytosis is allowed in MDS-del(5q) or in any MDS case with inv(3) or t(3;3) cytogenetic abnormality.

†BCR::ABL1 rearrangement or any of the rearrangements associated with myeloid/lymphoid neoplasms with eosinophilia and tyrosine kinase gene fusions exclude a diagnosis of MDS, even in the context of cytopenia.

‡Although dysplasia is typically present in these entities, it is not required.

§Although 2% PB blasts mandates classification of an MDS case as MDS-EB, the presence of 1% PB blasts confirmed on 2 separate occasions also qualifies for MDS-EB.

||For pediatric patients (<18 y), the blast thresholds for MDS-EB are 5% to 19% in BM and 2% to 19% in PB, and the entity MDS/AML does not apply.

¶AML-defining cytogenetics are listed in the AML section.

Tabella 6.2 Classificazione delle MDS (sec. WHO 2022)

	Blasts	Cytogenetics	Mutations
MDS with defining genetic abnormalities			
MDS with low blasts and isolated 5q deletion (MDS-5q)	<5% BM and <2% PB	5q deletion alone, or with 1 other abnormality other than monosomy 7 or 7q deletion	
MDS with low blasts and <i>SF3B1</i> mutation ^a (MDS- <i>SF3B1</i>)		Absence of 5q deletion, monosomy 7, or complex karyotype	<i>SF3B1</i>
MDS with biallelic <i>TP53</i> inactivation (MDS-bi <i>TP53</i>)	<20% BM and PB	Usually complex	Two or more <i>TP53</i> mutations, or 1 mutation with evidence of <i>TP53</i> copy number loss or cnLOH
MDS, morphologically defined			
MDS with low blasts (MDS-LB)	<5% BM and <2% PB		
MDS, hypoplastic ^b (MDS-h)			
MDS with increased blasts (MDS-IB)			
MDS-IB1	5–9% BM or 2–4% PB		
MDS-IB2	10–19% BM or 5–19% PB or Auer rods		
MDS with fibrosis (MDS-f)	5–19% BM; 2–19% PB		

^aDetection of $\geq 15\%$ ring sideroblasts may substitute for *SF3B1* mutation. Acceptable related terminology: MDS with low blasts and ring sideroblasts.

^bBy definition, $\leq 25\%$ bone marrow cellularity, age adjusted.

BM bone marrow, PB peripheral blood, cnLOH copy neutral loss of heterozygosity.

Rilievi Tecnico-Laboratoristici

Valutazione citologica

La valutazione citologica è effettuata mediante colorazione di May-Grunwald/Giemsa. A questa si raccomanda di aggiungere anche la colorazione citochimica di Perls per l'identificazione di sideroblasti ad anello.

Nel caso di sospetta MDS, l'esame citologico deve considerare la presenza/quantità di elementi displastici per ciascuna linea emopoietica e la quantità di mieloblasti midollari. A tal fine, si raccomanda la valutazione di almeno 500 cellule nucleate, che includano almeno 100 precursori eritroidi, 100 elementi della granulopoiesi e 30 megacariociti (*Valent P et al, 2017*). I criteri di displasia per ciascuna serie emopoietica sono riportati in Tabella 6.3. Una serie emopoietica è considerata displastica se $\geq 10\%$ degli elementi che la costituiscono presenta alterazioni maturative (cut-off più alti possono essere considerati per la diagnosi di displasia della megacariocitopoiesi) (*Hasserjian RP et al, 2023*).

Valutazione istologica

La valutazione istologica di BOM si basa su preparati colorati con ematossilina/eosina o Giemsa. In casi selezionati, si può ricorrere a colorazioni istochimiche aggiuntive, quali la colorazione con acido periodico di Schiff (PAS).

La valutazione istologica deve considerare i seguenti parametri morfologici: (i) cellularità midollare; (ii) rapporto mielo:eritroide (spesso ridotto in corso di MDS); (iii) distribuzione topografica e maturazione della granulopoiesi e dell'eritropoiesi; (iv) quantità e caratteristiche citologiche della megacariocitopoiesi; (v) presenza di eventuali infiltrati linfoidi/mastocitari atipici; (vi) presenza e grado della fibrosi midollare.

Criteri istologici di displasia midollare comprendono un incremento di precursori mieloidi o eritroidi in fasi maturative precoci (c.d. left shift), un'alterata distribuzione delle serie emopoietiche (displasia topografica) e specifiche alterazioni morfologiche dei megacariociti (megacariociti di taglia ridotta; megacariociti con nuclei separati o iposegmentati; micromegacariociti). Di rilievo è inoltre la valutazione della fibrosi midollare mediante colorazione con impregnazione argentea. Fibrosi interstiziale è, infatti, presente nel 10-20% delle BOM con MDS e si associa a displasia multilineare, a maggiore severità delle citopenie, a più alto fabbisogno trasfusionale, a citogenetica più sfavorevole e a prognosi più severa.

Caratterizzazione immunoistochimica delle BOM in MDS

Alla valutazione istologica, si raccomanda di affiancare analisi immunoistochimiche con pannelli volti a quantificare i blasti midollari e (ove opportuno) la presenza, maturazione e distribuzione delle serie emopoietiche. Marcatori utili a tale scopo comprendono CD34, CD117, MPO, marcatori dell'eritropoiesi (e.g. CD71, E-Caderina, glicoforina) e della megacariocitopoiesi (e.g. CD61, CD42, CD31, FVIII). In presenza di infiltrati mastocitari sospetti (e.g. >25% di mastociti fusati; aggregati di mastociti >15 cellule), si raccomanda l'esecuzione di pannelli di secondo livello comprendenti CD25, CD30 e CD2 per documentare eventuali aberrazioni fenotipiche suggestive di mastocitosi sistemica.

Tabella 6.3 Criteri di displasia citologica delle serie emopoietiche		
Serie mieloide	Serie eritroide	Serie megacariocitaria
Ipolobulazioni nucleari (anomalie pseudo Pelger-Huet) Ipersegmentazione nucleare Granulazioni pseudo-Chediak-Higashi Anisocitosi Ipo/agranularità del citoplasma Corpi di Auer Vacuoli	Binuclearità o multinuclearità Nuclei iperlobulati Profilo irregolare del nucleo Carioressi Ponti internucleari Aspetti megaloblastoidi, asincronismi maturativi Sideroblasti ad anello Irregolare distribuzione dell'emoglobina Vacuoli Positività al PAS	Nuclei ipo/monolobati Multinuclearità Micromegacariociti

6.2 Valutazione immunofenotipica

Rilievi Clinico-Diagnostici

L'analisi citofluorimetrica costituisce uno dei metodi ancillari per l'inquadramento di una sospetta MDS e può essere applicata anche nel follow-up di pazienti con MDS sottoposti a trattamento. L'analisi citofluorimetrica, infatti, può rappresentare uno strumento utile nella diagnostica delle MDS grazie alla capacità di identificare cellule con espressione aberrante/asincrona di antigeni di membrana o intracitoplasmatici. Il ricorso all'indagine citofluorimetrica può rivelarsi vantaggioso nel caso di citopenie non associate ad alterazioni citogenetiche o con sfumati aspetti displastici. In particolare, le anomalie fenotipiche che possono essere individuate e che sono riconosciute dal LeukemiaNET come possibilmente associate a MDS sono riportate in Tabella 6.4 (*van de Loosdrecht, A. A. et al 2013*).

Per cercare di standardizzare l'analisi immunofenotipica nel sospetto di MDS sono stati sviluppati degli score citofluorimetrici, che possono facilitare la diagnosi di MDS. Tra questi lo score di Ogata, costruito con la combinazione di 4 parametri, presenta una sensibilità del 65-90% ed una specificità del 90-98%. La diagnosi di MDS viene posta con punteggio ≥ 2 (Tabella 6.5).

Tabella 6.4 Anomalie fenotipiche associate a MDS sec. Leukemia NET

1. Progenitori mieloidi e monocitari
 - a. Incremento della percentuale dei progenitori mieloidi e/o monocitari
 - b. Mancanza/ridotta/aumentata espressione di CD45, CD34, CD117
 - c. Riduzione assoluta o relativa del numero delle cellule CD34+/CD10+ o CD34+/CD19+
 - d. Anomalie della granularità cellulare (valutazione del side scatter)
 - e. Mancanza/ridotta/aumentata espressione di CD13, CD33, HLA-DR
 - f. Espressione dei marcatori linfoidi CD5, CD7, CD19, CD56
 - g. Espressione asincrona di CD11b e/o CD15
2. Neutrofili maturi
 - a. Ridotta granularità cellulare (valutazione del side scatter)
 - b. Alterata distribuzione delle sottoclassi mature ed immature
 - c. Assenza o anomala espressione di CD11b, CD13, CD33
 - d. Ritardata espressione di CD26 o assenza di CD10
 - e. Espressione di CD56
3. Monociti
 - a. Assenza o anomala espressione di CD13, CD14, CD16, CD33
 - b. Anomala espressione di CD11b, HLA-DR
 - c. Sovraespressione di CD56
 - d. Alterata distribuzione delle sottoclassi mature ed immature
4. Progenitori Eritroidi
 - a. Ridotta o espressione eterogenea di CD36, CD71
 - b. Frequenza anomala di precursori eritroidi CD117
 - c. Frequenza anomala di precursori eritroidi CD105
 - d. Anomala intensità di fluorescenza di CD105

Tabella 6.5 Ogata Score

Parametro citofluorimetrico	Valori	Punteggio
Percentuale di mieloblasti CD34+	$\geq 2\%$	1
Percentuale di progenitori B nelle cellule CD34+	$\leq 5\%$	1
Granulociti/Linfociti SSC ratio	≤ 6	1
Linfociti/Mieloblasti CD45 MFI ratio	≤ 4 o $\geq 7,5$	1

Lo studio citofluorimetrico, tuttavia, non può mai considerarsi conclusivo per una diagnosi di MDS, ma in una visione di diagnostica integrata può fornire contributi, quali: i) dimostrare l'assenza di caratteristiche riconducibili a MDS; e ii) evidenziare anomalie altamente suggestive di neoplasia mieloide clonale tipo MDS. Infatti, anche se nessun marker immunofenotipico è specifico per MDS,

un accumulo di aberrazioni può aiutare a discriminare tra cellule emopoietiche normali/con alterazioni di natura reattiva e condizioni clonali.

Rilievi Tecnico-Laboratoristici

Si prega di fare riferimento a quanto riportato nel paragrafo 4.4 e nelle seguenti fonti bibliografiche: *Porwit A et al. 2023, van der Velden, V. H. J et al. 2023.*

6.3 Valutazione Citogenetica

Rilievi Clinico-Diagnostici

L'analisi citogenetica descrive alterazioni cromosomiche clonali in circa il 50%-60% delle MDS primitive e nell'80-90% delle forme secondarie e permette di inquadrare sia dal punto di vista diagnostico che prognostico la patologia.

La descrizione del cariotipo deve contenere le informazioni essenziali per l'identificazione delle alterazioni cromosomiche di significato diagnostico e prognostico, facendo riferimento alla più recente classificazione delle MDS e alle alterazioni riportate nei modelli di prognostici dell'IPSS e dell'IPSS-R. La descrizione del cariotipo alterato deve inoltre riportare il conteggio delle alterazioni cromosomiche.

Le alterazioni cromosomiche più frequentemente riscontrate nella MDS sono riportate nella tabella 6.6. La delezione del braccio lungo del cromosoma 5 (del(5q)), è riconosciuta come entità nosologica sia nella 5° edizione della classificazione WHO, sia nella classificazione dell'International Consensus Classification (ICC) ed oltre alla delezione del(5q) può comprendere anche una seconda alterazione fatta eccezione per la monosomia del cromosoma 7 o la delezione del braccio lungo dello stesso (-7/del(7q)) (*Khoury JD et al, 2022; Arber DA et al 2022*). Sempre a livello classificativo la del(5q) ed altre alterazioni frequentemente associate a MDS quali: -7/del(7q), alterazioni del locus 3q26.2 o il cariotipo complesso, dominano rispetto alla mutazione di *SF3B1*, secondo ICC.

Per entrambe: WHO 5° ed. ed ICC 2022, in assenza di displasia le alterazioni -13 or del(13q) e del(9q) non possono essere considerate diagnostiche di MDS e devono essere interpretate al pari delle mutazioni associate a CHIP.

Tabella 6.6 Alterazioni cromosomiche ricorrenti indicative di MDS	
Alterazioni Non bilanciate	Alterazioni bilanciate
-7 /del(7q)	t(11;16)(q23;p13.3)
-5/ del(5q)	t(3;21)(q26.2;q22.1)
i(17q) /t(17p)	t(1;3)(p36.3;q21.1)
-13/ del(13q)	t(2;11)(p21;q23)
del(11q)	inv(3)(q21q26.2)
del(12p) /t(12p)	t(6;9)(p23;q34)
del(9q)	
idic(X)(q13)	
del(20q)	
+8	
-Y	
Cariotipo complesso (≥3 alterazioni cromosomiche)	

Nei casi in cui non è possibile descrivere un cariotipo è raccomandata la valutazione FISH delle seguenti alterazioni:

- -7 or del(7q)
- -5 or del(5q)
- i(17q) or t(17p) che comprende la valutazione della delezione di TP53 ed eventuale possibilità ad estendere la valutazione a +8 e del(20q).

Al fine prognostico i modelli dell'International Prognostic Scoring System (IPSS) ed il Revised-IPSS (IPSS-R) hanno per primi compreso alcune alterazioni cromosomiche nella valutazione del rischio delle MDS ad evolvere verso forme acute (*Greenberg P et al, 1997; Greenberg PL et al, 2012*). Il riconoscimento di queste alterazioni ed il loro significato (Tabelle 6.7 e 6.8) è parte integrante del referto dell'analisi del cariotipo, così come fondamentale è il conteggio del numero di alterazioni anche ai fini del riconoscimento del cariotipo complesso.

Tabella 6.7 Interpretazione del cariotipo ai fini dell'IPSS	
Categoria di rischio	Alterazioni cromosomiche
Favorevole	Cariotipo normale, del(5q) isolata, del(20q) isolata, -Y isolata
Intermedio	Altre alterazioni non considerate negli altri due gruppi
Sfavorevole	Alterazioni del cromosoma 7, cariotipo complesso definito come ≥ 3 alterazioni cromosomiche

Tabella 6.8 Interpretazione del cariotipo ai fini dell'IPSS-R	
Categoria di rischio	Alterazioni cromosomiche
Molto favorevole	-Y, del(11q)
Favorevole	Cariotipo normale, del(5q), del(12p), del(20q), due alterazioni compresa del(5q)
Intermedio	del(7q), +8, +19, i(17q), altre alterazioni singole non comprese nella classificazione, qualsiasi altra combinazione di due alterazioni non comprese nelle altre categorie, due o più cloni indipendenti
Sfavorevole	-7, inv(3)/t(3q)/del(3q), due alterazioni comprese - 7/7q-, cariotipo complesso (3 alterazioni cromosomiche)
Molto sfavorevole	Cariotipo complesso con più di tre alterazioni

Rilievi Tecnico-Laboratoristici

Oltre alle indicazioni generali descritte nel paragrafo introduttivo e alle quali si rimanda (Tabelle 4.2 e 4.3), si segnala che la modalità di conteggio delle alterazioni cromosomiche utilizzato nella stesura dell'IPSS e IPSS-R può differire per alcuni casi da quella riportata nell'ultima versione dell'ISCN 2024 (*ISCN 2024, Greenberg P et al, 1997; Greenberg PL et al, 2012*). Infatti, entrambi i modelli di prognosi si sono basati sulle linee guida dell'International Working Group on MDS Cytogenetics (IWGMC) del 2010 (*Chun K et al. 2010*).

6.4 Valutazione Molecolare

Sono ormai più di 50 i geni coinvolti nelle MDS che interessano differenti processi cellulari, fra i quali lo splicing, la regolazione epigenetica e la trascrizione. Gli studi dell'ultimo decennio hanno permesso di descrivere alcuni pattern mutazionali e ad associarli alla presentazione clinica della malattia, definendo il ruolo diagnostico e prognostico delle mutazioni genetiche. L'analisi mutazionale è diventata quindi uno strumento necessario e complementare alle altre indagini genetiche per l'inquadramento delle MDS.

I geni più frequentemente mutati nelle MDS sono riportati nella tabella 6.9 con la relativa frequenza di mutazione. Si precisa che:

- nessuno di questi geni è diagnostico di MDS;
- alcune mutazioni a carico di geni correlati a MDS (per es. *TET2*, *DNMT3A*, *TP53*) non necessariamente si associano ad uno stato di malattia;

c) il riscontro di una mutazione a carico di questi geni non deve essere considerata come evidenza di MDS se non sono soddisfatti i criteri diagnostici di MDS.

In relazione alla definizione di MDS della 5° edizione della WHO e dell'ICC, ai fini diagnostici l'analisi mutazionale è necessaria sia per definire della clonalità del processo patologico, sia per individuare alcuni sottotipi di MDS che sono caratterizzati dalla presenza di alterazioni genetiche a carico di *SF3B1* e *TP53*. Per la MDS con mutazioni di *SF3B1* è richiesta una frequenza allelica (VAF) uguale o superiore al 10%; mentre la definizione di MDS con mutazione di *TP53* è più articolata e richiede: A) la presenza di alterazioni multiple di *TP53*, cosiddette "multi-hit" di *TP53* che corrisponde alle seguenti condizioni:

- la presenza di 2 distinte mutazioni di *TP53* ciascuna con VAF $\geq 10\%$;
- singola mutazione di *TP53* (VAF $\geq 10\%$) e delezione citogenetica di 17p;
- singola mutazione di *TP53* con VAF $> 50\%$;
- copy-neutral LOH del locus 17p, locus *TP53*;

B) una sola mutazione di *TP53* (VAF $\geq 10\%$) accompagnata da un cariotipo complesso, spesso con delezione di 17p.

Tabella 6.9 Geni frequentemente mutati nelle MDS

	Tipo di mutazione e alterazioni frequenti nelle MDS	Frequenza di mutazione	Note
TET2	Nonsense or Frameshift or Splice site; Missense: codoni coinvolti 1134-1444 o 1842-1921	20-25%	Comune anche in CHIP e CCUS
DNMT3A	Nonsense o Frameshift o Splice site; Missense: codoni coinvolti G543, R635, A741, R736, H739, S770, M880, R882, W893, P904, A910	12-18%	Comune anche in CHIP e CCUS
ASXL1	Nonsense o Frameshift	15-25%	Comune anche in CHIP e CCUS
EZH2	Nonsense o Frameshift	5-10%	
SF3B1	Missense: E622, Y623, R625, H662, T663, K666, K700E, I704, G740, G742, D781	20-30%	
SRSF2	Missense o delezioni In-frame che coinvolgono il codone P95	10-15%	
U2AF1	Missense: S34, Q157	8-12%	
ZRSR2	Nonsense o Frameshift	5-10%	
RUNX1	Nonsense o Frameshift	10-15%	
TP53	Nonsense o Frameshift o Splice site; Missense: qualsiasi codone ad eccezione di P47S e P72R	8-12%	
STAG2	Nonsense o Frameshift o Splice site;	5-10%	
NRAS	Missense: G12, G13, Q61	5-10%	
CBL	Missense: codoni coinvolti fra 366-420	<5%	Frequente in CMML (10-20%) e JMML (~15%)
NF1	Nonsense o Frameshift o Splice site;	<5%	Frequente in CMML (10-20%) e JMML (~15%), anche germinale
JAK2	Missense: V617F	<5%	Frequenti in MDS/MPN-RS-T; anche in associazione con SF3B1
CALR	Frameshift dopo il codone 352	<5%	Frequenti in MDS/MPN-RS-T dove spesso è associato a SF3B1
MPL	Missense: W515 L/K	<5%	Frequenti in MDS/MPN-RS-T dove spesso è associato a SF3B1
ETV6	Nonsense o Frameshift	<5%	
GATA2	Nonsense o Frameshift o Splice site; Missense: codonei 349-398		
DDX41	Nonsense o Frameshift o Splice site; Missense: codone R525H		Spesso come mutazione germinale
IDH1	Missense codone 132	<5%	
IDH2	Missense: R140Q, R172	<5%	
SETBP1	Missense: E585, T864, I865, D868, S869, G870	<5%	Frequente in aCML (24%), CMML (5-10%), JMML (7%)
PHF6	Nonsense o Frameshift o Splice site	<5%	
BCOR	Nonsense o Frameshift o Splice site	<5%	
FLT3	Internal Tandem Duplication o Missense: codone D835		
WT1	Nonsense o Frameshift o Splice site		
NPM1	Frameshift: W288fs*12		
STAT3	Missense: codoni 584-674	<5%	Presente in MDS associata a LGL
PPMD1	Nonsense o Frameshift	~5%	Comune in CHIP e CCUS
UBA1	Missense: esone 3 M41T, M41V, M41L e altre	~5%	Sindrome di Vexas

Modificata da NCCN Guidelines Version 1.2025 Myelodysplastic syndromes

Dal punto di vista prognostico l'analisi molecolare in associazione a parametri clinici e alle alterazioni citogenetiche ha permesso la definizione di un modello prognostico denominato Molecular IPSS (IPSS-M) che identifica 6 categorie di rischio. L'IPSS-M considera complessivamente 31 geni che vengono distinti in un primo gruppo di 16 geni che maggiormente influenzano la prognosi e in un secondo gruppo di altri 15 geni, cosiddetti "residual genes", per i quali si valuta l'effetto additivo (numero di geni coinvolti). I geni che maggiormente influenzano la prognosi in senso negativo sono *TP53* (multi-hit), *FLT3* e *KMT2A* (per il quale si considera la presenza di partial tandem duplication (PTD)), mentre *SF3B1* rappresenta il marcatore associato a prognosi più favorevole, anche se è necessario considerare il pattern di co-mutazione (Tabella 6.10; *Bernard E et al, 2022*).

Tabella 6.10 Geni compresi nel sistema prognostico IPSS-M	
Geni di maggior peso n=16 (in ordine di peso prognostico)	Altri geni per cui si valuta l'effetto additivo n=15 (si valuta il numero di geni mutati: 0, 1, 2)
<i>TP53</i> ^{multi}	<i>BCOR</i>
<i>KMT2A</i> ^{PTD}	<i>BCORL1</i>
<i>FLT3</i>	<i>CEBPA</i>
<i>SF3B1</i> ^{5q}	<i>ETNK1</i>
<i>NPM1</i>	<i>GATA2</i>
<i>RUNX1</i>	<i>GNB1</i>
<i>NRAS</i>	<i>IDH1</i>
<i>ETV6</i>	<i>NF1</i>
<i>IDH2</i>	<i>PHF6</i>
<i>CBL</i>	<i>PRPF8</i>
<i>EZH2</i>	<i>PTPN11</i>
<i>U2AF1</i>	<i>STAG2</i>
<i>SRSF2</i>	<i>WT1</i>
<i>DNMT3A</i>	
<i>ASXL1</i>	
<i>KRAS</i>	
<i>SF3B1</i> *	

SF3B1^{5q}: *SF3B1* accompagnato da del5q ed eventualmente da una seconda alterazione citogenetica fatta eccezione per -7/7q-

*SF3B1**: *SF3B1* in assenza di co-mutazioni dei geni *BCOR*, *BCORL1*, *RUNX1*, *NRAS*, *STAG2*, *SRSF2*, del5q.

Rilievi Tecnico-Laboratoristici

Nella classificazione delle MDS secondo WHO ed ICC la genetica copre appena un terzo delle MDS identificando in modo univoco delle singole entità biologiche (*SF3B1*, *TP53*, del(5q)) e non è in grado di descrivere l'eterogeneità biologica di questo ampio spettro di patologie. Nonostante non ci sia ancora un consenso su una classificazione su basi esclusivamente genetiche, alcuni importanti lavori pubblicati recentemente hanno proposto dei modelli classificativi partendo da un numero variabile di geni e individuando dei sottotipi molecolari caratterizzati da pattern mutazionali distinti che si associano a particolari caratteristiche morfologiche, cliniche e con un ben definito profilo clinico. Questo ambito di ricerca è in continua evoluzione e si sta arricchendo dell'integrazione dei risultati che derivano da differenti approcci di analisi (*Bersanelli M et al, 2021; Bernard E et al, 2024*).

Caratteristiche dell'analisi mutazionale mediante sequenziamento di nuova generazione:

- ☐ utilizzo di pannelli multigenici in cui sono presenti i geni più frequentemente alterati nelle MDS;
- ☐ limite di rilevamento NGS: mutazioni con VAF $\geq 2\%$
- ☐ coverage medio richiesto 1000x
- ☐ tempi di refertazione: preferibile entro 1 mese.

Tabella 6.11. MDS: Laboratori di afferenza per gli Hub ematologici della REV						
	AOUN PADOVA	AOUN VERONA	ULSS2 TREVISO	ULSS3 MESTRE- VENEZIA	ULSS8 VICENZA	IOV CFV
Valutazione patologica	X	X	X	X	X	X
Citometria a flusso	X	X	X	X	X	Lab ULSS2
Analisi Citogenetica	Lab IOV PD	X Lab IOV PD	X	Lab IOV PD	X	Lab ULSS2
Analisi Molecolare diagnosi	Lab IOV PD	Lab IOV PD	X	Lab IOV PD	X	Lab ULSS2
NGS	Lab IOV PD	Lab IOV PD	X	Lab IOV PD	X	Lab ULSS2

X = presso il proprio laboratorio di competenza

7 Linfomi di Hodgkin

Il linfoma di Hodgkin (LH) è una neoplasia a cellule B di origine dal centro germinativo, caratterizzata da un numero variabile di elementi neoplastici immersi in un ricco microambiente infiammatorio. Sulla base delle caratteristiche morfologiche e immunofenotipiche delle cellule diagnostiche e della composizione del *milieu* di accompagnamento, sono tradizionalmente identificate due forme di malattia: il LH classico (cHL) e il LH a predominanza linfocitaria nodulare (NLPHL). La classificazione WHO 2022 mantiene questa distinzione e questa terminologia. La Classificazione ICC 2022 ha rimosso, invece, il NLPHL dallo spettro dei LH, modificandone il nome in “linfoma a cellule B a predominanza linfocitaria nodulare” (NLPBL). Ciò alla luce della biologia e del comportamento clinico del NLPHL/NLPBL, che somigliano più a quelli di un linfoma non-Hodgkin indolente a cellule B periferiche (*Alaggio R et al, 2022; Campo E et al, 2022*).

Nonostante tali discrepanze terminologiche, le classificazioni WHO e ICC 2022 adottano i medesimi criteri per la diagnosi di cHL e NLPHL/NLPBL. Procedura diagnostica fondamentale è l'esame istologico di adenopatie sospette. La valutazione citofluorimetrica e le analisi citogenetico-molecolari hanno, invece, un ruolo diagnostico limitato, potendo al più contribuire alla risoluzione di diagnosi differenziali particolarmente complesse. Data la preminenza della valutazione istologica per la diagnosi di LH, in questa sezione sono discussi solamente gli aspetti relativi a tale diagnostica. Si rimanda alla sezione sui linfomi non-Hodgkin per le specifiche relative alla valutazione citofluorimetrica e citogenetico-molecolare nella diagnostica delle altre patologie linfoproliferative.

7.1 Valutazione citologica/istologica

Rilievi Clinico-Diagnostici

Per quanto la diagnosi di cHL e (in minor misura) di NLPHL/NLPBL possa essere sospettata/proposta mediante valutazione citologica, l'esame istologico rappresenta il gold standard diagnostico ed è raccomandato in tutti i casi.

Per un corretto inquadramento diagnostico è fondamentale che il materiale prelevato sia adeguato e rappresentativo. L'eterogenea distribuzione delle cellule neoplastiche e la necessità di evidenziare aspetti morfologici peculiari di ciascun istotipo/varietà raccomandano il ricorso a biopsie chirurgiche (escissionali o incisionali) in tutti i casi possibili. Un approccio agobiottico (eco/TC-guidato) dovrebbe essere limitato a masse profonde e a casi in cui la biopsia chirurgica è controindicata o non praticabile (*NCCN Hodgkin Lymphoma 2025; Pizzi M et al, 2021*).

La stadiazione di malattia mediante biopsia osteomidollare non è raccomandata in tutti casi, ma viene generalmente effettuata solo se le indagini PET-CT risultano non dirimenti o suggeriscono una localizzazione midollare di malattia (*NCCN Hodgkin Lymphoma 2025*).

Rilievi Tecnico-Laboratoristici

Per la valutazione citologica/istologica dei campioni di linfonodo valgono i principi esposti nel paragrafo introduttivo del presente documento (paragrafi 4.1-4.3).

La diagnosi istologica di cHL si basa sull'identificazione morfologica delle cellule neoplastiche (cellule di Hodgkin e Reed-Sternberg [HRS]), sulla valutazione del microambiente tumorale e su analisi immunoistochimiche che confermino il sospetto morfologico. In base all'abbondanza di cellule neoplastiche e alle caratteristiche del microambiente tumorale, si distinguono 4 varietà di cHL: (i) sclerosi nodulare, (ii) cellularità mista, (iii) deplezione linfocitaria, (iv) ricca in linfociti. Le caratteristiche morfologiche di tali varietà sono elencate in Tabella 7.1.

La diagnosi di cHL è confermata dalla valutazione immunoistochimica, utilizzando pannelli che comprendano CD20, CD3, CD30, CD15, PAX5 e, ove possibile, l'ibridazione in situ per EBV (mediante sonde EBER) o, in subordine, l'analisi di marcatori immunoistochimici meno sensibili di EBER, quali LMP1 e EBNA1. In base alle caratteristiche di ciascun caso e alle diagnosi differenziali proposte dalla valutazione morfologica/immunoistochimica, pannelli di secondo livello includono ulteriori marker pan-B (e.g. CD79a, OCT2, BOB1, CD22, CD19), MUM1, GATA3, PD-L1, CD45, etc. In casi selezionati, possono anche essere considerati anche marcatori immunoistochimici per la valutazione dello stroma o del background infiammatorio e analisi molecolari per la valutazione della clonalità B e T.

Analogamente al cHL, la diagnosi di NLPHL/NLPBL si basa sull'integrazione di reperti morfologici e immunoistochimici. La valutazione morfologica mira a identificare cellule diagnostiche (i.e. cellule LP o popcorn), a definire il pattern di crescita e le caratteristiche del microambiente tumorale (solitamente ricco di linfociti maturi di piccola taglia con variabili quantità di istiociti epitelioidi, anche organizzati in microgranulomi). La caratterizzazione immunoistochimica conferma la natura della popolazione neoplastica e consente la diagnosi differenziale con il cHL. Pannelli immunoistochimici consigliati comprendono marcatori pan-B, CD30, CD15, EMA, CD3 e/o PD1 (per valutare rosette di linfociti T attorno alle cellule LP) ed eventuali marcatori per caratterizzare le popolazioni linfocitarie e stromali di accompagnamento. In base alla crescita e alla distribuzione delle cellule neoplastiche, la classificazione WHO 2022 distingue 6 pattern istologici (pattern A-F; Tabella 7.2). Nella classificazione ICC 2022, tali pattern corrispondono a 2 gradi istologici: (i) grado 1 (pattern A, B o C) e (ii) grado 2 (pattern D, E ed F) (*Alaggio R et al, 2022; Campo E et al, 2022*).

Tabella 7.1 Caratteristiche morfologiche CHL			
Sottotipi	Architettura	Cellule diagnostiche	Microambiente
CHL sclerosi nodulare	Nodulare con bande sclerotiche Sclerosi capsulare	Cellule lacunari Cellule HRS e di Hodgkin	Eosinofili, istiociti piccoli linfociti, occasionali neutrofili Follicoli linfoidi reattivi residui Focolai di necrosi
CHL cellularità mista	Sovvertita, prevalentemente diffusa Non evidente fibrosi settale o capsulare	Cellule HRS multinucleate o binucleate	Piccoli linfociti, istiociti, eosinofili, plasmacellule Occasional granulomi a cellule epiteloidi
CHL ricco in linfociti	Nodulare o diffusa	Cellule HRS Cellule mononucleate simil-lacunari	Numerosi piccoli linfociti Non evidenti neutrofili o eosinofili (rari solo in sede interfollicolare) Istiociti, prevalentemente epiteloidi Centri germinativi piccoli e regrediti
CHL deplezione linfocitaria	Diffusa Bande collagene assenti	Abbondanti cellule HRS	Scarsa componente linfocitica, granulocitica eosinofila e plasmacellulare Abbondanti istiociti nella variante con fibrosi diffusa

Tabella 7.2 Caratteristiche morfologiche NLPHL/NLPBL

Pattern di crescita	Architettura	Cellule diagnostiche	Microambiente
A - Nodulare, ricco in linfociti B	Nodulare Meshwork di FDC persistente	Intranodulari	Piccoli linfociti B tipo mantellari Piccoli linfociti T CD4+ ed istiociti Rosette di elementi T PD1+
B – Serpiginoso/interconnesso	Noduli irregolari Meshwork di FDC persistente	intranodulari	Piccoli linfociti B tipo mantellari Piccoli linfociti T CD4+ ed istiociti Rosette di elementi T PD1+
C – Cellule tumorali prevalentemente extra-nodulari	Noduli frequentemente confluenti Meswork di FDC persistente	Extranodulari o tra i noduli	Piccoli linfociti B tipo mantellari Piccoli linfociti T helper follicolari CD4+ Istiociti Rosette di elementi T PD1+ in numero ridotto
D – Nodulare ricco in cellule T	Nodulare, talora irregolare Meshwork di FDC persistente	Intranodulari	Cellule T helper follicolari circondati da sottile rima di cellule B mantellari
E – Diffuso (T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma-like)	Diffusa Meshwork di FDC assente	Distribuzione diffusa	Piccoli linfociti T ed istiociti Rosette di elementi T PD1+ in numero ridotto o assenti
F – Diffuso moth-eaten, ricco in linfociti B	Diffusa Meshwork di cellule follicolari dendritiche parziale	Distribuzione diffusa	Prevalenza di piccoli linfociti B alternati ad aree comprendenti linfociti T ed istiociti

7.2 Valutazione immunofenotipica

La valutazione immunofenotipica mediante citofluorimetria non contribuisce in maniera significativa alla diagnosi di LH. Il suo impiego non è quindi raccomandato nella routine diagnostica

7.3 Valutazione Genetica

La valutazione citogenetica e/o molecolare non contribuisce in maniera significativa alla diagnosi di LH. Il suo impiego non è quindi raccomandato nella routine diagnostica. Analisi di clonalità B o T o ricerca di specifiche alterazioni molecolari possono tuttavia contribuire alla diagnosi differenziale di casi istologicamente ambigui e particolarmente complessi (e.g. cHL vs linfoma anaplastico a grandi cellule T, ALK-negativo; cHL vs linfoma a cellule T helper follicolari con cellule sternbergoidi).

RETE EMATOLOGICA VENETA
LINEE DI INDIRIZZO DIAGNOSTICO TERAPEUTICHE

Rev. N.0
Dicembre
2025

Tabella 7.3 HD: Laboratori di afferenza per gli Hub ematologici della REV

	AOUP PADOVA	AOUI VERONA	ULSS2 TREVISO	ULSS3 MESTRE- VENEZIA	ULSS8 VICENZA	IOV CFV
Valutazione patologica	X	X	X	X	X	X

X = presso il proprio laboratorio di competenza

8 Linfomi non-Hodgkin

I linfomi non-Hodgkin (LNH) costituiscono un ampio gruppo di neoplasie linfoidi con caratteristiche cliniche, istologiche e citogenetico-molecolari estremamente eterogenee. In base alla derivazione biologica, si distinguono linfomi a cellule B e linfomi a cellule T. Questi sono a loro volta classificati in forme dei precursori (leucemia/linfoma linfoblastico a cellule B e T) e a cellule mature (NHL a cellule B e T periferiche).

In questa sezione, si prenderà in considerazione il percorso diagnostico dei LNH a cellule B e T periferiche. Le procedure diagnostiche relative alle neoplasie dei precursori linfoidi sono invece descritte nel paragrafo dedicato alle leucemie acute.

Per la classificazione dei LNH, si rimanda alle recenti classificazioni WHO e ICC 2022 (*Alaggio R et al 2022; Campo E et al, 2022*). Fatta eccezione per alcune specifiche entità (*e.g.* linfoma follicolare), tali classificazioni riproducono la classificazione WHO 2016, aggiornandone la terminologia e promuovendo a definitive alcune entità prima considerate provvisorie. Nella pratica clinica, tale approccio si traduce nell'identificazione di alcuni macro-gruppi di patologie, che comprendono: (i) i LNH a linfociti B maturi di piccola/media taglia; (ii) i LNH a blasti B di media/grande taglia; (iii) i linfomi a cellule T periferiche; e (iv) i linfomi a cellule T primitivi cutanei.

La diagnosi di tali entità si basa principalmente sulla valutazione istologica di campioni fissati in formalina/inclusi in paraffina. Le analisi citofluorimetriche non sono routinariamente applicate alla diagnosi degli infiltrati linfoidi tessutali, mentre rivestono un ruolo di primo piano nella tipizzazione dei linfociti circolanti e negli infiltrati linfoidi midollari. Per la diagnosi di specifiche entità (*e.g.* linfoma di Burkitt; linfomi *double hit*; linfoma a grandi cellule B riarrangiato in *IRF4*), è mandatorio il ricorso ad analisi FISH per traslocazioni cromosomiche ricorrenti.

Le analisi molecolari rivestono un ruolo ancillare nella diagnosi dei LNH. La valutazione dei riarrangiamenti dei geni delle *immunoglobuline (IG)* e del *T-cell receptor (TCR)* contribuisce alla definizione della natura clonale dei processi linfoproliferativi e (ove necessario) integra la valutazione morfologica e immuofenotica. Nella diagnostica di *routine*, non sono invece raccomandate analisi di *next-generation sequencing (NGS)*. La profilazione genetica estesa può, tuttavia, contribuire alla risoluzione di diagnosi differenziali particolarmente complesse. Utile e di facile applicazione è, invece, la ricerca di mutazioni puntiformi, che correlano con la diagnosi specifiche neoplasie (*e.g.* mutazione L265P di *MYD88* per il linfoma linfoplasmocitico/malattia di Waldenstrom; mutazione V600E di *BRAF* per la leucemia a cellule capellute).

Nei successivi paragrafi saranno descritte le procedure diagnostiche relative a ciascuno dei macro-gruppi di LNH precedentemente descritti. Per una specifica descrizione delle caratteristiche

morfologiche, immunofenotipiche e citogenetico-molecolari di ciascuna entità si rimanda alle Tabelle che integrano il testo.

8.1 Valutazione citologica/istologica

a. Linfomi a cellule B periferiche di piccola/media taglia

Le principali entità facenti parte di questo gruppo di malattie sono il linfoma follicolare, il linfoma mantellare, i linfomi della zona marginale (splenico, extra-nodale e nodale), il linfoma linfoplasmocitico, la leucemia a cellule capellute e altre neoplasie B di basso grado primitive della milza e il linfoma a piccoli linfociti/leucemia linfatica cronica. Per la descrizione delle caratteristiche istopatologica di quest'ultima si rimanda al paragrafo 9.1 del presente documento.

Rilievi Clinico-Diagnostici

Per la diagnosi dei LNH dei linfomi a cellule B e T periferiche *gold standard* diagnostico è l'esame istologico di campioni bioptici di linfonodo o tessuto extra-nodale. La valutazione citologica ha valore assai limitato, specie se non integrata con i risultati di analisi citofluorimetriche. Il ricorso alla diagnostica citologica è pertanto sconsigliato, se non nel caso di specifiche entità (e.g. linfomi dei versamenti) o in condizioni che devono essere valutate volta per volta da professionisti esperti nella diagnosi e nel trattamento delle neoplasie linfoidi.

La necessità di adeguate quantità di tessuto per analisi fenotipiche e molecolari, la distribuzione eterogenea di alcune popolazioni cellulari e la necessità di valutare il pattern di crescita degli infiltrati linfoidi raccomandano il ricorso a biopsie chirurgiche (escissionali o incisionali) in tutti i casi possibili. Un approccio agobiottico (eco/TC-guidato) dovrebbe essere limitato a masse profonde e a casi in cui la biopsia chirurgica è controindicata o non praticabile.

Parte integrante della stadiazione dei LNH è inoltre l'esame cito/istologico di biopsie osteomidollari (BOM). La BOM non è invece consigliata per porre diagnosi di LNH, fatte salve alcune patologie con prevalente interessamento midollare o con lesioni in organi difficilmente biopsiabili (e.g. LNH primitivi della milza; masse profonde male aggredibili; malattie leucemiche/leucemizzate).

Rilievi Tecnico-Laboratoristici

Per la valutazione citologica/istologica dei campioni di linfonodo e midollo osseo valgono i principi esposti nel paragrafo introduttivo del presente documento (cfr paragrafo 4.1-4.3).

La diagnosi istologica dei LNH a cellule B periferiche di piccola/media taglia richiede la valutazione di sezioni colorate con ematossilina/eosina e/o Giemsa e l'integrazione con i risultati di analisi immunoistochimiche. Parametri morfologici fondamentali per la valutazione istologica comprendono (i) il pattern di crescita (nodulare, diffuso, interstiziale, intra-sinusoidale o misto), (ii) le caratteristiche citologiche della popolazione neoplastica (caratteristiche nucleari; rapporto nucleo/citoplasma; monomorfismo o eterogeneità della popolazione linfoide); (iii) caratteristiche del microambiente tumorale (e.g. composizione e tipologie di cellule infiammatorie di accompagnamento; presenza/distribuzione di aree di sclerosi). La valutazione integrata di tali parametri determina uno spettro di diagnosi differenziale, per la cui risoluzione rivestono un ruolo fondamentale le analisi fenotipiche. Marcatori utili per la diagnosi differenziale di tali entità comprendono CD20 e altri marcatori pan-B (e.g. CD79a, PAX5, CD19, etc), CD10, Bcl6, Bcl2, CD5, CD23, Ciclina D1, MUM1, catene leggere kappa e lambda. Marcatori di secondo livello comprendono TCL1, MNDA, IRTA-1, SOX11, LEF1, BRAF V600E, CD25, Annexin A1, DBA44. A seconda della valutazione morfologica e del sospetto diagnostico, si raccomanda il ricorso a pannelli, che considerino i marcatori più utili per la risoluzione delle varie diagnosi differenziali (Tabella 8.1).

Tabella 8.1 Caratteristiche istologiche, fenotipiche e citogenetico-molecolari dei LNH-B di piccola/media taglia

Entità	Caratteristiche morfologiche	Profilo immunoistochimico	Caratteristiche citogenetico-molecolari di rilievo diagnostico
Linfoma follicolare	<u>Pattern di crescita linfonodale:</u> nodulare, nodulare e diffuso o (raramente) puramente diffuso; <u>Pattern di crescita midollare:</u> paratrabecolare, nodulare o diffuso; <u>Citologia:</u> centrociti e centroblasti in variabili proporzioni	Marker pan-B (CD20, PAX5, CD79a), CD10+*, Bcl6+, Bcl2+**, Ki67 variabile a seconda della proporzione di centrociti/centroblasti	t(14;18)(q32;q21)- <i>BCL2::IGH**</i>
Linfoma mantellare	<u>Pattern di crescita linfonodale:</u> vagamente nodulare, perifollicolare o diffuso; <u>Pattern di crescita midollare:</u> nodulare, interstiziale o diffuso; <u>Citologia:</u> linfociti maturi di piccola taglia con contorno nucleare lievemente irregolare; rare varianti blastoidi, pleomorfa o a piccole cellule#	Marker pan-B (CD20, PAX5, CD79a), CD5+, Ciclina D1+, SOX11+\$, CD23-; Ki67 variabile	t(11;14)(q13;q32)- <i>CCND1::IGH\$\$</i> ;
Linfoma della zona marginale	<u>Pattern di crescita linfonodale:</u> vagamente nodulare o perifollicolare; <u>Pattern di crescita midollare:</u> interstiziale, intrasinusoidale, nodulare o (raramente) diffuso; <u>Citologia:</u> linfociti maturi di piccola/media taglia, anche	Marker pan-B (CD20, PAX5, CD79a), CD10-, Bcl6-, CD5- (rari casi CD5+), CD23-, Ciclina D1-, MUM1+/-, sbilanciamento del rapporto kappa/lambda in	Non contributive ai fini diagnostici

Tabella 8.1 Caratteristiche istologiche, fenotipiche e citogenetico-molecolari dei LNH-B di piccola/media taglia

	monocitoidi; rari blasti di grande taglia; possibile componente plasmacellulare	casi con differenziazione plasmacellulare; basso Ki67	
Linfoma linfoplasmocitico	<u>Pattern di crescita linfonodale:</u> vagamente interstiziale o perifollicolare; <u>Pattern di crescita midollare:</u> paratrabecolare, interstiziale o (raramente) diffuso; <u>Citologia:</u> linfociti maturi di piccola taglia, linfociti plasmocitoidi e plasmacellule	Marker pan-B (CD20, PAX5, CD79a), CD10-, Bcl6-, CD5-, CD23-/+, Ciclina D1-, MUM1+/-, sbilanciamento del rapporto kappa/lambda in casi con ricca componente plasmacellulare; basso Ki67	Mutazione L265P di <i>MYD88</i>
Leucemia a cellule capellute	<u>Pattern di crescita splenico:</u> intra-sinusoidale e interstiziale centrato nella polpa rossa; <u>Pattern di crescita midollare:</u> interstiziale, peri-adipocitario o (raramente) diffuso; <u>Citologia:</u> linfociti maturi di piccola taglia, linfociti plasmocitoidi e plasmacellule	Marker pan-B (CD20, PAX5, CD79a), CD25+, Ciclina D1+ (debole), DBA44+, Annessina A1+, BRAF V600E+	Mutazione V600E di <i>BRAF</i>
Note. (*) una quota di casi di alto grado non esprime CD10; (**) una quota di linfomi follicolari dell'adulto, la maggior parte delle forme pediatriche e cutanee è Bcl2- e non ha traslocazioni di <i>BCL2</i> ; (#) alterazioni genetiche di <i>TP53</i> ed <i>RB1</i> possono contribuire alla stratificazione prognostica e alla valutazione del rischio di evoluzione della malattia; (\$) una quota di linfomi mantellari non esprime SOX11: tali casi sono frequentemente forme leucemiche non-nodali a decorso clinico più indolente; (§§) una minoranza di linfomi mantellari non ha traslocazioni di <i>CCND1</i> e presenta alterazioni genetiche di altre cicline.			

b. Linfomi a blasti B di media/grande taglia

In questo gruppo di neoplasie rientrano le varie forme di linfoma B diffuso a grandi cellule, il linfoma di Burkitt, i linfomi a cellule B di alto grado non altrimenti specificati (DLBCL, NOS) e *double-hit*, il linfoma a grandi cellule B con riarrangiamento di *IRF4* e il linfoma di alto grado con aberrazioni del cromosoma 11q (sec. WHO 2022). Quest'ultima entità è definita "linfoma a grandi cellule B con aberrazioni del cromosoma 11q" dalla classificazione ICC 2022.

Rilievi Clinico-Diagnostici

Per la diagnosi cito-istologica di questa classe di LNH valgono le considerazioni svolte per i LNH a cellule B periferiche di piccola/media taglia. Rispetto a questi, l'inquadramento diagnostico richiede tuttavia un maggior ricorso ad analisi FISH per riarrangiamenti genici ricorrenti. Tali analisi sono in particolare raccomandate in tutti di linfoma B con aspetti blastoidi, nel sospetto di linfoma di Burkitt, di linfoma B di alto grado con alterazioni di 11q e di linfoma a grandi cellule B con riarrangiamento di *IRF4* (*cfr* paragrafo relativo alla caratterizzazione citogenetico-molecolare). Nei linfomi diffusi a grandi cellule B non altrimenti specificati, non vi sono attualmente raccomandazioni standardizzate per la ricerca di riarrangiamenti di *MYC* e *BCL2* e gli approcci

variano a seconda dei centri (*e.g.* valutazione *routinaria* in tutti i casi; valutazione sequenziale sulla base della presenza/assenza di riarrangiamenti di *MYC*; valutazione sulla base di caratteristiche morfologiche o fenotipiche e/o indice proliferativo; valutazione su richiesta da parte del curante in base alla fitness e alle caratteristiche cliniche della malattia; *etc*). Per ciascun centro, si raccomanda l'individuazione di un laboratorio di riferimento per le analisi FISH all'interno dell'istituzione di appartenenza o in strutture regionali di riferimento.

Rilevi Tecnico-Laboratoristici

Per la valutazione citologica/istologica valgono i principi generali esposti nel paragrafo relativo ai linfomi LNH a cellule B periferiche di piccola/media taglia. La valutazione morfologica dei campioni bioptici di linfonodo e di tessuti extra-nodali segue le stesse modalità di cui alle forme di basso grado, mentre la caratterizzazione immunoistochimica adotta pannelli specifici per le forme di alto grado. Marcatori utili comprendono in particolare CD20 e/o altri marcatori pan-B (*e.g.* CD79a, PAX5, CD19, *etc*), CD10, Bcl6, MUM1, Bcl2, c-Myc, Ciclina D1 e Ki67. Nei linfomi a grandi cellule B primitivi del mediastino, di notevole importanza diagnostica sono inoltre CD30, CD23, CD200 e PD-L1. Nelle forme a differenziazione plasmoblastica, si raccomanda la valutazione di CD138 e/o CD38, ALK1 e HHV8. In tali forme, nei linfomi di Burkitt, nelle neoplasie anaplastiche, angiotrope o a possibile genesi disimmune o da immunodeficienza è inoltre di grande rilevanza l'ibridazione *in situ* per EBV (EBER). Nel caso dei DLBCL, NOS, si raccomanda la valutazione della *cell of origin* mediante algoritmi immunoistochimici, quali l'algoritmo di Hans (immunoreazione per CD10, Bcl6 e MUM1) o analoghi (algoritmo di Choi, Visco-Young, *etc*).

Una specifica descrizione dei reperti di rilevanza diagnostica per i linfomi a blasti B di media/grande taglia è riportata Tabella 8.2.

Tabella 8.2. Caratteristiche istologiche, fenotipiche e citogenetico-molecolari dei principali LNH-B a blasti di media/grande taglia

Entità	Caratteristiche morfologiche	Profilo immunoistochimico essenziale	Caratteristiche citogenetico-molecolari
Linfoma a grandi cellule B diffuso non altrimenti specificato	<u>Pattern di crescita</u>: diffuso, raramente intrasinusoidale, con stroma mixoide con presenza di macrofagi o componente istioide <u>Citologia</u>: centroblastica, immunoblastica, anaplastica, possibile differenziazione plasmacitica; varianti rare a cellule fusate o signet-ring	Marker pan-B (CD20, PAX5, CD79a, <i>ecc</i>), CD10+ (40%), Bcl6+ (80%), Bcl2+ (70%), CD30+ (15%), CD5+ (5%), Ki67 >30%, EBER-	Riarrangiamento di <i>BCL2</i> (~20%), <i>BCL6</i> (~30%) e di riarrangiamento isolato di <i>MYC</i> (~2-4%); sottotipi genetici recentemente riconosciuti da 3 studi indipendenti con possibile ruolo predittivo/prognostico (caratterizzazione non raccomandata dalle attuali classificazioni WHO e ICC 2022)

Tabella 8.2. Caratteristiche istologiche, fenotipiche e citogenetico-molecolari dei principali LNH-B a blasti di media/grande taglia

Linfoma a grandi cellule B diffuso/linfoma B di alto grado con riarrangiamento di MYC e BCL2 (i.e. linfoma double hit)	<u>Pattern di crescita:</u> diffuso <u>Citologia:</u> Centroblastica/immunoblastica, blastoide di media taglia o intermedia tra le due con piccoli centroblasti; possibile pattern <i>starry sky</i>	Marker pan-B (CD20, PAX5, CD79a, etc), CD10+, Bcl6+, c-Myc+, Bcl2+ nella maggior parte dei casi; elevato indice proliferativo	Presenza di riarrangiamento di MYC e BCL2 con o senza riarrangiamento di BCL6**
Linfoma B di alto grado non altrimenti specificato	<u>Pattern di crescita:</u> diffuso <u>Citologia:</u> variabile, cellule di media-piccola taglia ad abito blastoide o cellule pleomorfe, intermedia tra un linfoma di Burkitt e linfoma diffuso a grandi cellule B	Marker pan-B (CD20, PAX5, CD79a, etc), CD10+, Bcl6+, BCL2+ nella maggior parte dei casi; elevato indice proliferativo	Isolato riarrangiamento di MYC (8-58% dei casi)
Linfoma a grandi cellule B dei siti immunoprivilegiati (SNC, testicolo, vitreo-retinici)	<u>Pattern di crescita:</u> diffuso; perivascolare (SNC). <u>Citologia:</u> centroblastica, immunoblastica, possibile blastoide-Burkitt simile nel SNC	Marker pan-B (CD20, PAX5, CD79a, etc), cellula di origine non-GCB (80%): CD10-, MUM1+, BCL6+/-, Ki67 >30%, EBER-	Mutazioni <i>hotspot</i> di MYD88 e/o CD79B (ricerca non raccomandata ai fini diagnostici)
Linfoma a grandi cellule B primitivo del mediastino	<u>Pattern di crescita:</u> diffuso con sclerosi stromale <u>Citologia:</u> cellule di media-grossa taglia spesso con citoplasma chiaro; possibile componente a cellule simil- Reed-Stenberg	Marker pan-B (CD20, CD79a, OCT2, BOB1, etc); CD23 + (70%), CD30+ (60%), CD200+ (80-90%), CD15-, CD45+, Ki67>30%; variabile espressione di CD10, Bcl6 e MUM1	Non contributive ai fini diagnostici
Linfoma a grandi cellule B ricco in istiociti e cellule T	<u>Pattern di crescita:</u> diffuso con <10% cellule neoplastiche sparse singolarmente in ricco infiltrato infiammatorio (la presenza di aree nodulari simil-NLPHL/NLPBL esclude la diagnosi) <u>Citologia:</u> centroblastica, immunoblastica o sternbergoide	Marker pan-B (CD20, CD79a, OCT2, BOB1, etc), CD30+/-, CD15-, EMA+/-, BCL6+/-, EBER-	Non contributive ai fini diagnostici
Linfoma a grandi cellule B, EBV -positivo	<u>Pattern di crescita:</u> diffuso con frequente necrosi e infiltrato infiammatorio polimorfo <u>Citologia:</u> centroblastica, immunoblastica o sternbergoide	Marker pan-B (CD20, CD19, CD79a, OCT2, BOB1, etc), CD30+/-, CD15-, cellula di origine non GCB (90%), MUM1+ (~70%), EBER+ in >80% delle cellule neoplastiche	Non contributive ai fini diagnostici
Linfoma plasmablastico	<u>Pattern di crescita:</u> diffuso con possibili aree di necrosi e pattern <i>starry sky</i> <u>Citologia:</u> plasmablastica o immunoblastica monomorfa o polimorfo con differenziazione plasmacitica	CD20-, PAX5-, CD45-, CD79a+/- (40%), CD138+, MUM1+, BLIMP1+; EBER+ (70-80%), possibile restrizione del rapporto kappa/lambda	Riarrangiamento di MYC (~50%)

Tabella 8.2. Caratteristiche istologiche, fenotipiche e citogenetico-molecolari dei principali LNH-B a blasti di media/grande taglia

Linfoma di Burkitt	<u>Pattern di crescita:</u> diffuso e coesivo con aspetti "starry sky" <u>Citologia:</u> quadro monomorfo di blasti di media taglia con citoplasma basofilo e piccoli nucleoli	Marker pan-B (CD20, PAX5, CD79a, etc), CD10+, BCL6+, BCL2 – Ki67>95%; c-Myc >80%; EBER + (>90% forme endemiche e associate a immunodeficienza; ~20% forme sporadiche)	t(8;14)(q24;q32)-IGH::MYC; t(8;22)(q24;q11)-IGK::MYC; t(2;8)(p12;q24)-IGL::MYC
Linfoma a grandi cellule B primitivo cutaneo "leg type"	<u>Pattern di crescita:</u> diffuso e coesivo <u>Citologia:</u> grandi cellule con nucleoli prominenti, immunoblasti	Marker pan-B (CD20, PAX5, CD79a, etc), CD10 +/-, Bcl6 +/-, BCL2+, MUM1+, c-Myc+, IgM+	Non contributive ai fini diagnostici
DLBCL associato ad infiammazione cronica/piotorace	<u>Pattern di crescita:</u> diffuso <u>Citologia:</u> centroblastica o immunoblastica	CD20+/-, CD79a+, MUM1+/-, CD138 +/-, EBER+	Non contributive ai fini diagnostici
Linfoma a grandi cellule B con riarrangiamento di IRF4	<u>Pattern di crescita:</u> follicolare e/o diffuso <u>Citologia:</u> centroblastica o blastoide	Marker pan-B (CD20, PAX5, CD79a, etc), CD10+/-, Bcl6 +/-, MUM1+ (positività forte e diffusa), Bcl2+/-, CD5-/+	Traslocazione del gene <i>IRF4</i> (6p25.3); non riarrangiamenti di <i>BCL2</i> e <i>MYC</i>
Linfoma a grandi cellule B ALK-positivo	<u>Pattern di crescita:</u> diffuso <u>Citologia:</u> immunoblastica o plasmablastica	CD138+, BLIMP1+, MUM1+, CD20-, CD79a- PAX5-, EMA+, ALK+, restrizione del rapporto kappa/lambda	Riarrangiamento del gene <i>ALK</i> (2p23); traslocazione più frequente: t(2;17)(p23;q23)
Linfoma a grandi cellule KSHV/HHV8-positivo	<u>Pattern di crescita:</u> diffuso <u>Citologia:</u> immunoblastica o plasmablastica	CD20-/-, CD138-, KSHV/HHV8+, MUM1+, EBER-	Non contributive ai fini diagnostici
Linfoma delle cavità (i.e. primary effusion lymphoma)	<u>Pattern di crescita:</u> diffuso (forme extra-cavitarie) <u>Citologia:</u> immunoblastica o plasmablastica	CD138+, CD38+, MUM1+, CD20-, CD79a-, KSHV/HHV8+, EBER+/-	Non contributive ai fini diagnostici
Grey zone linfoma del mediastino	<u>Pattern di crescita:</u> diffuso o vagamente nodulare con aggregati confluenti di cellule neoplastiche <u>Citologia:</u> simil-linfoma di Hodgkin classico, simil-linfoma a grandi cellule B primitivo del mediastino o intermedia	Variabile espressione di marcatori B, CD15+ (50%) e CD30+; EBER- nella maggior parte dei casi	Non contributive ai fini diagnostici
Linfoma B di alto grado con aberrazioni di 11q	<u>Pattern di crescita:</u> diffuso o vagamente nodulare con aspetti <i>starry sky</i> <u>Citologia:</u> simil-linfoma di Burkitt	Marker pan-B (CD20, PAX5, CD79a, etc), CD10+, BCL6+, BCL2-/+ (debole), c-Myc+, Ki-67>90%, EBER-	Aberrazioni cromosomiche (gain/loss) di 11q; non traslocazione di <i>MYC</i>

Tabella 8.2. Caratteristiche istologiche, fenotipiche e citogenetico-molecolari dei principali LNH-B a blasti di media/grande taglia

Note. * I sottotipi genetici recentemente riconosciuti da tre studi indipendenti non sono attualmente inseriti nelle classificazioni WHO 5th e ICC 2022; ** casi con riarrangiamento solo di *MYC* e *BCL6* considerati entità provvisorie dalla classificazione ICC 2022 e non ammessi come entità a sé stanti dalla classificazione WHO 2022

c. Linfomi a cellule T periferiche

I LNH a cellule T periferiche sono un eterogeneo gruppo di rare neoplasie linfoidi prevalentemente dell'età adulta, caratterizzate da prognosi spesso severa. Tali patologie possono presentarsi in sede nodale o extra-nodale e includono: il linfoma anaplastico a grandi cellule (ALCL), a sua volta distinto in forme ALK-positive, ALK-negative o associate a protesi mammaria), i linfomi a cellule T *helper* follicolari (linfoma angioimmunoblastico [AITL], linfoma T follicolare e linfoma a cellule T *helper* follicolari non altrimenti specificati), il linfoma a cellule T associato a enteropatia (EATL), il linfoma a cellule T intestinale epiteliotropo monomorfo (MEITL), il linfoma T epatosplenico, il linfoma a cellule T/NK extra-nodale (ENKTL), il linfoma/leucemia a cellule T dell'adulto e i linfomi a cellule T periferiche non altrimenti specificati (PTCL, NOS). Nello spettro dei disordini linfoproliferativi a cellule T periferiche rientrano inoltre forme indolenti del tratto gastro-intestinale (a cellule T o NK) e alcune forme a presentazione prevalentemente leucemica (leucemia prolinfocitica a cellule T [T-PLL], leucemia a linfociti T o NK grandi e granulati [T/NK-LGCL], leucemia aggressiva a cellule NK).

Rilevi Clinico-Diagnostici

Per la diagnosi cito-istologica dei LNH a cellule T periferiche valgono le considerazioni svolte per i LNH a cellule B. Come precedentemente accennato, la maggior dei LNH a cellule T ha comportamento clinico aggressivo e prognosi severa: un corretto e tempestivo inquadramento diagnostico è pertanto necessario per avviare strategie terapeutiche adeguate. La valutazione istopatologica richiede inoltre un elevato grado di sospetto e un work-up teso a riconoscere: (i) possibili mimi istologici di tali linfomi (e.g. adenopatia di Kikuchi-Fujimoto; proliferazioni T in contesto di immunodeficienza; espansioni T reattive a infezioni virali o da altra causa); e (ii) possibili condizioni predisponenti i LNH a cellule T (e.g. celiachia refrattaria di tipo II nel caso dell'ETAL).

In tale contesto, l'esame istologico di biopsie incisionali/escissionali rappresenta il gold standard per la diagnosi dei LNH a cellule T. La valutazione agobiottica di tali patologie è spesso complessa e non dirimente; essa è pertanto sconsigliata, fatte salve condizioni di particolare urgenza clinica o di impossibilità di procedere più invasive. Le analisi molecolari e citogenetiche non sono raccomandate in tutti i casi. Esse, tuttavia, integrano la valutazione istologica di casi

particolarmente complessi e contribuiscono alla stratificazione clinica di alcune entità (e.g. riarrangiamenti di DUSP22 in ALCL, ALK-negativo). La valutazione immunofenotipica è di particolare utilità nella valutazione di infiltrati midollari (e.g. T/NK-LGLL o localizzazioni di altri LNH sistemici).

Rilievi Tecnico-Laboratoristici

Per la valutazione citologica/istologica valgono i principi generali esposti nel paragrafo relativo ai linfomi LNH a cellule B. La valutazione morfologica dei campioni biotici di linfonodo e di tessuti extra-nodali si basa su sezioni colorate con ematossilina/eosina o Giemsa e deve tenere conto di: (i) pattern di crescita delle popolazioni linfoidi, (ii) citologia delle cellule neoplastiche, (iii) microambiente infiammatorio di accompagnamento (particolarmente abbondante in AITL e alcune forme di ALCL e PTCL, NOS). La caratterizzazione immunoistochimica dei LNH a cellule T periferiche si basa sulla ricerca di marcatori pan-T (CD3, CD2, CD5, CD7 - la cui espressione è spesso difettiva), CD4, CD8, TIA1, perforina, granzyme B, CD30, CD56, ALK, TCR alfa/beta o gamma/delta e marcatori di cellule T helper follicolari (i.e. PD1, Bcl6, CD10, ICOS, CXCL13, ove un fenotipo T helper follicolare è definito dalla positività per ≥ 2 di tali marcatori). Di particolare utilità è inoltre l'ibridazione in situ per EBV (EBER), la cui positività correla con un limitato numero di neoplasie T/NK (ENKTL, leucemia aggressiva a cellule NK e alcuni PTCL, NOS). Marcatori di secondo/terzo livello sono TCL1 (specifico e molto utile per la diagnosi di T-PLL), CD57 (frequentemente associato a T-LGLL), MUM1 e EMA (associati ma non esclusivi di ALCL) e MATK (specifico di MEITL, per quanto non necessario nel work-up diagnostico di routine).

A seconda delle caratteristiche morfologiche e della presentazione clinica, si raccomanda il ricorso a pannelli che comprendano combinazioni di tali marcatori, secondo le caratteristiche essenziali di ciascuna entità riportate in Tabella 8.3.

Tabella 8.3 Caratteristiche istologiche, fenotipiche e citogenetico-molecolari dei LNH a cellule T

Entità	Caratteristiche morfologiche	Profilo immunoistochimico	Caratteristiche citogenetico-molecolari di rilievo diagnostico
Linfoma anaplastico a grandi cellule (ALK-positivo; ALK-negativo)	<u>Pattern di crescita linfonodale</u> : intra-sinusale, interstiziale o diffuso <u>Citologia</u> : blasti di grande taglia con aspetti di anaplasia e <i>hallmark</i> cells; rare forme a piccole cellule nell'ALCL ALK-positivo	CD30+ (positività intensa e diffusa), ALK1+ (forme ALK-positive), frequente difettività per multipli marker pan-T (CD3, CD2, CD5, CD7), variabile espressione di CD4 e/o CD8 (CD4>CD8), TIA1+, perforina+, granzyme B+, MUM1+/-, EMA+/-, CD45+/-	<u>ALCL, ALK-positivo</u> : variabili traslocazioni di ALK, la più comune delle quali t(2;5)(p23;q35) <u>ALCL, ALK-negativo</u> : riarrangiamento di DUSP22 in circa il 30% dei casi; riarrangiamento di TP63 in circa l'8% dei casi

Tabella 8.3 Caratteristiche istologiche, fenotipiche e citogenetico-molecolari dei LNH a cellule T

Linfoma anaplastico a grandi cellule associato a protesi mammaria	<u>Pattern di crescita:</u> cellule neoplastiche disperse o in aggregato nell'essudato periprotetico o a varia profondità nello spessore della capsula peri-protetica <u>Citologia:</u> blasti di grande taglia con aspetti di anaplasia e <i>hallmark cells</i>	CD30+ (positività intensa e diffusa), ALK1-, frequente difettività per multipli marker pan-T (CD3, CD2, CD5, CD7), variabile espressione di CD4 e/o CD8 (CD4>CD8), TIA1+, perforina+, granzyme B+, MUM1+/-, EMA+/-, CD45+/-	Assenza di riarrangiamenti del gene <i>ALK</i>
Linfomi a cellule T helper follicolari	<u>Pattern di crescita linfonodale:</u> diffuso (AITL e forme non altrimenti specificate); nodulare (forme follicolari a cellule T) <u>Citologia:</u> cellule atipiche di piccola/media taglia con citoplasma chiaro; ricco infiltrato infiammatorio di eosinofili, plasmacellule, istiociti e linfociti B e T (AITL e alcune forme non altrimenti specificate); ampie reti di cellule follicolari dendritiche distorte (ATIL)	Marker pan-T (CD3, CD2, CD5, CD7 – rara difettività prevalentemente per CD7), CD4+, CD8-, ≥2 marker T helper follicolari (PD1, CD10, Bcl6, ICOS, CXCL13), CD30+/-	Mutazioni ricorrenti di <i>ROHA</i> , <i>IDH2</i> , <i>TET2</i> , <i>DNMT3A</i> *
Linfoma a cellule T associato a enteropatia	<u>Pattern di crescita nel tratto intestinale:</u> diffuso, spesso transmurale; <u>Citologia:</u> linfociti atipici di media/grande taglia, anche sternbergoidi; ricco infiltrato infiammatorio di accompagnamento	Variabile difettività per marker pan-T (CD3, CD2, CD5, CD7), CD4-/CD8- (o, più raramente, CD8+), CD30+ (intensità variabile), CD56-, TIA1+, granzyme+, perforina+, EBER-	Non contributive ai fini diagnostici
Linfoma a cellule T intestinale epiteliotropo monomorfo	<u>Pattern di crescita nel tratto intestinale:</u> spiccato epiteliotropismo, pattern di crescita diffuso spesso transmurale; <u>Citologia:</u> linfociti atipici di media taglia; minimo infiltrato infiammatorio di accompagnamento	Variabile difettività per marker pan-T (CD3, CD2, CD5, CD7), CD8+, CD56+, CD30-, TIA1+, granzyme B+/-, perforina+/-, EBER-, MATK+	Non contributive ai fini diagnostici
Linfoma T epatosplenico	<u>Pattern di crescita splenico:</u> intra-sinusoidale nella polpa rossa; <u>Pattern di crescita epatico e midollare:</u> intra-sinusoidale <u>Citologia:</u> linfociti atipici di media taglia	Marker pan-T (CD3, CD2, CD7), CD5-, CD4-, CD8-/+, TCR gamma/delta+ §, CD56+/-, TIA1+, granzyme B-, perforina-	Iso7q, cromosoma 7 ad anello con amplificazione 7q, trisomia 8
Linfoma a cellule T/NK extra-nodale di tipo nasale	<u>Pattern di crescita:</u> angiocentrico, angiodistruttivo e diffuso; <u>Citologia:</u> linfociti atipici di taglia variabile; frequenti aree di necrosi	s/cCD3+, CD2+, CD7+/-, CD5-/+, CD4-, CD8-/+, CD30+/-, CD56+, TIA1+, granzyme B+, perforina+, EBER+	Non contributive ai fini diagnostici
Linfoma/leucemia a cellule T	<u>Pattern di crescita:</u> variabile (intra-sinusale, nodulare, Hodgkin-like); <u>Citologia:</u> linfociti atipici di piccola/media o grande taglia variabile con nucleo polilobato	CD3+, CD2+, CD5+, CD7-, CD4+/CD8- (o raramente CD4+/CD8+ e CD4-/CD8+), CD25+, CD30+/-, FOXP3+/-	Documentazione di infezione da parte di HTLV1

Tabella 8.3 Caratteristiche istologiche, fenotipiche e citogenetico-molecolari dei LNH a cellule T

Linfoma a cellule T non altrimenti specificato	<u>Pattern di crescita:</u> diffuso o vagamente nodulare; <u>Citologia:</u> linfociti atipici di piccola/media o grande taglia; variabile infiltrato infiammatorio di accompagnamento	Variabile difettività per marker pan-T (CD3, CD2, CD5, CD7), variabile espressione di CD4 e CD8, CD30-/, ALK-, variabile espressione di TIA1, perforina, granzyme; EBER-	Non contributive ai fini diagnostici
Leucemia a linfociti T/NK grandi e granulati	<u>Pattern di crescita splenico:</u> sinusoidale e interstiziale nella polpa rossa; <u>Pattern di crescita midollare:</u> intra-sinusoidale e interstiziale con piccoli aggregati centro-lacunari; <u>Citologia:</u> linfociti di piccola/media taglia con ampio citoplasma granulato	<u>Forme a cellule T</u> Marker pan-T (CD3, CD2, CD5, CD7), CD8+ ^, TIA1+, perforina+, granzyme+, CD56-, CD57+/- <u>Forme a cellule NK</u> sCD3-, cCD3+, CD2+/-, CD5-, CD7+/-, CD4-, CD8+/-, TIA1+, perforina+, granzyme+, CD56+, CD57+/-	Frequenti mutazioni di <i>STAT3</i> e <i>STAT5B</i>
Leucemia prolinfocitica T	<u>Pattern di crescita midollare:</u> interstiziale, intra-sinusoidale o diffuso; <u>Pattern di crescita cutaneo:</u> perivascolare, interstiziale e diffuso; <u>Citologia:</u> linfociti atipici di piccolo/media taglia nucleolati	Marker pan-T (CD3, CD2, CD5, CD7), CD4+, CD8- °, CD52+, TCL1+°, S100-/+	inv(14)(q11;q32) o t(14;14)(q11;q32); raramente t(X;14)(q28;q11)
Leucemia aggressiva a cellule NK	<u>Pattern di crescita:</u> interstiziale, intra-sinusoidale o diffuso; <u>Citologia:</u> linfociti atipici di piccolo/media taglia	cCD3+, sCD3-, CD2+/-, CD7+/-, CD5-, CD4-, CD8-/, CD56+, TIA1+, granzyme B+, perforina+, EBER+	Non contributive ai fini diagnostici
Note. (*) numerose altre mutazioni e/o traslocazioni non utilizzate nella diagnostica di routine; (§) rare forme TCR alfa/beta+; (^) rare forme CD4+ o CD4-/CD8-; (°) rare forme CD4+/CD8+, CD8+/CD4- o CD4-/CD8-; (°°) l'espressione di TCL1 manca nelle rare forme con t(X;14)(q28;q11).			

d. Linfomi a cellule T primitivi cutanei

I LNH a cellule T primitivi cutanei comprendono varie entità tra cui la micosi fungoide, la sindrome di Sezary, i disordini linfoproliferativi a cellule T CD30-positive primitivi cutanei (papulosi linfomatoide e ALCL primitivo cutaneo), il linfoma a cellule T simil-panniculitico, il disordine linfoproliferativo primitivo cutaneo a cellule T CD4-positive di piccola/media taglia, il linfoma a cellule T gamma/delta primitivo cutaneo, il linfoma aggressivo a cellule T citotossiche CD8-positive primitivo cutaneo, il disordine linfoproliferativo a cellule T CD8-positivo delle sedi acrali e linfomi a cellule T primitivi cutanei non altrimenti specificati.

Rilievi Clinico-Diagnostici

La diagnosi dei linfomi a cellule T primitivi cutanei richiede una stretta collaborazione clinico-patologica, essendo necessaria l'integrazione di dati dermatologici e istopatologici nella maggior parte dei casi. Un corretto inquadramento di tali lesioni si basa infatti sulla sede e le caratteristiche delle lesioni cutanee, il loro decorso temporale, la presenza/assenza di specifici reperti clinici o laboratoristici e la loro presentazione microscopica. In tale contesto, l'esame istologico costituisce parte fondamentale dell'iter diagnostico, mentre la valutazione citologica non è raccomandata.

La peculiarità dei disordini linfoproliferativi T primitivi cutanei raccomanda un approccio istologico prudente, che tenga anche in considerazione (i) la frequente sovrapposizione morfologica tra quadri infiammatori e forme precoci di neoplasie linfoidi, (ii) la possibilità che patologie clinicamente molto diverse presentino quadri istologici sovrapponibili (e.g. ALCL primitivo cutaneo, papulosi linfomatoide di tipo C e trasformazione a grandi cellule di micosi fungoide), e (iii) la frequente localizzazione cutanea di linfomi T sistemici che mimano forme primitive cutanee (e.g. AITL, ETNKL o ALCL, ALK-negativo). Specie in assenza di dettagliate notizie cliniche/dermatologiche, i referti istologici devono essere strutturati in modo da esplicitare lo spettro di diagnosi differenziali, raccomandando integrazione tra dati clinici e patologici.

In casi dubbi o complessi, la diagnosi dei linfomi T primitivi cutanei beneficia di analisi molecolari per riarrangiamento del *TCR*. Tali studi integrano i reperti istologici e devono essere interpretati anche alla luce del quadro clinico. Limitato ruolo diagnostico hanno le analisi mutazionali mediante metodiche NGS. Le analisi citofluorimetriche non sono utilizzate nella diagnosi degli infiltrati cutanei, ma hanno un ruolo fondamentale nell'individuazione di popolazioni circolanti in corso di sindrome di Sezary o di altre patologie leucemizzate.

Rilievi Tecnico-Laboratoristici

Per la valutazione istologica dei campioni di cute valgono i principi generali esposti nel paragrafo introduttivo del presente documento. In generale, la diagnosi di linfoma T primitivo cutaneo viene posta su biopsie escissionali (se papulle/noduli di piccole/medie dimensioni) o *punch* (se placche/chiazze di ampie dimensioni o a margini sfumati). Le biopsie dovrebbero comprendere tutti gli strati della cute (epidermide, derma e parte superficiale dell'ipoderma) e, ove possibile, dovrebbero essere ottenute su lesioni in fase florida, anche considerando il confine tra area lesionale e cute indenne.

I campioni fissati in formalina e processati in paraffina sono valutati con sezioni colorate con ematossilina/eosina o Giemsa. Per escludere micosi cutanee, si consiglia inoltre la colorazione con acido periodico di Schiff (o analoghi). A seconda delle caratteristiche morfologiche e della presentazione clinica, si raccomanda il ricorso a pannelli che comprendano combinazioni di

marcatori simili a quelli di cui al paragrafo dei linfomi a cellule T periferiche, secondo le caratteristiche essenziali di ciascuna entità (Tabella 8.4).

Tabella 8.4 Caratteristiche istologiche, fenotipiche e citogenetico-molecolari dei principali linfomi T primitivi cutanei

Entità	Caratteristiche morfologiche	Profilo immunoistochimico essenziale	Caratteristiche citogenetico-molecolari di rilievo diagnostico
Micosi fungoide	<u>Pattern di crescita:</u> - <i>Fase di chiazza (precoce):</i> aggregati perivascolari, interstiziali nel derma superficiale; variabile (spesso minimo) epidermotropismo; disposizione dei linfociti "in filiera" lungo lo strato basale dell'epidermide; fibrosi del derma papillare; possibili quadri variabili con aspetti psoriasiformi lichenoidi, spongiosi o atrofico-lichenoidi; - <i>Fase di placca:</i> incremento dell'infiltrato linfoide, esteso al derma reticolare; evidente epidermo- tropismo, frequenti microascessi di Pautrier; - <i>Fase tumorale:</i> infiltrazione diffusa del derma con possibile estensione all'ipoderma; - <i>Varianti morfologiche:</i> follicolotropa, siringotropa, granulomatosa, pagetoide <u>Citologia:</u> linfociti maturi di piccola/media taglia con nucleo irregolare/cerebroide; trasformazione a grandi cellule (>25% dell'infiltrato costituito da cellule di grossa taglia)	Marker pan-T (CD3, CD2, CD5, CD7 – frequente negatività per CD7), CD4+, CD8- (rare forme CD8+ o CD4-/CD8-), TCR alfa/beta+ (rare forme TCR gamma/delta+); variabile proporzione di elementi CD30+ (soprattutto in fase di placca o tumorale)	Non contributive ai fini diagnostici
Sindrome di Sézary	<u>Pattern di crescita cutaneo:</u> variabile infiltrato cutaneo nel derma superficiale (spesso minimo e perivascolare), variabile epidermotropismo (come in fase di chiazza o placca di micosi fungoide); l'assenza di un quadro istopatologico non esclude la diagnosi <u>Citologia:</u> linfociti maturi di piccola/media taglia con nucleo irregolare/cerebroide; rara possibile trasformazione a grandi cellule	Marker pan-T (CD3, CD2, CD5, CD7 – frequente negatività per CD7), CD4+, CD8-, TCR alfa/beta+, PD1+ (cfr anche criteri citofluorimetrici per la diagnosi di sindrome di Sézary)	Non contributive ai fini diagnostici
Papulosi linfomatoide	<u>Pattern di crescita:</u> - <i>tipo A</i> (>80% dei casi): infiltrato infiammatorio misto con blasti atipici di grande taglia non-epidermotropi; - <i>tipo B</i> (<5% dei casi): infiltrato simil-micosi fungoide - <i>tipo C</i> (10% dei casi): aggregati confluenti di blasti di grande taglia (simil-ALCL) - <i>tipo D</i> (<5% dei casi): infiltrato epidermotropo atipico CD8+	- <i>Tipo A e C:</i> CD30+ (positività intensa e diffusa), ALK1-, frequente difettività per multipli marker pan-T (CD3, CD2, CD5, CD7), variabile espressione di CD4 e/o CD8 (CD4>CD8), TIA1+, perforina+, granzyme B+, MUM1+, CD45+/- - <i>Tipo B:</i> marker pan-T (CD3, CD2, CD5, CD7), CD4+, CD8-, CD30-	Non riarrangiamento del gene <i>ALK</i> ; riarrangiamento del cromosoma 6p25.3 nella variante con riarrangiamento di <i>DUSP22</i>

Tabella 8.4 Caratteristiche istologiche, fenotipiche e citogenetico-molecolari dei principali linfomi T primitivi cutanei

	- <i>tipo E</i> (<5% dei casi): angiocentrico e angiodistruttivo con necrosi - con riarrangiamento di <i>DUSP22</i>: bifasico (epidermotropo da parte di linfociti di piccola/media taglia e dermico con elementi atipici di media/grande taglia) - <i>Altre varianti rare</i>: follicolotropa, siringotropa, granulomatosa <u>Citologia</u>: blasti sterbergoidi di grande taglia (tipo A e C); linfociti atipici di piccola/ media taglia con nucleo irregolare (tipo B, D, E)	- <i>Tipo D ed E</i>: marker pan-T (CD3, CD2, CD5, CD7), CD4-, CD8+, CD30+ - <i>Con riarrangiamento di DUSP22</i>: marker pan-T (CD3, CD2, CD5, CD7), CD4-/CD8+ o CD4-/CD48-, CD30+	
Linfoma anaplastico a grandi cellule primitivo cutaneo	<u>Pattern di crescita</u>: diffuso <u>Citologia</u>: blasti di media/grande taglia, anche sternbergoidi	CD30+ (positività intensa e diffusa), ALK1-, frequente difettività per multipli marker pan-T (CD3, CD2, CD5, CD7), variabile espressione di CD4 e/o CD8 (CD4>CD8), TIA1+, perforina+, granzyme B+, MUM1+, CD45+/-	Non riarrangiamento di <i>ALK</i>
Linfoma a cellule T simil-panniculitico	<u>Pattern di crescita</u>: infiltrato limitato all'ipoderma a distribuzione peri-adipocitaria <u>Citologia</u>: linfociti atipici di piccola/ media taglia	Marker pan-T (CD3, CD2, CD5, CD7 – frequente negatività per CD7), CD4-, CD8+, TCR alfa/beta+, TCR gamma/delta-, TIA1+, perforina+, granzyme B+	Possibile mutazione <i>germline</i> di <i>HAVCR2</i> (caratteristica ma non necessaria ai fini diagnostici)
Disordine linfoproliferativo a cellule T CD4-positivo di piccola/media taglia primitivo cutaneo	<u>Pattern di crescita</u>: infiltrato dermico non epidermotropo a pattern di crescita nodulare/diffuso con ricca componente infiammatoria <u>Citologia</u>: linfociti atipici di piccola/ media taglia	Marker pan-T (CD3, CD2, CD5, CD7), CD4+, CD8-, TCR alfa/beta+, TCR gamma/delta-, ≥2 marker T <i>helper</i> follicolari (PD1, Bcl6, ICOS, CXCL13), CD30-/+, CD10-	Non contributive ai fini diagnostici
Linfoma a cellule T gamma/delta primitivo cutaneo	<u>Pattern di crescita</u>: variabile epidermo- tropo, dermico, ipodermico o misto <u>Citologia</u>: linfociti atipici di piccola/ media o raramente grande taglia	Marker pan-T (CD3, CD2, CD5, CD7), CD4+, CD8-, TCR alfa/beta+, TCR gamma/delta-, ≥2 marker T <i>helper</i> follicolari (PD1, Bcl6, ICOS, CXCL13), CD30-/+, CD10-	Non contributive ai fini diagnostici
Linfoma aggressivo a cellule T citotossiche CD8-positivo primitivo cutaneo	<u>Pattern di crescita</u>: epidermotropismo con variabili infiltrazione dermo/ipodermica, necrosi ed angiotropismo <u>Citologia</u>: linfociti atipici di piccola/media o raramente grande taglia	Variabile difettività di marker pan-T (CD3, CD2, CD5, CD7), CD4-, CD8+, TCR alfa/beta+, TCR gamma/delta-, CD30-	Non contributive ai fini diagnostici
Disordine linfoproliferativo a cellule T CD8-positivo delle sedi acrali	<u>Pattern di crescita</u>: infiltrato dermico non epidermotropo a pattern di crescita diffuso/vagamente nodulare <u>Citologia</u>: linfociti atipici di media taglia	Marker pan-T (CD3, CD2, CD5, CD7), CD4-, CD8+, TCR alfa/beta+, TCR gamma/delta-, TIA1+, perforina-, granzyme B-, CD68+ (<i>dot-like</i>)	Non contributive ai fini diagnostici

8.2 Valutazione immunofenotipica

a. Linfomi non Hodgkin a cellule B periferiche di alto e basso grado

Rilievi Clinico-Diagnostici

Nel contesto di una valutazione multidisciplinare, che include necessariamente anche l'analisi istologica, immunoistochimica e genetico-molecolare, la citometria a flusso è raccomandata nel processo diagnostico dei linfomi non Hodgkin a cellule B mature in alcune situazioni particolari:

Nel sospetto di una malattia linfoproliferativa cronica leucemica.

Dopo aver identificato la presenza di una popolazione B clonale mediante la valutazione della restrizione dell'espressione delle catene leggere *kappa* o *lambda* di superficie o intracitoplasmatiche è possibile caratterizzare le cellule leucemiche secondo quanto riportato nel paragrafo 9.2.

Nella stadiazione di malattia, per individuare piccole popolazioni B clonali a livello midollare.

In questo caso, la valutazione dell'espressione delle catene leggere *kappa* e *lambda* associata all'analisi contemporanea dell'espressione di altri marcatori (es. CD19, CD20, CD10, CD5, CD38, CD45) permette di identificare la presenza di piccole popolazioni clonali ad elevata sensibilità (*van Dongen, 2012; Gaidano, V. et al. 2020*).

Nell'individuazione di localizzazioni di malattia extra midollare: es. sistema nervoso centrale.

In questo caso la citometria a flusso, eseguita su campione stabilizzato (vedi paragrafo 4.4), permette l'identificazione di piccole popolazioni B clonali con un approccio simile a quanto riportato nel precedente punto (*Peñalver FJ, 2017*).

Nell'analisi dell'espressione di antigeni target di immunoterapia.

La possibilità di studiare contemporaneamente la restrizione clonale *kappa/lambda* e l'espressione di diversi antigeni, permette di analizzare la presenza di antigeni target di immunoterapia (es. CD19, CD22, CD20) sulle cellule B neoplastiche.

Rilievi Tecnico-Laboratoristici

Si prega di fare riferimento a quanto riportato nel paragrafo 4.4 per gli aspetti generali e al paragrafo 9.2 (Tabella 9.1) per i marcatori utili all'inquadramento diagnostico delle più comuni forme di LNH B di piccola/media e per il linfoma diffuso a grandi cellule B. Per maggior dettagli si rimanda inoltre alla seguente fonte bibliografica: *Gaidano V et al 2020*.

b. Linfomi a cellule T periferiche

L'analisi immunofenotipica mediante citometria a flusso rappresenta un'analisi accessoria nell'algoritmo diagnostico standard per i linfomi non Hodgkin a cellule T mature, che essenzialmente si basa su un approccio integrato che include la valutazione clinica, la morfologia, l'immunoistologia, la citogenetica e gli studi molecolari (*Jevremovic D. et al. 2019, Morán-Plata FJ et al. 2024*).

In particolare, la citometria a flusso risulta utile nella caratterizzazione delle cellule T anomale nel sangue periferico o nell'aspirato di midollo (vedi paragrafo 4.1 e 9.2).

Rilievi Tecnico-Laboratoristici

Si prega di fare riferimento a quanto riportato nel paragrafo 4.4 per gli aspetti generali e nel paragrafo 9.2 nelle sezioni dedicate all'inquadramento diagnostico delle malattie linfoproliferative T e NK. e nelle seguenti fonti bibliografiche: *Jevremovic D. et al. 2019, Morán-Plata FJ. 2024*.

8.3 Citogenetica e genetica molecolare

a. Linfomi non Hodgkin a cellule mature B

Rilievi Clinico-Diagnostici

L'elevata eterogeneità clinico-biologica dei linfomi non-Hodgkin (LNH) a cellule B mature impone un approccio diagnostico integrato e multidisciplinare, in cui risultano imprescindibili le indagini citogenetiche, l'ibridazione in situ mediante fluorescenza (FISH) e le analisi molecolari, al fine di una corretta classificazione nosologica delle diverse entità patologiche. Tali indagini genetiche contribuiscono non solo all'identificazione degli eventi oncogenetici driver, ma anche al riconoscimento di alterazioni genetiche secondarie, spesso dotate di rilevanza prognostica in numerose entità nosologiche.

L'analisi del cariotipo è fortemente raccomandata, risultando spesso più agevolmente eseguibile rispetto all'analisi su tessuto tumorale fresco, in presenza di un infiltrato midollare significativo, sia nelle forme indolenti che nei linfomi aggressivi. Inoltre, l'applicazione della FISH in metafase consente di evidenziare inserzioni talora criptiche di *MYC*, *BCL2* e *CCND1* o delle sequenze dei loci che codificano per le immunoglobuline.

Nei linfomi aggressivi B la FISH è fondamentale nella definizione diagnostica del linfoma di Burkitt, (LB), del linfoma diffuso a grandi cellule B (*diffuse large B cell lymphoma*, DLBCL) e del linfoma B di alto grado (*high grade B cell lymphoma*, HGBL) con riarrangiamento di *MYC* e *BCL2* e la scelta dei marcatori da valutare deve essere guidata dal patologo sulla base della valutazione istologica e dei risultati dell'immunoistochimica (Tabella 8.2).

La Tabella 8.5 riassume le principali indicazioni all'analisi citogenetica, i marcatori da valutare mediante FISH e le indagini molecolari nelle forme più comuni di linfomi B. Non si tratta di un elenco esaustivo, ma di una selezione mirata delle indicazioni più rilevanti e facilmente applicabili nella pratica dei nostri laboratori, con rinvio alle fonti bibliografiche per eventuali approfondimenti (Lefebvre G et al 2023; de Leval L et al, 2022).

Tabella 8.5 Indicazioni all'analisi citogenetica, FISH e indagini molecolari nei linfomi B a cellule mature			
Patologia	Analisi citogenetica	Sonde FISH indispensabili/raccomandate	Analisi Molecolare
Linfoma follicolare (FL)	Raccomandato	<i>BCL2</i> , <i>BCL6</i> se <i>BCL2</i> non riarrangiato o LF a grandi cellule B; del 1p36 (TNFRSF14) in FL con pattern di crescita diffuso	
Linfoma Mantellare	Indispensabile se BM o PB infiltrato; (Cariotipo complesso ^b)	<i>IGH::CCND1</i> , o <i>CCND1</i> Peri casi <i>CCND1</i> negativi, <i>CCND2</i> e <i>CCND3</i> ^a e/o IGH, IGL	<i>TP53</i> (richiesto/fortemente raccomandato secondo NCCN)
Linfomi della zona marginale (MZL)	Raccomandato (alterazioni citogenetiche tipiche ^c)	<i>BCL2</i> , <i>CCND1</i>	<i>MYD88</i> L265
MZL extranodali/mucosa associati	Raccomandata	<i>BIRC3::MALT1</i> o <i>MALT1</i> se localizzazione gastrica; <i>MALT1</i> e <i>BCL2</i> se <i>MALT1</i> non riarrangiato ^d	
MZL Nodali	Raccomandata		
MZL Splenici	Indispensabile se BM o PB infiltrato	del7q32 utile nella diagnosi differenziale con MW	
Hairy Cell Leukemia	Non indicata	No alterazioni specifiche	<i>BRAF</i> V600E
Linfoma linfoplasmocitico/Macroglobulinemia di Waldenström	Raccomandata	Del6q21/6q23, <i>TP53</i> delezione	<i>MYD88</i> , <i>CXCR4</i> se disponibile un metodo molto sensibile, (<i>TP53</i>)
Linfoma di Burkitt	Indispensabile se BM o PB infiltrato	<i>MYC</i> , <i>BCL2</i> , <i>BCL6</i> , <i>IGH/MYC</i> se <i>MYC</i> non è riarrangiato	
Linfomi diffusi a grandi cellule (DLBCL) GCB-type e Linfomi B di alto grado (HGBL)	Raccomandata	<i>MYC</i> , (<i>IGH/MYC</i> se <i>MYC</i> non è riarrangiato), <i>BCL2</i> se <i>MYC</i> è riarrangiato, <i>BCL6</i>	
Linfomi di alto grado/linfomi di alto grado con alterazioni in 11q (HG/LBCL-11q)	Raccomandata	11q23/11q24, <i>MYC</i> (<i>IGH/MYC</i>)	
Linfomi B a grandi cellule con riarrangiamento di <i>IRF4</i> (LBCL- <i>IRF4</i>)	Raccomandata	<i>IRF4</i> , <i>MYC</i> , <i>BCL2</i> (<i>IGH</i> se <i>IRF4</i> negativo)	

BM: bone marrow; PB peripheral blood; MW Macroglobulinemia di Waldenström;

^aIn caso di sonde commerciali non disponibili per *CCND2* e *CCND3*, considerare l'utilizzo di sonde *IGK* e *IGL*

^b Nel linfoma mantella re il cariotipo complesso è definito con 4 o più alterazioni ed ha un significato prognostico.

^c I linfomi della zona marginale presentano caratteristiche citogenetiche distinte da altri linfomi con prevalenza di +3/3q e/o +18/18q, +1q, +8q, +12q, del6q; l'associazione +3/+18 si riscontra in circa il 20% dei casi.

^d t(11;18)(q22;q21) *BIRC3::MALT1* (sede polmone, intestino e stomaco); t(14;18)(q32;q21) *IGH::MALT1* sede oculare e ghiandole salivari; t(3;14)(p14.1;q32) *IGH::FOXP1* sede tiroide, annessi oculari, orbita; t(1;14)(p22;q32) *IGH::BCL10* molto raro sede polmone e intestino;

Analisi della clonalità

Attualmente, il gold standard per l'analisi della clonalità nei linfomi è rappresentato dal test BIOMED-2/EuroClonality, sviluppato e validato dal Consorzio EuroClonality. Per valutare la clonalità delle cellule B, si eseguono reazioni di PCR multiplex per rilevare i riarrangiamenti dei geni *IGH*, della catena leggera kappa (*IGK*) e della catena leggera lambda (*IGL*), seguite da analisi dei frammenti mediante GeneScan o analisi dell'eteroduplex (heteroduplex analysis). L'applicabilità del test BIOMED-2/EuroClonality nei linfomi Non Hodgkin è molto elevata ed è considerata uno standard diagnostico per l'analisi della clonalità delle cellule B e T. Il test è in grado di rilevare riarrangiamenti clonali nei geni delle immunoglobuline (*IGH*, *IGK*, *IGL*) in oltre il 90-95% dei casi di linfomi B a cellule mature. Nei linfomi T, il test valuta i riarrangiamenti dei geni delle catene del recettore T per l'antigene (TCR), soprattutto TCRG e TCRB, con una sensibilità generalmente tra il 70 e il 90%, a seconda del tipo di linfoma T e della qualità del DNA. L'efficienza può essere lievemente inferiore nei campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina, ma rimane comunque alta (circa 85–90% di sensibilità) (*Langerak AW et al, 2012*).

Recentemente, il gruppo di lavoro EuroClonality-NGS ha sviluppato un test basato sul sequenziamento di nuova generazione (NGS) per il rilevamento dei riarrangiamenti dei geni IG (*IG-NGS*). In questo test sono stati progettati nuovi primer per bersagli complementari dei geni IG, con l'obiettivo di generare ampliconi di lunghezza ridotta, in particolare per i bersagli incompleti di *IGH* e per quelli di *IGK*. Ciò consente una migliore rilevazione della clonalità nel DNA genomico estratto da tessuti fissati, specialmente nei campioni con DNA di qualità subottimale. Un ulteriore vantaggio dell'approccio *IG-NGS* è la disponibilità immediata della sequenza dei clonotipi identificati, sia del clone maligno che delle cellule B non neoplastiche residue. Questo fornisce informazioni più affidabili per identificare cloni minori in un contesto policlonale e per valutare la relazione clonale tra diverse neoplasie B nello stesso paziente (*van den Brand M et al, 2023*).

b. Linfomi T

Citogenetica e genetica molecolare

La diagnostica citogenetica e molecolare nei linfomi T è più complessa e meno standardizzata rispetto ai linfomi B, ma sta acquisendo sempre maggiore importanza per la classificazione, la diagnosi differenziale e, in alcuni casi, per la prognosi e la scelta terapeutica. Nei linfomi T le anomalie cromosomiche sono spesso aspecifiche o complesse, ma in alcuni sottotipi sono stati identificati riarrangiamenti ricorrenti come, per esempio, le delezioni a carico di 6q, 9p e 10q nei linfomi T periferici non altrimenti specificati (PTCL-NOS) e alterazioni dei loci 14q11 (locus *TCRA*) e 7q34 (*TCRB*). Per quanto riguarda i riarrangiamenti specifici si segnala la traslocazione t(2;5)(p23;q35) che dà origine alla fusione *NPM1::ALK* tipica del linfoma anaplastico a grandi cellule ALK+, l'inversione inv(14)(q11;q32) t(14;14) che vede coinvolto il recettore T *TCRAD* ed è tipica del linfoma prolinfocitico T. Molto rara la traslocazione t(5;14)(q35;q32) che comporta la fusione *ITK::SYK* che si riscontra in un raro sottotipo di linfoma T periferici (*de Leval L et al, 2022*).

La diagnosi molecolare dei linfomi T include lo studio della clonalità TCR e alcune mutazioni e fusioni geniche (Tabella 8.3). Data la rarità e la complessità biologica di queste neoplasie l'impiego di tecnologie high-throughput e la centralizzazione in centri di riferimento rappresenta l'approccio più adeguato per garantire qualità analitica, interpretazione integrata e accesso a pannelli diagnostici aggiornati (*de Leval L et al, 2022*).

8.4 Malattia di Castleman

La malattia di Castleman (MC) è una rara patologia linfoproliferativa, con variabile presentazione clinica e istologica. Tradizionalmente si distinguono due forme di MC: (i) una forma unicentrica (MCU) e (ii) una forma multicentrica (MCM) (*Dispenzieri A et al, 2020*).

La MCU si presenta con lesioni nodali/extranodali asintomatiche o con sintomi legati a effetto massa, ha decorso clinico indolente e non tende alla disseminazione sistemica. La MCM si presenta invece con adenopatie multidistrettuali, spesso associate a sintomi sistemici e ad alterazioni degli esami ematochimici. A seconda dell'etiologia si distinguono 3 forme principali di MCM: (i) la MCM associata a HHV8 (HHV8-MCM); (ii) la MCM associata a sindrome POMES (POEMS-MCM); (iii) la MCM idiopatica (iMCM), a sua volta distinta in iMCM associata a sindrome TAFRO (iMCM-TAFRO) e non altrimenti specificata (iMCM-NOS) (Tabella 8.6).

La diagnosi di MC si basa sulla valutazione istologica di lesioni nodali/extra-nodali sospette e, per la MCM, sull'integrazione con dati clinici, laboratoristici e radiologici. Le analisi immunofenotipiche e citogenetico-molecolari non sono necessarie per la diagnosi di MC. Tali metodiche rivestono tuttavia un potenziale ruolo nella diagnosi differenziale con altri processi linfoproliferativi.

Valutazione citologica/istologica del midollo osseo

Rilievi Clinico-Diagnostici

La valutazione morfologica riveste un ruolo fondamentale per la diagnosi di MC. Gold standard per la valutazione morfologica è l'esame istologico di biopsie incisionali/escissionali di adenopatie sospette. L'esame di agobiopsie è sconsigliato e, anche in presenza di alterazioni simil-MC, dovrebbe essere integrato con biopsie chirurgiche in tutti i casi possibili. La diagnosi di MC non è effettuabile su citologia da aspirati linfonodali.

Nel caso della MCU, la diagnosi microscopica è criterio necessario e sufficiente per definire la malattia. Nel caso della MCM, invece, alla valutazione istologica deve aggiungersi un work-up clinico volto ad escludere patologie disimmuni/autoimmuni, neoplastiche o infettive, che possono mimare istologicamente la MCM. Nell'ipotesi di MCM è quindi consigliabile formulare una diagnosi istologica di compatibilità o sospetto, differendo la diagnosi definitiva dopo integrazione con i dati clinici.

La valutazione microscopica dei linfonodi con MC dimostra 3 pattern istologici principali: (i) un pattern ialino-vascolare (i.e. deplezione, sclerosi e twinning dei centri germinativi con aspetti lollipop-like dei follicoli; proliferazione di vasi di piccolo peri-follicolari); (ii) un pattern plasmacellulare (i.e. aggregati confluenti di plasmacellule inter-follicolari/sotto-capsulari); (iii) un pattern misto (ialino-vascolare e plasmacellulare).

La MCU presenta nella maggior parte dei casi pattern ialinovascolare. Nel 10-20% delle MCU si possono tuttavia avere pattern plasmacellulare o misto (*van Rhee F et al, 2020*). La MCM ha, invece, maggior variabilità istologica. La POEMS-MCM ha più spesso pattern plasmacellulare. La HHV8-MCM ha pattern tipicamente misto/plasmacellulare e si caratterizza per la presenza di plasmoblasti perifollicolari HHV8-positivi, ristretti per le IgM e montanti catene leggere lambda. La iMCM-NOS presenta pattern plasmacellulare o misto nel 60% dei casi. Le forme associate a sindrome TAFRO hanno, invece, pattern più frequentemente ialino-vascolare (per evitare sovrapposizioni di nomenclatura, nel caso di iMCM tale pattern viene definito "ipervascolare" (*Fajgenbaum DC et al, 2017*)).

Rilievi Tecnico-Laboratoristici

Per la valutazione istologica della MC valgono i principi esposti nel paragrafo introduttivo del presente documento (cfr paragrafo 4.2).

La diagnosi istologica di MCU si basa sull'identificazione dei tipici reperti morfologici e sull'esclusione di possibili diagnosi differenziali (Tabella 8.7). A tal fine, è consigliabile integrare la

valutazione morfologica con pannelli immunoistochimici adeguati alle specifiche problematiche diagnostiche. Marcatori immunoistochimici potenzialmente utili e variamente utilizzabili sono CD20, CD3, BCL2, BCL6, CD10, CD21, CD23, CD30, catene leggere kappa e lambda delle immunoglobuline.

La diagnosi di MCM richiede un approccio più ampio, finalizzato a identificare possibili fattori etiologici (e.g. infezione da HHV8) e ad escludere eventuali mimi istologici (*Fajgenbaum DC et al, 2017*).

Nel caso delle forme plasmacellulari/miste è in particolare raccomandabile la valutazione immunoistochimiche di antigeni di HHV8, la presenza di restrizioni delle catene leggere delle immunoglobuline o l'incremento di plasmacellule IgG4-positive (definito da un rapporto IgG4/IgG >40% con plasmacellule IgG4-positive >50/campo a forte ingrandimento). Tale approccio contribuisce a definire il sottotipo specifico di MCM e a identificare possibili quadri di diagnostica differenziale.

Valutazione immunofenotipica

Nel work-up diagnostico della MC il corso ad analisi immunofenotipiche mediante citometria a flusso non è consigliato, se non ove ciò possa contribuire a dirimere la diagnosi differenziale con linfomi non-Hodgkin a cellule B periferiche.

Valutazione Molecolare

Nel work-up diagnostico della MC il corso ad analisi citogenetico-molecolari e di clonalità del riarrangiamento dei geni delle IG non è consigliato, se non ove ciò possa contribuire a dirimere la diagnosi differenziale con linfomi non-Hodgkin a cellule B periferiche.

Tabella 8.6 Classificazione della Malattia di Castleman
Malattia di Castleman Unicentrica (MCU)
Malattia di Castleman Multicentrica (MCM)
MCM associata a HHV8
MCM associata a sindrome POEMS
MCM idiopatica (iMCM)
iMCM associata a sindrome TAFRO
iMCM non altrimenti specificata

Tabella 8.7. Diagnosi differenziali della MCU*
Malattie infettive
Adenopatia da HIV
Sifilide
Infezione da EBV
Pseudotumore infiammatorio
Neoplasie
Linfoma di Hodgkin
Linfomi non-Hodgkin
<i>Linfoma follicolare</i>
<i>Linfoma marginale</i>
<i>Linfoma mantellare</i>
<i>Linfoma linfoplasmocitico</i>
Sarcoma a cellule follicolari dendritiche
Plasmocitoma
Malattie autoimmuni/disimmuni
Lupus eritematoso sistemico
Artrite reumatoide
Sindrome di Felty
Sindrome linfoproliferativa autoimmune
MCM (HHV8-positiva e iMCM)

Note: *modificato da Van Rhee et al; Blood Adv 2020

Tabella 8.8.NHL: Laboratori di afferenza per gli Hub ematologici della REV						
	AROUP PADOVA	AOUR VERONA	ULSS2 TREVISO	ULSS3 MESTRE- VENEZIA	ULSS8 VICENZA	IOV CFV
Valutazione patologica	X	X	X	X	X	X
Citometria a flusso	X	X	X	X	x	Lab ULSS2
Analisi Citogenetica/ FISH	Lab IOV PD	X	X	Lab IOV PD Lab ULSS2	X	Lab ULSS2
Analisi Molecolare diagnosi	X	X	X	X	X	Lab ULSS2

X= presso il proprio laboratorio di competenza

9 Leucemia Linfatica Cronica

La leucemia linfatica cronica/linfoma a piccoli linfociti (LLC/small lymphocytic lymphoma, SLL) è un disordine linfoproliferativo a cellule B periferiche con presentazione e decorso clinico molto variabili. La LLC/SLL è la più comune leucemia dell'adulto, con un'incidenza di circa 5-15 casi/100.000 anno. Nella maggior parte dei casi, la malattia ha decorso indolente e protratto. A seconda delle caratteristiche biologiche, sono tuttavia possibili quadri clinici più severi e aspetti evolutivi a linfomi aggressivi quali evoluzioni prolinfocitiche (i.e. prolinfociti su sangue periferico >55%), trasformazioni a linfoma B diffuso a grandi cellule (DLBCL; i.e. trasformazione di Richter), a linfoma di Hodgkin classico o a più rare neoplasie ematologiche (e.g. linfoma plasmoblastico; transdifferenziazione a sarcoma istiocitico).

In questo complesso quadro clinico e biologico, la diagnosi, la stratificazione prognostica, il follow-up e il monitoraggio della risposta alle terapie richiedono l'integrazione di dati citologici/istologici, immunofenotipici e citogenetico-molecolari. Il ricorso a tali metodiche e i campioni biologici da analizzare variano a seconda della presentazione clinica e delle fasi della malattia.

9.1 Valutazione citologica/istologica del midollo osseo

Rilevi Clinico-Diagnostici

La LLC/SLL può presentarsi in forme primariamente leucemiche (LLC) o linfomatose (SLL). Nel caso delle forme leucemiche, la diagnosi si basa sulla documentazione di $\geq 5 \times 10^9/L$ linfociti circolanti su sangue periferico. Per quanto la valutazione citologica contribuisca all'identificazione di tali cellule (linfociti maturi di piccola taglia con cromatina *cobblestone*, occasionali prolinfociti e *smudge cells*), per la diagnosi di CLL sono sufficienti i dati emocromocitometrici e la tipizzazione citofluorimetrica dei linfociti circolanti.

Per la diagnosi delle forme linfomatose (SLL) è, invece, necessaria la valutazione istologica di campioni biotipici tissutali (linfonodi, midollo osseo o lesioni extra-nodali/extra-midollari sospette). Come nel caso di altri linfomi, si raccomanda l'esame di biopsie incisionali/escissionali, evitando (ove possibile) il ricorso ad agobiopsie. La diagnosi mediante agoaspirato è sconsigliata, specie nei casi in cui non siano disponibili dati citofluorimetrici a integrazione dei reperti citologici.

La valutazione istologica è inoltre raccomandata in tutti i casi di sospetta evoluzione a linfoma di alto grado o linfoma di Hodgkin. Essa è inoltre raccomandata nei casi di LLC/SLL in "fase accelerata" (o evolutiva iniziale). Tali casi, pur non soddisfacendo i criteri diagnostici di DLBCL, presentano indice proliferativo elevato, ampi centri di proliferazione (superiori a un campo a ingrandimento 20x) o >2 mitosi/centro di proliferazione (Ginè E et al, 2010). La diagnosi di LLC/SLL in fase

accelerata può essere problematica, specie in piccole biopsie. In tutti i casi possibili, si raccomanda quindi la valutazione istologica di biopsie incisionali o escissionali.

Rilievi Tecnico-Laboratoristici

Per la valutazione citologica/istologica dei campioni di LLC/SLL valgono i principi esposti nel paragrafo introduttivo del presente documento (*cf* paragrafo 4.1 e 4.2).

La diagnosi istologica di SLL si basa sull'integrazione di reperti morfologici e immunoistochimici. Morfologicamente, la LLC/SLL si caratterizza per una proliferazione vagamente nodulare di linfociti maturi di piccola taglia, nel cui contesto sono presenti rari mastociti e centri chiari di proliferazione (*i.e.* aggregati di elementi di media taglia con nucleolo centrale). Alle analisi immunoistochimiche, la diagnosi è supportata dalla positività marcatori pan-B (CD20, CD79a o analoghi), dall'espressione di CD5 e CD23 e dalla negatività per Ciclina D1 e/o SOX11. In presenza di fenotipi ambigui o aberranti (*e.g.* debole positività per CD5 o CD23), è possibile ricorrere a marcatori di secondo livello quali TCL1, LEF1 o CD200. La loro positività supporta la diagnosi differenziale con altri linfomi B di basso grado, quali (ad esempio) i linfomi della zona marginale.

Per la valutazione delle forme evolutive di malattia, valgono i principi diagnostici relativi ai linfomi B di alto grado e ai linfomi di Hodgkin. Nel caso di fasi accelerate o evoluzione a DLBCL, si raccomanda l'integrazione con i dati clinico-anamnestici per escludere quadri istologici pseudo-Richter da sospensione della terapia con Ibrutinib. Pannelli immunoistochimici consigliati per le forme evolutive di LLC/SLL comprendono CD20, CD3, CD5, CD23, CD10, Bcl6, MUM1, Bcl2, c-Myc, Ciclina D1 e Ki67 (trasformazione di Richter) e CD30, CD15, CD20, CD3, CD5, CD23, PAX5 ed EBER (evoluzione a linfoma di Hodgkin). Tali pannelli vanno integrati/adattati secondo le caratteristiche del campione biotico, la disponibilità tissutale e gli specifici reperti morfologici.

9.2 Valutazione immunofenotipica

Rilievi Clinico-Diagnostici

Nel sospetto di una malattia linfoproliferativa cronica leucemica, l'analisi immunofenotipica risulta fondamentale per la diagnosi differenziale tra leucemia linfatica cronica (LLC) e altre patologie linfoproliferative. Inoltre, in caso di LLC, la citometria a flusso può essere impiegata per la definizione della prognosi e nella valutazione della risposta alla terapia mediante lo studio della MRD.

Diagnosi

In caso di linfocitosi, dopo aver escluso una condizione reattiva, la citometria a flusso è fondamentale per (*van Dongen et al, 2012*):

- Determinare il lineage della malattia linfoproliferativa B, T o NK.
- Definire il sottotipo di malattia linfoproliferativa caratterizzando il fenotipo completo.

Definizione del lineage

L'espressione di specifici marcatori di linea permette la definizione del lineage:

Lineage	Antigeni
Linfoide B	CD19, CD20, CD79b
Linfoide T	CD3, TCR $\alpha\beta$ o TCR $\gamma\delta$
Linfoide NK	CD56, CD16 in cellule non T

Definizione del sottotipo

A seconda del lineage è possibile studiare altri antigeni per un miglior inquadramento diagnostico (vedi tabella 9.1)

Lineage	Antigeni
B	CD5, CD10, CD23, CD43, CD200, sIg (k/l), FMC7, CD11c, CD25, CD103, CD79b, CD22, CD305, CD81, CD123
T	CD2, CD5, CD7, CD8, TCR $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$, CD1a, CD26, CD30, CD45RA, CD45RO, CD52, TdT, CD16
NK	CD57, CD94/NKG2A, i recettori KIR (es. CD158a, CD158b, CD158e), NKG2D, NKp46, CD161

Malattie linfoproliferative B

La definizione del sottotipo è particolarmente importante in caso di malattia linfoproliferativa della linea B, dato che attraverso l'espressione di diversi antigeni si possono distinguere specifiche entità (vedi tabella 9.1; *van Dongen et al, 2012, Gaidano, V et al, 2020; Gajzer DC et al, 2025; Böttcher S et al, 2022; Eichhorst B et al, 2021; Wierda WG Et al, 2024*).

Tabella 9.1							
Antigene	LLC	MCL	MZL	FL	DLBCL	HCL	LPL
CD5	pos	pos	variabile	neg	variabile	neg	neg
CD10	neg	neg	neg	pos	variabile	neg	neg
CD19	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
CD20	pos debole eterogeneo	pos intensa	pos	pos	pos	pos intensa	variabile
CD23	pos	neg/ debole	neg	neg	neg	neg	neg/ debole
CD43	pos	pos	neg	neg	variabile	pos	variabile
CD200	pos	neg/ debole	variabile	variabile	variabile	variabile	variabile
slg κ/λ	debole e clonale	clonale	intensa e clonale	clonale	clonale	intensa e clonale	clonale
FMC7	neg/ debole	pos/neg	neg	variabile	variabile	pos	variabile
CD11c	pos debole	neg/ raro pos	variabile	neg	variabile	pos intensa	variabile
CD25	neg	neg	neg	neg	neg	pos	variabile
CD103	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg
CD79b	neg/ debole	pos	pos	pos	pos	pos	pos
CD22	pos debole	pos	pos	pos	pos	pos	pos
CD305	variabile	variabile	neg	neg	neg	pos intensa	neg
CD81	pos debole	pos	pos	pos	pos	pos	pos
CD123	neg	neg	neg	neg	neg	pos intensa	neg

LLC: Leucemia Linfatica Cronica; MCL: Linfoma delle Cellule Mantellari; MZL: Linfoma della Zona Marginale; FL: Linfoma Follicolare; DLBCL: Linfoma Diffuso a Grandi Cellule B; HCL: Leucemia a Cellule Capellute; LPL: Linfoma Linfoplasmocitoide

Malattie linfoproliferative T

L'algoritmo diagnostico standard per le malattie linfoproliferative croniche leucemiche T si basa su un approccio integrato che include la valutazione clinica, la morfologia, l'analisi immunofenotica, la citogenetica e gli studi molecolari (*Jevremovic D et al, 2019*).

In questo contesto, la citometria a flusso rivela spesso pattern anomali di espressione dei marcatori di superficie; ad esempio:

- nella leucemia a grandi linfociti granulari T (T-LGL), le cellule maligne tipicamente esprimono CD3, TCR $\alpha\beta$, CD8, CD16, CD45RA e CD57, con un'espressione ridotta di CD5 (CD5dim) e assenza di CD4. È frequente anche la perdita di espressione di CD5 o CD7, il che contribuisce alla specificità diagnostica;
- nella leucemia prolinfocitica T (T-PLL), le cellule leucemiche sono solitamente positive per CD2, CD5, CD7, CD52 e presentano un'espressione debole di CD3. Sono negative per TdT, CD1a, CD16, CD30 e CD20. Il pattern di espressione di CD4 e CD8 è variabile, con la maggior parte dei casi che mostrano un fenotipo CD4+/CD8-, seguito da CD4+/CD8+ e CD4-/CD8-;
- nella leucemia/linfoma a cellule T dell'adulto (ATLL), le cellule maligne esprimono CD2, CD4, CD5, CD25, CD45RO, CD29 e TCR $\alpha\beta$. Tipicamente, sono negative o presentano un'espressione ridotta di CD7, CD8, CD26 e CD3. La coespressione di CD4 e CD25, insieme alla perdita di CD7, è altamente suggestiva di ATLL, specialmente in individui positivi all'HTLV-1.

Malattie linfoproliferative NK

Nelle malattie linfoproliferative croniche leucemiche di origine NK, la citometria a flusso rivela pattern distintivi di espressione dei marcatori. In particolare, nei disordini linfoproliferativi cronici a cellule NK (CLPD-NK), che comprendono uno spettro di condizioni reattive e monoclonali, la citometria a flusso aiuta a valutare la clonalità attraverso l'analisi dell'espressione ristretta dei KIR e il profilo CD94hi/HLADR+ (*Jevremovic D et al, 2019*).

Definizione prognostica

Nella leucemia linfatica cronica CD38 e CD49d vengono studiati per il loro significato prognostico: la loro espressione è associata ad una prognosi sfavorevole. In particolare, CD49d è considerato il principale marcatore prognostico immunofenotipico riguardo la sopravvivenza nella LLC (*Hallek M et al, 2018*).

Valutazione della risposta alla terapia: quantificazione della MRD mediante Next generation Flow (NGF)

Attualmente, la U-MRD (MRD non identificabile) viene definita come l'assenza di linfociti B di LLC in 10.000 o 100.000 cellule di sangue (rispettivamente, sensibilità pari a 10^{-4} e 10^{-5}), nei pazienti che raggiungono la remissione completa (CR) o una risposta parziale (PR) dopo la terapia. La definizione di U-MRD dipende dai valori di Limit of Detection (LOD) e lower limit of quantification (LLOQ), che variano in base al numero di cellule nucleate acquisite dal campione e che devono essere specificate in ogni test eseguito.

Nella LLC, l'MRD si è dimostrata un fattore indipendente di progression-free survival (PFS) e di overall survival (OS) ed è ormai un associato indicatore surrogato dell'efficacia del trattamento nei trials clinici che la impiegano per scelte terapeutiche MDR-driven.

La definizione della migliore combinazione anticorpale per la determinazione della MRD nella LLC è ancora in fase di definizione, anche se vi è ormai un consensus legato ad un pannello "core flow" che comprenda gli antigeni CD19, CD20, CD5, CD43, CD79b, CD81 e ROR1, al fine di distinguere, e quantificare, le cellule B di LLC residue dai linfociti B normali. La determinazione della MRD viene sempre accompagnata dalla definizione del Limit of Detection (LOD) e dal lower limit of quantification (LLOQ), che variano sulla base del numero di cellule nucleate acquisite dal campione.

La valutazione dell'MRD della LLC mediante NGF è un test applicabile alla quasi totalità dei casi e non necessita di un campione baseline, anche se un'analisi pre-terapia viene raccomandata.

Le indicazioni attuali prevedono di eseguire la valutazione della MRD almeno 2 mesi dopo il completamento dell'ultimo trattamento per i pazienti che effettuano terapie a durata prestabilita, e, nei pazienti sottoposti a trattamenti continui, quando viene raggiunta la migliore risposta clinica (*Munir T et al, 2024; Rawstron AC et al, 2016; Wierda WG et al, 2021*).

Rilievi Tecnico-Laboratoristici

Si prega di fare riferimento a quanto riportato nel paragrafo 4.4 e nelle seguenti fonti bibliografiche: *Gaidano, V. et al. 2020, Gajzer, D.C. et al. 2025, Böttcher S. et al. 2022, Rawstron AC et al. 2016*.

9.3 Valutazione Genetica

Rilievi Clinico-Diagnostici

Le alterazioni genetiche acquisite dalle cellule leucemiche nella leucemia linfatica cronica (LLC) si sono affermate come determinanti prognostici di primaria importanza in grado di stratificare i pazienti in gruppi di rischio con comportamento clinico significativamente diverso, influenzando le decisioni terapeutiche e il monitoraggio della malattia. Nella LLC, la valutazione prognostica si basa su una combinazione di metodiche di citogenetica molecolare (FISH) e di biologia molecolare, queste ultime finalizzate a individuare mutazioni somatiche (SHM) nella regione variabile dei geni della catena pesante delle immunoglobuline (IGHV) e nel gene *TP53*. Più recentemente anche l'analisi del cariotipo ha contribuito alla caratterizzazione della malattia.

Fluorescence in situ hybridization (FISH)

Il lavoro pionieristico pubblicato nel 2000 da Döhner ha introdotto l'applicazione della Fluorescence in situ hybridization (FISH) su nuclei interfase come strumento efficace per identificare anomalie cromosomiche ricorrenti nella LLC associate a differenti decorsi clinici. In ordine di frequenza le alterazioni: delezione di 13q (55%), delezione di 11q (18%), trisomia del cromosoma 12 (16%) e delezione di 17p (7%) rappresentano i marcatori genetici che devono essere valutati mediante FISH alla diagnosi o prima dell'inizio della terapia. In più dell'80% dei casi di LLC alla diagnosi la FISH per questi 4 marcatori risulta alterata e in associazione ad altre variabili biologiche e cliniche influenza il decorso della malattia e le scelte terapeutiche; allo stesso modo anche l'assenza di alterazioni, riferita come FISH normale, è di rilevanza prognostica (*Hallek W et al, 2018; Nadeu F et al, 2020*).

La tabella 9.1 descrive i marcatori genetici di significato prognostico valutati mediante FISH e le associazioni cliniche.

Tabella 9.2 Marcatori genetici indagati mediante FISH e loro significato clinico		
Marcatore	Descrizione	Correlazione clinica
Delezione 13q del(13q) (singola alterazione)	Il locus coinvolto è 13q14 e comporta la delezione dei microRNA: miR 15° e miR 16-1 e deregolazione di <i>BCL2</i> ;	Prognosi favorevole: OS mediana più lunga nei pazienti trattati con CIT
Delezione 11q del(11q)	La delezione comprende il locus 11q22.3 e determina la perdita di <i>ATM</i>	Prognosi sfavorevole migliorata da CIT, inibitori BTK e venetoclax (TTFT ridotto e OS mediana più breve con CIT)

Tabella 9.2 Marcatori genetici indagati mediante FISH e loro significato clinico		
Trisomia 12 (+12)	+12 o parziale trisomia di 12q	Prognosi intermedia per TTFT nei pazienti con nuova diagnosi di LLC; OS intermedia nei pazienti trattati con CIT
Delezione 17p del(17p)	Locus 17p13.1 comporta la delezione comprende il gene <i>TP53</i>	Risposta inferiore, intervallo libero da trattamento più breve e sopravvivenza globale (OS) ridotta con la CIT. Buona risposta iniziale ma minore PFS e OS con regimi a durata limitata basati su venetoclax e inibitori di BTK.
FISH Normale	Assenza di alterazione per i 4 marcatori testati	Prognosi intermedia per TTFT in pazienti con LLC di nuova diagnosi; OS intermedia in pazienti trattati con CIT

OS: overall survival, sopravvivenza globale; CIT: chemioimmunoterapia; TTFT: time-to-first-treatment, tempo al primo trattamento; PFS: Progression Free Survival, sopravvivenza libera da progressione.

Analisi del cariotipo

Nella leucemia linfatica cronica (LLC) l'analisi citogenetica ha permesso di valutare alterazioni cromosomiche aggiuntive rispetto alla FISH, quali traslocazioni, alterazioni non bilanciate e anomalie numeriche, rivelando una maggiore complessità genetica della malattia. La messa a punto di protocolli di coltura che utilizzano mitogeni in grado di stimolare specificamente le cellule B — in particolare l'oligonucleotide CpG DSP30 in associazione con l'interleuchina 2 (IL-2) — ha consentito di ottenere metafasi in oltre il 90% dei casi di LLC e di rilevare alterazioni cromosomiche clonali in più dell'80% dei pazienti. Da subito l'analisi del cariotipo si è dimostrata complementare all'analisi FISH in quanto capace di rilevare nuove alterazioni rispetto ai 4 marcatori FISH (del11q, del13q, +12, del17p) che costituiscono il pannello standard; in particolare sono state riportate traslocazioni bilanciate e non bilanciate che spesso coinvolgono il gene che codifica per la catena pesante delle immunoglobuline (*IGH*) in 14q32, ma anche le catene leggere *IGK* e *IGL*, in 2p11 e 22q11 rispettivamente, delezioni di ampie regioni cromosomiche soprattutto nel braccio lungo del cromosoma 6 (6q) e del cromosoma 14 (14q), trisomie multiple che interessano oltre al 12 i cromosomi 18 e 19. A livello clinico il maggior contributo dell'analisi del cariotipo è correlato alla definizione di cariotipo complesso (cariotipo con ≥ 3 alterazioni cromosomiche) e di cariotipo complesso ad alto rischio (cariotipo con ≥ 5 alterazioni cromosomiche) denominato high-CK. Infatti, high-CK rappresenta un fattore prognostico indipendente dallo stadio clinico, dallo stato mutazionale di *IGHV* e dallo stato di *TP53* (mutazioni e delezione) e si associa ad una prognosi sfavorevole con una sopravvivenza mediana di 3,1 anni, mentre il comportamento clinico dei casi che mostrano un cariotipo complesso con 3 o 4 alterazioni è influenzato dalla concomitante presenza alterazione di *TP53* (mediana di sopravvivenza inferiore di 4,3 anni) (Baliakas P et al, 2022). Più recentemente è stato dimostrato che la traslocazione t(14;19)(q32;q13), che comporta il riarrangiamento e l'overespressione del gene *BCL3*, identifica un sottogruppo di pazienti con LLC

caratterizzato da una malattia più aggressiva, con un tempo più breve al primo trattamento ed una sopravvivenza complessiva ridotta (Roncaglia E et al, 2025).

Rilievi Tecnico-Laboratoristici

Tabella 9.3 Raccomandazioni per l'analisi citogenetica e FISH nella leucemia linfatica cronica		
Caratteristiche	Raccomandazioni	Note
Materiale per analisi FISH e analisi citogenetica standard	Sangue periferico eparinato preferibile, accettato anche aspirato midollare eparinato	Si rimanda alle raccomandazioni generali per modalità di invio e tempistiche di accettazione Tabella 4.2
Delezione 17p	Sonda genica che mappa <i>TP53</i>	Si rimanda alle raccomandazioni generali Analisi FISH Tabella 4.3
Coltura per analisi citogenetica	Mitogeno per stimolazione linfociti B	Tempi di coltura e colcemide possono variare a seconda del tipo di mitogeno utilizzato

9.4 Analisi molecolare

Rilievi Clinico-Diagnostici

Ipermutazioni Somatiche nei geni della catena pesante delle immunoglobuline (IGHV)

Numerosi studi a partire dagli anni '90 hanno evidenziato il ruolo centrale del recettore delle immunoglobuline e la stimolazione antigenica nella storia naturale della leucemia linfatica cronica con una notevole rilevanza del ruolo della selezione antigenica nello sviluppo della malattia. Nella LLC il clone neoplastico perfeziona la sua risposta attraverso un riarrangiamento clonotipico che successivamente può andare incontro a mutazioni ipersomatiche in grado di rendere altamente specifica la risposta. La presenza di mutazioni somatiche (SHM) all'interno della regione variabile dei geni della catena pesante delle immunoglobuline (IGHV) permette la suddivisione dei pazienti con LLC in due categorie: la prima include i pazienti con omologia rispetto alla linea germinale uguale o superiore al 98% (non mutati, U-CLL), mentre la seconda include pazienti con omologia inferiore al 98% (mutati, M-CLL). Questa distinzione a livello della sequenza immunoglobulinica non sottende solo una differenza tra i due gruppi da un punto di vista clinico ma anche in termini di caratteristiche biologiche. In particolare, il gruppo U-CLL è associato sia ad una prognosi clinica sfavorevole che ad ulteriori alterazioni genetiche con prognosi avversa, un aumento del segnale

BCR mediato, una maggiore velocità di progressione della malattia e globalmente, un *outcome* peggiore rispetto al gruppo M-CLL prima dell'avvento delle terapie mirate (Nadeu F et al, 2020).

Un ulteriore passo in avanti nella valutazione della LLC è stato fatto con la dimostrazione mediante sequenziamento che circa il 30% dei pazienti presentano particolari subset di riarrangiamento VDJ chiamati stereotipi e che i pazienti aventi lo stesso subset stereotipico hanno caratteristiche biologiche simili in termini di capacità di segnale e profili di aberrazioni genetiche oltre ad un decorso clinico che può differire significativamente da pazienti che appartengono alla stessa categoria di SHM (U-CLL o M-CLL) ma non presentano subset stereotipici (Tabella 9.3) (Agathangelidis A et al, 2022).

Tabella 9.3 Significato prognostico delle ipermutazioni somatiche e dei subset di stereotipia più frequenti nella LLC.			
Stato mutazionale	Definizione	Prognosi	Note
IGHV omologia $\geq 98\%$	Stato non mutato (U-CLL)	Prognosi sfavorevole con rapida progressione della malattia	Predittivo di peggiore risposta ai farmaci chemioterapici
IGHV omologia $< 98\%$	Stato mutato (M-CLL)	Prognosi favorevole con decorso della malattia indolente	
IGHV: $97\% \leq \text{omologia} \leq 99\%$	Stato mutato borderline	Stato mutato	Da valutare il significato in base a dati clinici e molecolari (Agathangelidis A, 2022)
Subset #2 (IGHV3-21)	CLL#2	Estremamente aggressiva con prognosi negativa indipendente dallo stato mutazione delle SHM; mediana TTFT 1,9 anni	Associazione con mutazioni di <i>SF3B1</i> , del11q e raramente mutazioni di <i>TP53</i>
Subset #1 (IGHV1, -5, -7)	CLL#1	Malattia aggressiva; mediana TTFT 1,6 anni	Associazione con mutazioni di <i>NOTCH1</i> , <i>NFK1BIE</i> , <i>TP53</i>
Subset #8 (IGHV4-39)	CLL#8	Malattia aggressiva; mediana TTFT 1,5 anni	Associata ad una maggior frequenza di sviluppare la Sindrome di Richter; associazione con mutazioni <i>NOTCH1</i> , trisomia 12 e raramente mutazioni di <i>TP53</i>
Subset #4 (IGHV4-34)	CLL#4	Forma indolente e che raramente necessita di trattamento farmacologico; mediana TTFT 11 anni	

TTFT: time to first treatment, tempo al primo trattamento

Alterazioni di *TP53*

L'analisi di *TP53* che comprende sia la valutazione delle mutazioni, sia quella delle delezioni del gene è di fondamentale importanza nell'algoritmo decisionale terapeutico della LLC, considerato il ruolo prognostico e predittivo delle alterazioni di *TP53*. Alla diagnosi la frequenza di alterazione è bassa, circa 5-10%, con un lieve incremento nei pazienti candidati ad una terapia di prima linea (fino al 10-20%). Tale incidenza aumenta significativamente negli stadi più avanzati di malattia, superando il 50% nei casi che evolvono verso una sindrome di Richter. L'alterazione di *TP53* è considerata un fattore prognostico indipendente correlato ad un tempo più breve al primo trattamento negli attuali score prognostici, in particolare nei casi non mutati IGHV. Anche nei pazienti già trattati si associa a prognosi sfavorevole a prescindere dal regime terapeutico utilizzato. Le alterazioni di *TP53* hanno un ruolo predittivo in quanto associate a resistenza alla chemioimmunoterapia, rendendo le nuove molecole target l'opzione terapeutica di prima linea in questi pazienti.

Più recentemente, grazie all'introduzione nella pratica clinica delle tecniche di sequenziamento di nuova generazione (NGS) in grado di superare i limiti di sensibilità del metodo Sanger, l'attenzione della comunità scientifica si è concentrata sulla comprensione del significato clinico delle mutazioni di *TP53* con frequenza allelica (VAF, variant allele frequency), inferiore del 10%, comunemente definite "low-burden". Questo avanzamento ha portato, nel 2024, a un aggiornamento delle raccomandazioni per l'analisi delle mutazioni di *TP53* da parte del consorzio europeo ERIC che entra nel merito delle procedure di analisi, dell'interpretazione dei risultati ed anche dei contenuti del referto. Dal punto di vista del metodo il sequenziamento NGS è preferibile al sequenziamento Sanger, anche se quest'ultimo può essere utilizzato qualora non fosse disponibile l'NGS. Con lo scopo di implementare la diffusione dell'NGS, gli autori descrivono nel dettaglio il processo che porta a validare un nuovo test mediante questo metodo.

Particolare attenzione viene rivolta alla qualità del campione prelevato, che deve essere altamente rappresentativo della malattia. A tal fine, viene suggerita la possibilità di procedere con l'arricchimento o la separazione dei linfociti CD19+, al fine di evitare una possibile sottostima della presenza di un clone low-burden. In assenza di informazioni sul contenuto di cellule neoplastiche nel campione, e qualora non sia possibile isolarne selettivamente la componente tumorale, il clinico deve interpretare i risultati alla luce della quota leucemica presente nel prelievo.

Riguardo l'interpretazione delle varianti, Malcikova et al, propongono un algoritmo per la classificazione delle varianti e la definizione del loro grado di patogenicità/oncogenicità, fornendo una guida per risolvere quelle meno comuni e di significato incerto. Si rimanda alla tabella 9.5 per il dettaglio delle raccomandazioni da parte di ERIC per l'analisi di *TP53* (Malcikova J et al, 2024).

Rilievi Tecnico-Laboratoristici

Tabella 9.4 Raccomandazioni ERIC per l'analisi immunogenetica nella LLC		
	Indicazioni	Note
Materiale	Sangue Periferico	Aspirato midollare, linfonodi a fresco o incluso in paraffina
Metodo	Amplificazione con Leader primers (raccomandati) e sequenziamento Sanger	NGS per l'analisi immunogenetica non ancora validata
Gene IGH e alleli	Geni e alleli IGHV, IGHV, IGHJ	
Caratterizzazione immunogenetica	Status SHM solo per i riarrangiamenti produttivi	Se il riarrangiamento non è produttivo riferirne le cause
Identità della sequenza di IGHV rispetto al germinale	Classificazione di U-CLL; M-CLL; borderline CLL	Espressa in % con 2 decimali
Identificazione dei subset/ Stereotipia BcR IG	Per i subset di significato prognostico ben consolidato	#2 e #8
Casi di difficile/dubbia interpretazione	vd Aggiornamento consorzio ERIC 2022	<i>Agathangelidis A et al. Leukemia 2022</i>

Adattata da Agathangelidis A et al. 2022

Tabella 9.5 Raccomandazioni ERIC per l'analisi mutazionale di TP53		
	Materiale	Note
Tipo di materiale	Sangue Periferico	Aspirato midollare, linfonodi in alternativa se la conta linfocitaria del sangue periferico è bassa. Preferire tessuto fresco o congelato
Arricchimento cellule tumorali	Di scelta separazione CD19+	PBMC possono essere sufficienti nella maggior parte dei casi; La separazione dei linfociti CD19+ è necessaria quando la percentuale di cellule leucemiche è bassa ($ACA \leq 10 \times 10^9/l$)
Acido nucleico	DNA	RNA non permette di vedere le varianti troncati
Regione da analizzare	Regione codificante: Esoni 2-11; al minimo esoni 4-10; includere i siti di splicing (± 2 bp introne)	
	Metodo	
Sequenziamento Sanger	Sequenziare entrambi i filamenti con primers adeguati	La sequenza dei primers è disponibile nel sito web di ERIC

Tabella 9.5 Raccomandazioni ERIC per l'analisi mutazionale di TP53		
NGS: Preparazione delle librerie	Metodo ad ampliconi o a cattura. La quantità di DNA adeguata al raggiungimento dei limiti di rilevabilità del test	Sono disponibili kit commerciali
NGS: Limite di rilevabilità	Deve permettere di identificare varianti $\leq 5\%$ VAF;	Il limite di rilevabilità deve consentire la chiamata di più del 99% delle varianti
NGS: Profondità di sequenziamento	Deve garantire la copertura di tutte le basi della sequenza codificante con un numero sufficiente di reads	Bisogna garantire che il coverage minimo sia soddisfatto in $\geq 99\%$
NGS: Analisi dei dati	Pipeline deve essere in grado di distinguere le varianti dal background	Disponibili pipeline commerciali o sviluppate in house
NGS: Validazione	E' sempre necessario validare/verificare il metodo prima di introdurlo nella pratica clinica	Monitoraggio continuo dei parametri

Adattata da Malcikova J et al 2024

Tabella 9.6 LLC: Laboratori di afferenza per gli Hub ematologici della REV						
	AOUP PADOVA	AOUI VERONA	ULSS2 TREVISO	ULSS3 MESTRE- VENEZIA	ULSS8 VICENZA	IOV CFV
Valutazione patologica	X	X	X	X	X	X
Citometria a flusso	X	X	X	X	X	Lab ULSS2
Citometria a flusso, MRD	X			X		
SHM e stereotipia)	X	LAB ULSS8	Lab AOUP	X	X	Lab AOUP
FISH	Lab IOV PD	X	X	Lab IOV PD	X (SNP array)	Lab ULSS2
TP53 Mutazione NGS/Sanger	Lab IOV PD	LAB ULSS8	X	Lab IOV PD	X	Lab ULSS2
Cariotipo stimolato	Lab IOV PD	X	X	Lab IOV PD		Lab ULSS2

X=presso il proprio laboratorio di competenza

10 Mieloma Multiplo e discrasie plasmacellulari

Le neoplasie plasmacellulari costituiscono un ampio spettro di patologie di derivazione da linfociti B periferici andati incontro a differenziazione terminale dopo aver attraversato il centro germinativo. La maggior parte di queste patologie si presenta con cloni plasmacellulari nel midollo osseo. Più raramente (e.g. plasmocitomi ossei ed extra-ossei), si hanno invece presentazioni puramente extra-midollari. La valutazione del midollo osseo costituisce quindi un requisito fondamentale per la diagnosi, la stadiazione e la stratificazione clinico-prognostica delle neoplasie plasmacellulari.

Le attuali classificazioni WHO e ICC 2022 distinguono un'ampia varietà di neoplasie plasmacellulari. I criteri diagnostici di tali patologie richiedono l'integrazione di dati clinico-laboratoristici, cito-istologici e radiologici (Alaggio R et al, 2022; Campo E et al, 2022). Ai fini di un adeguato inquadramento diagnostico, della stratificazione prognostica e del monitoraggio dopo terapia, anche la valutazione immunofenotipica e le analisi citogenetiche rivestono un ruolo fondamentale e sono raccomandate in tutti i casi.

10.1 Valutazione citologica/istologica del midollo osseo

Rilievi Clinico-Diagnostici

L'esame istologico del midollo osseo è raccomandato nei casi di sospetto mieloma multiplo o di gammopatie monoclonali ad elevato rischio evolutivo. La citologia midollare costituisce un valido supporto all'analisi istologica, pur non potendo sostituirsi a quest'ultima. Grazie all'applicazione di metodiche immunoistochimiche, la valutazione istologica permette infatti una più preciso riconoscimento e una miglior quantificazione dei cloni plasmacellulari atipici. Ciò vale in particolare per infiltrati plasmacellulari focali o zonali o qualora l'aspirato midollare sia sub-ottimale per artefatti da emodiluizione o *punctio sicca*.

Nel sospetto di discrasie plasmacellulari, la valutazione istologica del midollo osseo deve specificamente considerare: (i) la presenza di infiltrati plasmacellulari o linfoidi atipici; (ii) le caratteristiche citologiche della popolazione plasmacellulare (i.e. dimensioni, caratteristiche nucleari, inclusioni nucleo-citoplasmatiche; presenza di eventuali componenti immature, plasmoblastiche o anaplastiche); (iii) l'entità dell'infiltrato plasmacellulare neoplastico. In proposito, è bene sottolineare come la presenza di $\geq 10\%$ di plasmacellule neoplastiche nel midollo osseo costituisca criterio sufficiente per porre diagnosi di mieloma multiplo (*smouldering* o conclamato, a seconda dei dati clinico-laboratoristici e radiologici). Nell'ambito dei mielomi multipli clinicamente indolenti, è inoltre importante distinguere casi con infiltrato midollare $< 60\%$, data la prognosi nettamente più severa dei secondi e le diverse opzioni terapeutiche che per questi si raccomandano.

Rilievi Tecnico-Laboratoristici

Per la valutazione citologica e istologica del midollo osseo in corso di discrasie plasmacellulari valgono i criteri generali specificati nella sezione introduttiva di questo documento (paragrafi 4.1-4.2). Alle colorazioni istologiche standard (ematossilina/eosina, Giemsa e impregnazione argentea) possono associarsi colorazioni speciali per la valutazione di eventuali depositi di sostanza amiloide (colorazione con Rosso Congo o tioflavina). Tali colorazioni sono raccomandate in tutti i casi in cui vi sia il sospetto clinico di amiloidosi o in cui la valutazione morfologica identifichi depositi di materiale proteinaceo sospetto.

La valutazione morfologica deve essere integrata con analisi immunoistochimiche volte a documentare la presenza e il fenotipo di eventuali cloni plasmacellulari atipici. Per l'identificazione delle plasmacellule si può ricorrere ad anticorpi primari anti-CD138, anti-CD38 o anti-MUM1. Per la definizione di eventuali clonalità delle popolazioni plasmacellulari, si raccomandano analisi immunoistochimiche per le catene leggere kappa e lambda delle immunoglobuline. Ove opportuno, si consiglia inoltre la ricerca di marcatori aberrantemente espressi nelle plasmacellule neoplastiche, quali CD56 (positività intensa/diffusa), Ciclina D1 (positività nucleare diffusa), CD117, CD20 e/o CD23.

10.2 Valutazione immunofenotipica

Rilievi Clinico-Diagnostici

I test utilizzabili in citometria a flusso in fase di diagnosi, prognosi, nel follow-up e nella valutazione della risposta alla terapia del paziente con mieloma multiplo (MM) comprendono:

Caratterizzazione immunofenotipica delle plasmacellule mielomatose midollari

La caratterizzazione delle plasmacellule midollari viene eseguita alla diagnosi e consiste nella ricerca dei marcatori CD19, CD45, CD56, CD38, CD117 e CD138, oltre che nella determinazione delle catene leggere delle immunoglobuline (Ig), kappa e lambda, espresse nel citoplasma plasmacellulare (*Dimopoulos MA et al, 2021*).

CD38, CD138 e CD45 (insieme alle caratteristiche di light scatter evidenziate al citofluorimetro) sono i principali marcatori impiegati per la discriminazione delle plasmacellule.

Le plasmacellule maligne sono distinguibili da quelle normali perché generalmente prive dei marcatori CD19 e CD45 (o espressi in maniera ridotta) e con un'espressione elevata del marcatore CD56. Possono inoltre esprimere il marcatore CD117, finora mai evidenziato nelle plasmacellule normali.

La determinazione delle catene leggere kappa e lambda, espresse a livello del citoplasma plasmacellulare, permette di evidenziare le plasmacellule monoclonali: la popolazione plasmacellulare maligna risulterà omogeneamente positiva per una sola delle catene leggere delle Ig (plasmacellule monoclonali ristrette per la catena kappa o per la catena lambda), mentre le plasmacellule normali, policlonali, saranno costituite da cellule positive per la catena leggera kappa e da altre cellule positive per la catena leggera lambda.

N.B.: a causa dell'emo diluizione dell'aspirato midollare e per la distribuzione irregolare delle plasmacellule mielomatose nel midollo (patchy disease distribution), il tipo di analisi sopra descritta non deve essere utilizzata a fini quantitativi. Essa tende infatti a sottostimare l'entità di infiltrazione midollare rispetto a quanto si osserva, per esempio, all'analisi citologica della biopsia ossea.

Quantificazione della MRD mediante Next generation Flow (NGF) nel midollo osseo

La MRD negatività o, meglio, l'undetectable-MRD (U-MRD) viene definita come l'assenza di plasmacellule tumorali in 100.000 o 1.000.000 di cellule midollari (sensibilità rispettivamente pari a 10^{-5} e 10^{-6}), nei pazienti che raggiungono la remissione completa (CR) o una risposta parziale molto buona (VGPR) dopo la terapia. La U-MRD viene sempre definita per ogni test sulla base del Limit of Detection (LOD) e del lower limit of quantification (LLOQ), che variano in base al numero di cellule nucleate acquisite dal campione.

Nel 2016 l'IMWG ha modificato i criteri di risposta del mieloma multiplo inserendovi anche la valutazione dell'MRD (*Kumar S et al, 2016*), sempre più utilizzata come end point primario o secondario nei trials clinici sperimentali. Ad oggi è ormai consolidata la sua valenza prognostica e il suo ruolo predittivo è mantenuto a prescindere dallo scenario clinico (pazienti di nuova diagnosi, candidabili o meno al trapianto o pazienti recidivi/refrattari), dal rischio citogenetico o dallo schema di trattamento utilizzato. In particolare, è stato evidenziato come la persistenza di una MRD negativa confermata in due prelievi successivi ad adeguata distanza di tempo, da 6 mesi ad un anno (MRD sostenuta), sia significativamente associata ad un miglior outcome (*Avet-Loiseau H et al, 2021*).

La valutazione dell'MRD del MM mediante NGF è un test applicabile alla quasi totalità dei casi e non necessita di un campione baseline: infatti, il test può essere svolto anche se le plasmacellule midollari del paziente non sono state caratterizzate prima della terapia (diversamente dalla MRD quantificata in Next Generation Sequencing).

Secondo il protocollo EuroFlow, per raggiungere una sensibilità pari almeno a 10^{-5} , si devono impiegare circa 10 milioni di cellule midollari che vengono analizzate per la ricerca delle plasmacellule tumorali attraverso i seguenti marcatori: CD19, CD27, CD38, CD45, CD56, CD81, CD117 e l'espressione delle catene leggere kappa e lambda delle Ig, secondo protocolli che

definiscono le modalità del test dal prelievo del campione di midollo osseo al pannello anticorpale di marcatura e alle modalità di analisi dei risultati.

La ricerca dei sette marcatori soprariportati migliora la capacità di discriminare le plasmacellule tumorali residue dalle plasmacellule normali: le prime sono generalmente caratterizzate da una minore espressione dei marcatori CD19, CD27, CD38, CD45 e CD81, da una maggiore espressione dei marcatori CD56 e CD138 e dall'eventuale espressione del CD117, rispetto alle plasmacellule sane.

Anche in questo test, la determinazione delle catene leggere kappa e lambda delle Ig, espresse a livello citoplasmatico, permette di distinguere le plasmacellule monoclonali da quelle policlonali.

Caratterizzazione e quantificazione delle plasmacellule tumorali circolanti

Le plasmacellule tumorali circolanti (Circulating Tumor Plasma Cells, CTC) vengono considerate un indicatore di malattia attiva, in fase di diffusione. Le numerose pubblicazioni scientifiche, sviluppate nel corso degli ultimi 20 anni, hanno evidenziato il loro elevato impatto prognostico:

- i. la presenza di CTC nei pazienti con MGUS e SMM di nuova diagnosi è associata ad un aumento del rischio di progressione a MM;
- ii. nei pazienti con MM, la presenza di CTC è associata ad una riduzione della PFS e dell'OS, sia quando evidenziate alla diagnosi che prima dell'autotrapianto e alla ricaduta;
- iii. l'inserimento del parametro CTC all'interno del R-ISS ne migliora le capacità di stadiazione;
- iv. la presenza di CTC dopo terapia può essere considerata un surrogato di MRD positività: i pazienti con MM che dopo trattamento presentano CTC, presentano sempre una MRD+ nel corrispondente prelievo midollare.

Sulla base delle principali pubblicazioni di riferimento, la ricerca delle CTC può essere effettuata:

- i. mediante NGF, seguendo le stesse indicazioni valide per la quantificazione della MRD che permette di raggiungere una sensibilità pari a 10^{-6} ;
- ii. mediante citometria a flusso tradizionale, che consente di raggiungere una sensibilità pari a 10^{-4} .

Sulla base di quest'ultima modalità di determinazione, vengono proposti principalmente due cut-off, $\geq 0.01\%$ (Garcés JJ et al, 2022) e $> 0.07\%$ (Bertamini L et al, 2022), per definire i cosiddetti pazienti "CTC-high" e "CTC-low".

Anche se presenta ancora delle criticità, questo test permette una valutazione del rischio dinamico, nelle diverse fasi della malattia e può integrarsi ad altre analisi, comprese quelle di imaging, per una valutazione non invasiva dell'MRD.

10.3 Valutazione Genetica

Nonostante il mieloma multiplo sia tuttora considerato una singola entità nosologica, esso rappresenta in realtà un gruppo eterogeneo di neoplasie plasmacellulari distinte a livello citogenetico. Circa il 40% dei casi è caratterizzato dalla presenza di trisomie, definendo il sottotipo di mieloma iperdiploide. La maggior parte dei restanti mielomi presenta invece traslocazioni che interessano il locus genico della catena pesante delle immunoglobuline (IGH), definendo i vari sottotipi di mieloma con traslocazione di *IGH* in base allo specifico riarrangiamento genetico. Una minoranza di mielomi presenta una coesistenza di trisomie e traslocazioni di *IGH*. Entrambe queste alterazioni, trisomie e traslocazioni di *IGH*, sono considerate eventi primari, insorgendo precocemente durante lo sviluppo della gammopatia monoclonale. Successivamente, nel corso della progressione della malattia, il clone neoplastico acquisisce alterazioni secondarie, quali la delezione del braccio corto del cromosoma 17 (17p), l'acquisizione di materiale genetico sul braccio lungo del cromosoma 1 (1q21), la delezione della regione 1p32 e ulteriori traslocazioni di *IGH* che coinvolgono il gene *MYC*. Sia le alterazioni primarie che quelle secondarie esercitano un impatto significativo sull'evoluzione della malattia, sulla risposta al trattamento e sulla prognosi del paziente (Rajkumar SV, 2024).

Rilievi Clinico-Diagnostici

Alla diagnosi lo studio midollare dovrebbe comprendere la valutazione delle alterazioni cromosomiche mediante analisi FISH sulla componente plasmacellulare, sia per caratterizzare la malattia sia per ricavare delle informazioni prognostiche. L'analisi citogenetica standard, invece, non è raccomandata a meno che non si sospetti un quadro mielodisplastico.

L'International Myeloma Working Group (IMWG) ha indicato la FISH interfase su plasmacellule purificate come gold standard per la valutazione delle alterazioni citogenetiche nel mieloma e nel 2018 ha definito un pannello di marcatori minimo per la routine diagnostica, che comprende la traslocazione t(4;14) e la delezione del braccio corto del cromosoma 17 (del17p), indicando come possibili altri marcatori la traslocazione t(14;16), il gain di 1q21 la delezione del braccio corto del cromosoma 1, del1p (Caers J et al, 2018).

La definizione di alto rischio citogenetico nel mieloma multiplo di nuova diagnosi si è progressivamente affinata nel tempo attraverso l'applicazione di diversi sistemi di classificazione prognostica. A partire dall'adozione del Revised International Staging System (R-ISS), passando per la sua evoluzione nel Second Revised ISS (R2-ISS), fino ad arrivare agli sforzi attuali dell'International Myeloma Society (IMS)/IMWG per stabilire criteri ancora più precisi e condivisi, la stratificazione del rischio citogenetico è divenuta un elemento cardine nella gestione clinica del paziente.

Nel R-ISS, sono stati identificati come marcatori di alto rischio citogenetico: del(17p), t(4;14) e t(14;16) (Palumbo A et al, 2015).

L'R2-ISS ha introdotto delle modifiche: la traslocazione t(14;16) non è più considerata un fattore di alto rischio, poiché non è risultata statisticamente significativa nell'analisi multivariata. Al contempo, è stato introdotto un nuovo fattore prognostico, il gain di 1q21, definito come la presenza di almeno tre copie di 1q21. L'R2-ISS ha mantenuto come alterazioni ad alto rischio sia la delezione di 17p, sia la traslocazione t(4;14) (*D'Agostino M et al, 2022*). Più recentemente, l'IMS e l'IMWG sono giunti ad un consensus per la definizione del mieloma multiplo ad alto rischio che introduce il valore soglia percentuale per la definizione della delezione di 17p (20%), la mutazione di *TP53* e la delezione biallelica di 1p32. A differenza dei precedenti modelli, nel consensus assume importanza la combinazione delle alterazioni, per cui il gain/amplificazione di 1q21, ora indicato come +1q21, o la delezione di 1p32 definiscono l'alto rischio solo se accompagnate alle traslocazioni che classicamente indicavano un alto rischio: t(4;14) e t(14;16) e t(14;20) (Tabella 10.1). Riguardo le alterazioni a carico del cromosoma 1, loci 1q21 e 1p32, è la contemporanea presenza della delezione monoallelica di 1p32 e dell'alterazione del locus 1q21 (+1q21), oppure la delezione bilallelica di 1p32, valutata in NGS, che definiscono l'alto rischio (*Avet-Loiseau H et al. 2025*).

Un concetto emergente di grande rilevanza è quello di "double hit", ovvero la presenza simultanea di due alterazioni genetiche ad alto rischio nello stesso paziente. Parallelamente, vi è un crescente interesse verso la traslocazione t(11;14)(q13;q32), considerata a rischio citogenetico standard, come marcatore predittivo di risposta a venetoclax (*Rajkumar SV, 2024*).

Compito del laboratorio è la caratterizzazione dei marcatori prognostici alla diagnosi e alla recidiva per la definizione dell'alto rischio citogenetico, compresa la valutazione della traslocazione t(11;14) per le implicazioni terapeutiche.

Tab 10.1. Alto rischio citogenetico nei modelli di prognosi	
Modello di prognosi	Alterazioni considerate ad alto rischio citogenetico
R-ISS	del(17p), t(4;14), t(14;16)
R2-ISS	del(17p), t(4;14), gain1q21
IMS-IMWG 2024	-del17p (20% cut-off) e/o mutazioni <i>TP53</i> ^a -t(4;14)/t(14;16)/t(14;20) in associazione a +1q21 e/o del1p32 -del1p32 monoallelica in associazione a +1q21 o delezione biallelica 1p32 ^a

(a) Valutata mediante NGS
del(17p) corrisponde alla delezione di *TP53*;
t(4;14)(p16;q32)/NSD2::IGH;
t(14;16)(q32;q23)/IGH::MAF;
t(14;20)(q32;12)/IGH::MAFB;
gain 1q21: 3 copie di 1q21;
+1q21: gain (3 copie) o amplificazione (≥4 copie)

Rilievi Tecnico-Laboratoristici

Si riportano di seguito le considerazioni generali ricavate dalle recenti raccomandazioni sulla definizione di mieloma ad alto rischio da parte di IMS-IMWG:

- iFISH (Interphase Fluorescence In Situ Hybridization):** L'iFISH da solo non è sufficiente per una stratificazione completa del rischio nei pazienti con mieloma multiplo. Se l'iFISH viene eseguita, è fondamentale utilizzare plasmacellule selezionate o arricchite con una purezza di almeno il 70%. La percentuale di alterazione deve essere corretta in base alla purezza del campione. Inoltre, le mutazioni di TP53 e le piccole delezioni in 1p richiedono il sequenziamento, e l'iFISH non è più considerato sufficiente per rilevare queste modifiche.
- Metodi basati su NGS (Next-Generation Sequencing):** pur raccomandando l'uso di tecnologie NGS, come la Whole-Genome Sequencing (WGS) o il targeted NGS, per una profilazione molecolare ampia, il Panel riconosce che gli strumenti basati su sequenziamento potrebbero non essere immediatamente disponibili ovunque, e che la definizione di HRMM può comunque essere usata con quanto disponibile.
- Tipo di campione:** Nonostante i dati suggeriscano una eterogeneità spaziale del profilo molecolare (con diverse sedi tumorali che possono avere profili o distribuzioni clonali differenti), si raccomanda di utilizzare il midollo osseo per valutare il profilo molecolare.
- Tempistica della valutazione del rischio e definizione dello stato di rischio:** È cruciale eseguire la valutazione del rischio sia alla diagnosi sia alla recidiva. Le caratteristiche di rischio dovrebbero essere valutate alla recidiva e prima della partecipazione a uno studio clinico. Lo stato di rischio alla recidiva soppianta lo stato di rischio alla diagnosi, a meno che il paziente non sia stato già classificato come ad alto rischio alla diagnosi, nel qual caso la designazione di alto rischio iniziale rimane valida (*Avet-Loiseau H et al. 2025*).

Si rimanda alle indicazioni generali per l'analisi FISH Tabella 4.3.

Tabella 10.2 MM: Laboratori di afferenza per gli Hub ematologici della REV						
	AOUN PADOVA	AOUN VERONA	ULSS2 TREVISO	ULSS3 MESTRE- VENEZIA	ULSS8 VICENZA	IOV CFV
Valutazione patologica	X	X	X	X	X	X
Citometria a flusso	X	X	X	X	X	Lab ULSS2
Citometria a flusso, MRD	X		X		X	Lab ULSS2
Citometria, CTC	X		X	X	X	
Analisi FISH	Lab IOV PD	Lab IOV PD	X	Lab IOV PD	X	Lab ULSS2

X= presso il proprio laboratorio di competenza

11 Leucemia Mieloide Cronica

La leucemia mieloide cronica (LMC) è una neoplasia mieloproliferativa definita dalla presenza della fusione genica *BCR::ABL1*, corrispondente alla traslocazione t(9;22)(q34;q11.2) e al così detto “cromosoma Philadelphia”. Fino alla Classificazione WHO 2016, la LMC era stratificata in 3 fasi (fase cronica, accelerata e blastica), in base alla quota blastica e a numerosi parametri clinico-laboratoristici e citogenetici (Arber D A et al, 2016). Le recenti classificazioni WHO e ICC 2022 hanno modificato tale approccio, adottando terminologie e criteri non completamente sovrapponibili. L’ICC 2022 mantiene la stratificazione in 3 fasi, semplificando tuttavia i criteri di fase accelerata, che può essere diagnostica in presenza di uno o più dei seguenti reperti: (i) blasti su sangue periferico/midollare compresi tra il 10% e il 19% degli elementi nucleati totali; (ii) basofili su sangue periferico $\geq 20\%$; (iii) presenza di alterazioni citogenetiche aggiuntive nelle cellule Philadelphia-positive. La Classificazione WHO 2022 ha eliminato il concetto di fase accelerata, adottando il termine di “fase cronica ad elevato rischio” con criteri diagnostici simili a quelli della fase accelerata secondo ICC 2022 (Arber D A et al, 2022; Heuser M et al, 2022).

Sulla base di quanto esposto, la valutazione citogenetica e molecolare è fondamentale per la diagnosi e la stratificazione prognostica della LMC. La valutazione citologica e l’analisi immunofenotipica sono altrettanto importanti per definire la quota e il tipo di blasti circolanti o su midollo osseo. L’analisi istologica del midollo osseo contribuisce a un miglior inquadramento diagnostico e integra la valutazione citologica e citofluorimetrica, pur non essendo raccomandata in tutti i casi.

11.1 Valutazione citologica/istologica del midollo osseo

Rilievi Clinico-Diagnostici

Nei casi di sospetta LMC, la valutazione citologica del midollo osseo è raccomandata per quantificare la percentuale di blasti e contribuire a definirne l’eventuale linea di differenziazione. Tale valutazione contribuisce in particolare a identificare le forme accelerate e blastiche di malattia.

La valutazione istologica del midollo osseo non costituisce, invece, requisito fondamentale per la diagnosi di LMC. Il ricorso all’esame istologico è riservato a casi nei quali la valutazione citologica sia non dirimente/non informativa (e.g. *punctio sicca*) o nei casi in cui vi sia una specifica indicazione clinica (e.g. stima della fibrosi midollare; valutazione di fasi progressive di malattia; etc) (Arber D A et al, 2022; Heuser M et al, 2022).

Rilievi Tecnico-Laboratoristici

Per i principi della valutazione cito/istologica del midollo osseo, si rimanda al paragrafo introduttivo del presente documento. Alla valutazione morfologica midollare, in corso di LMC il midollo è ipercellulato con netto incremento del rapporto mielo:eritroide, aumento di tutte le fasi maturative della granulopoiesi, riduzione dell'eritropoiesi e incremento della megacariocitopoiesi. Quest'ultima è costituita da megacariociti di taglia ridotta con nuclei iposegmentati (*c.d.* megacariociti nani). Alla valutazione istologica, la trama reticolinica è solitamente esile o poco infittita (fibrosi di grado <MF-2). In rari casi, il midollo osseo ha caratteristiche simil-MFP con incremento di megacariociti in *cluster* densi e variabile incremento della trama reticolinica. Tali casi sono associati a un decorso clinico più aggressivo e a minor risposta agli inibitori delle Tirosin chinasi.

Come nel caso delle MPN Philadelphia-negative, nel *work-up* istologico della LMC è raccomandato il ricorso ad analisi immunoistochimiche, per una migliore conta dei blasti midollari e/o di popolazioni mastocitarie atipiche. A tal fine, i pannelli immunoistochimici dovrebbero comprendere almeno colorazioni per CD34 e CD117. Ove opportuno, possono essere applicati pannelli più estesi per valutare le serie emopoietiche (*e.g.* colorazioni per MPO, glicoforina, CD71, E-Caderina, CD61, CD42, *etc*) o eventuali aberrazioni fenotipiche dei mastociti (CD25, CD30, CD2) (*Arber D A et al, 2022; Heuser M et al, 2022*).

11.2 Valutazione immunofenotipica

Rilievi Clinico-Diagnostici

L'analisi immunofenotipica è indicata nell'identificazione precoce dei pazienti a rischio di evoluzione blastica. L'esecuzione dell'analisi citofluorimetrica al momento della diagnosi o nel follow-up può consentire un'accurata conta della percentuale di blasti e una definizione del loro fenotipo.

La presenza di linfoblasti in numero aumentato dovrebbe indurre a sospettare un alto rischio di progressione. Mentre, qualora la percentuale di blasti sia maggiore del 20% si pone diagnosi di fase blastica (*Shanmuganathan N et al, 2023*).

Rilievi Tecnico-Laboratoristici

Si prega di fare riferimento a quanto riportato nel paragrafo 4.4.

11.3 Valutazione Genetica

Citogenetica

Rilievi Clinico-Diagnostici

L'analisi citogenetica classica permette di identificare la traslocazione bilanciata $t(9;22)(q34;q11.2)$ che è considerata l'alterazione cromosomica specifica per la leucemia mieloide cronica (LMC). Il cromosoma derivativo 22, anche noto come cromosoma Philadelphia, deriva nel 85-90% dei casi dalla traslocazione classica $t(9;22)(q34;q11.2)$, e nel 5-10% da traslocazioni cosiddette varianti che vedono il coinvolgimento di uno o più cromosomi oltre a 9q34 e a 22q11.2. In circa l'1-5% dei casi la fusione $BCR::ABL1$ è criptica al bandeggio in quanto deriva da un doppio evento ricombinante che inserisce $ABL1$ all'interno del gene BCR ; questi casi che vedono una discrepanza di risultati fra citogenetica e analisi molecolare possono essere indagati mediante FISH interfascia.

Alla diagnosi e/o nel corso del monitoraggio il clone Philadelphia positivo può presentare delle alterazioni cromosomiche aggiuntive (ACA/Ph+) cosiddette major-route ACA quali: un extra-Ph sia nella sua forma classica $der(22)t(9;22)(q34;q11.2)$, che nella forma di isoderivativo 22, $ider(22)t(9;22)(q34;q11.2)$, la trisomia del cromosoma 8 (+8), la trisomia del cromosoma 19 (+19) e l'isocromosoma del braccio lungo del cromosoma 17 ($i(17q)$), che vengono indicate anche come high-risk ACA, in quanto sono state associate a tempi più lunghi per raggiungere la remissione citogenetica completa e la risposta molecolare maggiore, così come a una sopravvivenza libera da progressione e una sopravvivenza più brevi, almeno nei pazienti trattati con imatinib. Più recentemente anche le alterazioni: trisomia 21 (+21), trisomia 17 (+17), monosomia 7/delezione del braccio lungo del 7 ($-7/7q-$), riarrangiamenti che coinvolgono i loci 3q26.2 e 11q23 ed il cariotipo complesso sono considerati come high-risk ACA. Diversamente la perdita del cromosoma Y e le traslocazioni varianti non modificano la prognosi.

Nel 5-10% dei casi di LMC emergono alterazioni cromosomiche clonali in cellule Philadelphia negative (CCA/Ph-) durante il trattamento. Queste alterazioni possono essere anche transitorie e di per sé non modificano la prognosi, a meno che non si tratti di alterazioni che coinvolgono il cromosoma 7 come la delezione 7q o monosomia 7 ($7q-/-7$). Quest'ultime, infatti, sono state associate a minor risposta alla terapia, a displasia o al rischio di sviluppare una sindrome mielodisplastica o una leucemia mieloide acuta (Cross NCP et al, 2023).

Fluorescence in situ hybridization (FISH)

L'analisi FISH mediante sonde geniche per *ABL1* (9q34) e *BCR* (22q11) è in grado di indentificare tutti i differenti tipi di fusione *BCR::ABL1* e rappresenta un valido ausilio nei casi di traslocazioni varianti o di riarrangiamenti criptici, sia nell'analisi in interfase che in metafase. La FISH può essere anche utilizzata alla diagnosi come metodica di screening su leucociti da sangue periferico. Si sottolinea che la FISH non è in grado di identificare alterazioni cromosomiche aggiuntive (ACA/Ph+) (*Cross NCP et al, 2023*).

Rilievi Tecnico-Laboratoristici

Alla diagnosi l'analisi citogenetica è obbligatoria e deve essere eseguita preferibilmente su aspirato midollare, anche se è possibile ottenere metafasi dal sangue periferico. L'analisi deve essere condotta su almeno 20 metafasi (preferibilmente 25) e nella valutazione successiva alla diagnosi deve essere riportato il grado di risposta citogenetica in base alla percentuale di cellule Philadelphia positive (*Hasting R, ECA 2013*):

- Risposta Citogenetica Completa, CCyR (0% metafasi Ph+)
- Risposta Citogenetica Parziale, PCyR (1%-35% metafasi Ph+)
- Risposta Citogenetica Minore, MCyR (36%-65% metafasi Ph+)
- Risposta Citogenetica Minima, mCyR (66%-95% metafasi Ph+)
- Nessuna Risposta Citogenetica (persistenza (96-100%) del clone Ph+).

Analisi molecolare

Rilievi Clinico-Diagnostici

Analisi molecolare del riarrangiamento *BCR::ABL1*

L'analisi molecolare mediante Reverse Transcriptase-PCR (RT-PCR) identifica il tipo di trascritto *BCR::ABL1* derivato dalla traslocazione t(9;22)(q34;q11.2), amplificando la regione in prossimità della giunzione tra i geni *BCR* e *ABL1*.

Differenti sono i punti di rottura sul gene *BCR* che danno origine a differenti trascritti e quindi a differenti proteine di fusione con pesi molecolari che vanno da 190 KDa a 230 KDa. La rottura del gene *ABL1* avviene quasi sempre nell'introne a monte dell'esone 2 (a2) o più raramente a monte dell'esone 3 (a3). Nel gene *BCR* La regione più frequentemente coinvolta è la Major-breakpoint cluster region (M-BCR) da cui derivano i trascritti più frequenti, e13a2 ed e14a2

(b2a2 e b3a2, rispettivamente secondo la vecchia nomenclatura) che producono la proteina p210 e rendono conto di circa il 95% dei casi di CML. Circa il 2% dei pazienti con LMC esprime trascritti atipici che derivano da punti di rottura all'esterno della M-BCR o dopo l'esone 2 di *ABL1*, che producono proteine di differente lunghezza come per esempio e1a2 ed e19a2, che codificano rispettivamente per una proteina di 190kD (p190) e di 230KD (p230). Esistono altri trascritti atipici di riscontro più raro quali e6a2, e8a2, e13a3 e e14a3.

La conferma della presenza di un trascritto di fusione e la caratterizzazione dello stesso prima dell'inizio della terapia sono necessari per la diagnosi della LMC e per il monitoraggio della risposta alla terapia.

Nonostante siano stati riportate mutazioni somatiche in geni associati a neoplasia in circa il 20-30% di LMC in fase cronica e nel 15-20% delle fasi blastiche, l'analisi di pannelli di geni mieloidi e linfoidi mediante tecniche di next generation sequencing (NGS) nella fase cronica della malattia non è raccomandata, trovando spazio eventualmente nelle forme che si presentano o che progrediscono ad una fase blastica per la ricerca di nuovi target terapeutici (*Cross NCP et al, 2023*).

Il monitoraggio della MRD in corso di terapia si basa sull'utilizzo di un saggio molecolare quantitativo: Reverse Transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) o in alternativa Reverse transcription digital PCR (RT-dPCR) che va a misurare i livelli di trascritto *BCR::ABL1* nel sangue periferico esprimendoli come rapporto percentuale fra il numero di copie del trascritto specifico rispetto alle copie di un gene di controllo espresso ubiquitariamente (generalmente *ABL1* o in alternativa *GUSB*). Per i trascritti e13a2 ed e14a2 il rapporto tra i livelli di espressione di *BCR::ABL1* e quelli del gene di riferimento devono essere riportati secondo "International Scale" che permette di allineare i risultati ottenuti dai differenti laboratori rispetto ai livelli standardizzati definiti nello studio IRIS. In pratica il rapporto *BCR-ABL1* su *ABL1* è espresso come % su una scala logaritmica dove 10%, 1%, 0,1% corrispondono a una diminuzione di 1, 2, 3 log rispetto al livello di trascritto basale cui è stato attribuito convenzionalmente un valore pari al 100%. Il valore di 0,1% corrisponde alla Risposta Molecolare Maggiore (MMR) o riduzione di 3 logaritmi dal baseline (100%). Sulla base della profondità della risposta, vengono, poi, definiti degli ulteriori gradi di risposta: MR 4.0, MR 4.5, MR 5.0, che corrispondono ad una risposta molecolare profonda la cui sensibilità dipende dai livelli del gene di riferimento (*Cross NCP et al, 2015*).

La valutazione della MRD per i trascritti atipici deve essere condotta mediante saggi sviluppati *in house*, non essendo disponibili kit commerciali basati su RT-qPCR o RT-dPCR. La MRD viene riportata come livello di risposta molecolare individuale (Individual Molecular Response, IMR), espressa su scala logaritmica, rispetto ai livelli del trascritto alla diagnosi secondo le raccomandazioni del gruppo cooperativo EUTOS (*Schafer V et al, 2021*).

Analisi mutazionale *BCR::ABL1*

L'insorgenza di mutazioni nel dominio tirosin-chinasico (TKD) di *BCR::ABL1* è uno dei più importanti meccanismi di resistenza alla terapia con inibitori tirosinchinasici (TKI) nella LMC. Mutazioni di *BCR-ABL1* possono essere evidenziate ad una frequenza che varia dal 25% al 70% a seconda che il paziente si trovi in fase cronica o in fase avanzata. Le mutazioni presentano una diversa sensibilità ai diversi TKI e quindi il loro riscontro influenza significativamente la scelta della terapia dopo il fallimento della prima linea.

Per l'analisi delle mutazioni nel dominio TKD di *BCR::ABL1*, le più recenti raccomandazioni dell'European LeukemiaNet indicano, se disponibile, un approccio basato su un saggio NGS "targeted" in quanto è in grado di garantire una maggiore sensibilità (3-5% Variant allele fraction (VAF) per un saggio standard, $VAF \leq 0,5\%$ per NGS error-corrected); in alternativa, il sequenziamento Sanger è ancora accettato, considerato che la diffusione di saggi NGS per questo tipo di analisi è ancora limitata, non esistono kit commerciali e occorre sviluppare e validare protocolli *in house*. È, comunque, necessario ricordare che il limite di sensibilità del sequenziamento Sanger è di circa 15-20%.

Anche la digital PCR può essere impiegata per l'analisi delle mutazioni di resistenza; tuttavia, poiché consente di rilevare solo un numero limitato di varianti prefissate, assume il ruolo di test di screening di primo livello per l'individuazione rapida di mutazioni specifiche quando è urgente sostituire il TKI.

L'analisi mutazionale deve coprire l'intero dominio TKD (residui 232-516), per individuare le varianti associate ai TKI di prima, seconda e terza generazione, ed estendersi anche alle regioni al di fuori del TKD nei pazienti in trattamento con asciminib (Cross NCP et al, 2023).

Rilievi Tecnico-Laboratoristici

Requisiti per il monitoraggio molecolare

Si rimanda al paragrafo 4.4.

○ Livelli di risposta molecolare International Scale per *BCR::ABL1*

$BCR::ABL1^{IS} \leq 10\%$: MR 1.0^a

$BCR::ABL1^{IS} \leq 1\%$: MR 2.0^a

$BCR::ABL1^{IS} \leq 0,1\%$: MR 3.0^a o MMR (Major Molecular Response)

$BCR::ABL1^{IS} \leq 0,01\%$: MR 4.0^a

$BCR::ABL1^{IS} \leq 0,0032\%$: MR 4.5 (ABL1 32.000 copie)

$BCR::ABL1^{IS} \leq 0,001\%$: MR 5.0 (ABL1 100.000 copie)

^a: il numero minimo di copie di *ABL1* in ogni replicato deve essere 10.000.

- **Raccomandazioni per l'analisi mutazionale di *BCR::ABL1*:**
 - L'analisi deve essere condotta a partire da RNA ottenuto da leucociti dal sangue periferico aspirato midollare (non DNA genomico)
 - Considerare lo screening mutazionale quando i livelli di mRNA di *BCR::ABL1* $\geq 0,1\%$ IS

Tabella 11.1 LMC: Laboratori di afferenza per gli Hub ematologici della REV						
	AOUP PADOVA	AOUI VERONA	ULSS2 TREVISO	ULSS3 MESTRE- VENEZIA	ULSS8 VICENZA	IOV CFV
Valutazione patologica	X	X	X	X	X	X
Citometria a flusso	X	X	X	X	X	Lab ULSS2
Analisi Citogenetica	Lab IOV PD	X	X	Lab IOV PD	X	Lab ULSS2
Analisi Molecolare diagnosi	Lab IOV PD	X	X	X Lab IOV PD	X	Lab ULSS2
NGS dg	Lab IOV PD	Lab IOV PD	X	Lab IOV PD	X	Lab ULSS2
Analisi mutazionale resistenza TKI	Centro LabNet CML					
Analisi molecolare, MRD	Lab IOV PD	X	X	X	X	Lab ULSS2

X=presso il proprio laboratorio di competenza

12 Neoplasie Mieloproliferative Croniche Philadelphia-negative

Le neoplasie mieloproliferative croniche (MPN) Philadelphia-negative costituiscono un gruppo eterogeneo di neoplasie della cellula staminale emopoietica, caratterizzate da proliferazione di uno o più serie emopoietiche nel midollo osseo e da variabili citosi su sangue periferico. A seconda della presentazione clinica e del profilo molecolare, si distinguono MPN Philadelphia-negative “classiche” (Trombocitemia Essenziale [ET], Policitemia Vera [PV] e Mielofibrosi Primitiva [MFP]) e “non-classiche” (Leucemia Neutrofilica Cronica, Leucemia Eosinofilica Cronica e, secondo la sola Classificazione WHO 2022, Leucemia Mielomonocitica Giovanile). Il presente documento considererà la diagnosi delle sole MPN Philadelphia-negative classiche, rimandando alle fonti di letteratura per la diagnosi delle rarissime forme non-classiche.

A fronte di presentazioni cliniche e prognosi molto diverse, le MPN Philadelphia-negative classiche sono caratterizzate da un simile *background* molecolare e da *pattern* evolutivi ricorrenti. Questi ultimi comprendono: (i) l’evoluzione fibrotica (*i.e.* fibrosi midollare di grado $\geq$ MF-2); (ii) l’evoluzione a fase accelerata (10-19% di blasti su sangue periferico/midollare) e blastica ($\geq$ 20% di blasti su sangue periferico/midollare); (iii) pattern evolutivi rari (*e.g.* evoluzione mielodisplastica; progressione monocitosica o neutrofilica).

I criteri diagnostici delle MPN Philadelphia-negative classiche e delle loro fasi evolutive sono stati periodicamente aggiornati a partire dalla Classificazione WHO 2001. Gli attuali criteri WHO e ICC 2022 sono sostanzialmente sovrapponibili e confermano quanto previsto dalla Classificazione WHO 2016 (Arber DA et al, 2022; Hauser M et al, 2022). Come tale, la diagnosi di MPN Philadelphia-negativa classica richiede l’integrazione di (i) parametri clinico-laboratoristici; (ii) valutazione istologica di BOM; e (iii) dati citogenetico-molecolari (ricerca di mutazioni *driver* e *non-driver* di malattia).

12.1 Valutazione citologica/istologica del midollo osseo

Rilievi Clinico-Diagnostici

La valutazione istologica della BOM ha un ruolo fondamentale nella diagnosi delle neoplasie mieloproliferative (MPN) Philadelphia-negative classiche (*i.e.* Policitemia Vera [PV], Trombocitemia Essenziale [TE] e Mielofibrosi Primitiva [MFP]). Le classificazioni WHO e ICC 2022 riconoscono, infatti, tra i criteri diagnostici maggiori di PV, ET e MFP la presenza di reperti istologici midollari caratteristici (ICC/WHO 2022; Tabelle 12.1-12.3). La BOM è quindi raccomandata in tutti i casi di sospetta MPN Philadelphia-negativa. La valutazione istologica midollare è raccomandata anche nel

sospetto di progressione fibrotica ed è consigliata nella diagnosi di fase accelerata/blastica di malattia.

Per quanto utile (specie nel conteggio dei blasti midollari), la citologia non sostituisce in alcun caso l'istologia midollare per la diagnosi di MPN Philadelphia-negativa. Essa ha tuttavia un ruolo rilevante nella diagnosi di fase accelerata e progressione blastica (*vide infra*).

Tabella 12.1. Criteri diagnostici di Trombocitemia Essenziale (TE)
Criterio maggiore
1. Conta piastrinica $> 450 \times 10^9/L$ 2. Biopsia midollare coerente con la diagnosi di TE (<i>i.e.</i> proliferazione megacariocitaria caratterizzata da megacariociti di dimensioni aumentate, maturi e con nuclei iperlobati; assenza di <i>left shift</i> della granulopoiesi e/o della eritropoiesi; assenza di fibrosi reticolinica di grado $> MF-1$). 3. Assenza dei criteri WHO per leucemia mieloide cronica, policitemia vera, mielofibrosi primitiva, sindromi mielodisplastiche o altre neoplasie mieloidi 4. Presenza di mutazione di <i>JAK2</i> , <i>CALR</i> o <i>MPL</i>
Criteri minori
Presenza di un <i>marker</i> di proliferazione clonale o assenza di cause di trombocitosi reattiva

Nota. La diagnosi di TE necessita di tutti i criteri maggiori o dei primi tre criteri maggiori e del criterio minore.

Tabella 12.2. Criteri diagnostici di Policitemia Vera (PV)
Criteri maggiori
1. Incremento dell'emoglobina (>16.5 g/dL negli uomini; >16 g/dL nelle donne) o dell'ematocrito ($>49\%$ negli uomini; $>48\%$ nelle donne) o della massa eritrocitaria ($>25\%$ del valore medio normale previsto) 2. Biopsia midollare con ipercellularità in rapporto all'età e proliferazione trilineare con megacariociti pleomorfi e maturi 3. Presenza della mutazione V617F o di mutazioni dell'esone 12 di <i>JAK2</i>
Criterio minore
Ridotti livelli sierici di eritropoietina

Nota. La diagnosi di PV necessita di tutti e tre i criteri maggiori o dei primi due criteri maggiori e del criterio minore.

La biopsia ossea non è necessaria per la diagnosi di PV in caso di: (i) persistente riscontro di emoglobina >18.5 g/dL o ematocrito $>55.5\%$ (negli uomini) o emoglobina >16.5 g/dL o ematocrito $>49.5\%$ (nelle donne); e (ii) presenza della mutazione V617F o di mutazioni dell'esone 12 di *JAK2*.

Tabella 12.3. Criteri diagnostici di Mielofibrosi Primitiva (MFP)	
MFP in fase pre-fibrotica/precoce	MFP in fase fibrotica/avanzata
Criteri maggiori 1. Proliferazione megacariocitaria atipica, in assenza di fibrosi reticolinica di grado > MF-1, con aumento della cellularità midollare, espansione mieloide e (spesso) ridotta eritropoiesi 2. Assenza dei criteri diagnostici di leucemia mieloide cronica, policitemia vera, sindromi mielodisplastiche o altre neoplasie mieloidi 3. Presenza di mutazione di <i>JAK2</i>, <i>CALR</i> o <i>MPL</i> o presenza di un altro marker di clonalità o assenza di fibrosi midollare reattiva	Criteri maggiori 1. Proliferazione megacariocitaria atipica con fibrosi reticolinica di grado >MF-1 2. Assenza dei criteri diagnostici di leucemia mieloide cronica, policitemia vera, sindromi mielodisplastiche o altre neoplasie mieloidi 3. Presenza di mutazione di <i>JAK2</i>, <i>CALR</i> o <i>MPL</i> o presenza di un altro marker di clonalità o assenza di fibrosi midollare reattiva
Criteri minori 1. Anemia non attribuibile ad altre cause 2. Leucocitosi $\geq 11 \times 10^9/L$ 3. Splenomegalia palpabile 4. LDH aumentata	Criteri minori 1. Anemia non attribuibile ad altre cause 2. Leucocitosi $\geq 11 \times 10^9/L$ 3. Splenomegalia palpabile 4. LDH aumentata 5. Leucoeritroblastosi

Nota. La diagnosi di MFP necessita di tutti e tre i criteri maggiori e di un criterio minore.

Rilievi Tecnico-Laboratoristici

Per i principi della valutazione cito/istologica del midollo osseo, si rimanda al paragrafo introduttivo del presente documento (paragrafi 4.1 e 4.2). Nel caso delle MPN Philadelphia-negative classiche, la diagnosi istologica si basa principalmente sull'integrazione di (i) cellularità, (ii) rapporto mielo:eritroide, (iii) maturazione della granulopoiesi, (iv) quantità, tendenza aggregativa, tipologia di *cluster* e caratteristiche citologiche della megacariocitopoiesi, (v) presenza e grado della fibrosi midollare. La valutazione integrata di tali parametri consente di identificare *pattern* istologici caratteristici di ciascuna MPN.

Nel caso della TE, il midollo osseo ha cellularità normale/lievemente aumentata con normale rapporto mielo:eritroide, serie mieloide ed eritroide maturanti e variabile incremento della megacariocitopoiesi. I megacariociti tendono a formare *cluster* lassi (*i.e.* aggregati di ≥ 3 megacariociti con cellule eritroidi o mieloidi interposte), hanno taglia aumentata e nuclei ipersegmentati. La trama reticolinica è esile o solo lievemente aumentata (fibrosi di grado <MF-2, sec. WHO/ICC 2022).

Nel caso della PV, il midollo ha cellularità aumentata con incremento di tutte le serie emopoietiche (*c.d.* panmielosi), rapporto mielo:eritroide normale o lievemente ridotto, serie mieloide ed eritroide maturanti e incremento della megacariocitopoiesi. I megacariociti sono di taglia variabile e tendono a formare *cluster* lassi. La trama reticolinica è esile o solo lievemente aumentata (fibrosi di grado <MF-2).

Nella MFP, il midollo ha cellularità solitamente aumentata con incremento del rapporto mielo:eritroide, aumento dei precursori della serie mieloide (*c.d.* *left shift*) e incremento della megacariocitopoiesi. I megacariociti hanno nuclei iposegmentati/bulbosi e tendono a formare ampi *cluster* densi (*i.e.* aggregati di ≥ 5 megacariociti senza cellule eritroidi o mieloidi interposte). La trama reticolinica è esile o solo lievemente aumentata (fibrosi di grado <MF-2) nelle forme pre-fibrotiche di malattia. La trama reticolinica è nettamente aumentata (fibrosi di grado MF-2 o MF-3) nelle fasi fibrotiche di malattia. Nella MFP, oltre al grado di fibrosi è possibile valutare anche l'entità dei depositi di fibre collagene e dell'osteosclerosi midollare, secondo i criteri WHO 2016. Tale valutazione non è tuttavia mandatoria.

La valutazione istologica del midollo osseo è rilevante anche nella diagnosi di progressione di malattia. La progressione fibrotica (*i.e.* mielofibrosi post-PV; mielofibrosi post-ET; MFP in fase fibrotica) è istologicamente definita dalla presenza di fibrosi reticolinica di grado $\geq$ MF-2. La diagnosi di fase accelerata o blastica si basa invece sulla documentazione di un incremento di mieloblasti nel midollo osseo o su sangue periferico ($\geq 10\%$ in fase accelerata; $\geq 20\%$ in fase blastica). Tale valutazione può essere eseguita mediante BOM o su striscio di sangue periferico/midollare.

Nel *work-up* istologico delle MPN Philadelphia-negative è raccomandato il ricorso anche ad analisi immunoistochimiche, per una migliore conta dei blasti midollari e/o di eventuali popolazioni mastocitarie atipiche. A tal fine, i pannelli immunoistochimici dovrebbero comprendere almeno colorazioni per CD34 e CD117. Ove opportuno, possono essere applicati pannelli di secondo livello per valutare le singole serie emopoietiche (*e.g.* colorazioni per MPO, glicoforina, CD71, E-Caderina, CD61, CD42, *etc*) o per documentare aberrazioni fenotipiche dei mastociti (CD25, CD30, CD2) (Arber DA *et al*, 2022; Hauser M *et al*, 2022).

12.2 Immunofenotipo

Rilievi Clinico-Diagnostici

L'analisi immunofenotipica tramite citometria a flusso (FCM) può essere impiegata per un miglior inquadramento diagnostico e prognostico e nel monitoraggio delle neoplasie mieloproliferative croniche (MPN) (Barosi G *et al*, 2001; Bassan V L *et al*, 2022; Chan A *et al*, 2023; Mannelli F *et al*,

2022; Saft L et al, 2023; Selimoglu-Buet D et al 2015; Wagner-Ballon et al, 2023). I saggi che possono essere impiegati sono i seguenti:

Conta assoluta delle cellule CD34+ circolanti mediante protocollo ISHAGE

Un valore soglia di $15 \times 10^6/L$ cellule CD34+ consente di discriminare quasi completamente i pazienti affetti da mielofibrosi idiopatica (CD34+ $>15 \times 10^6/L$) da quelli affetti da un'altra MPN (CD34+ $<15 \times 10^6/L$).

Livelli più elevati di cellule CD34+ si associano ad una prognosi peggiore, con una sopravvivenza globale e un tempo alla trasformazione blastica significativamente ridotti. In particolare, i pazienti con più di $300 \times 10^6/L$ cellule CD34+ hanno una probabilità del 50% di sviluppare una trasformazione blastica.

Il monitoraggio delle cellule CD34+ può essere utile anche per valutare la risposta alla terapia. Durante il trattamento con idrossiurea, ad esempio, si osserva una riduzione significativa del numero di cellule CD34+ circolanti

Monocyte Assay. Analisi immunofenotipica specifica che consente di analizzare i sottoinsiemi di monociti mediante citometria a flusso. Il principio del test si basa sulla quantificazione relativa dei sottoinsiemi di monociti nel sangue periferico. I monociti possono essere suddivisi in tre sottoinsiemi in base all'espressione di CD14 e CD16: Monociti classici (cMo CD14++CD16-), Monociti intermedi (iMo CD14++CD16+), Monociti non classici (ncMo CD14-/lowCD16+).

Questo test si è dimostrato un potente strumento per la diagnosi della leucemia mielomonocitica cronica (CMML). Nella CMML, si osserva un caratteristico aumento della frazione di cMo a scapito degli altri due sottoinsiemi. Uno studio ha dimostrato che un valore soglia del 94% di cMo consente di discriminare la CMML da qualsiasi tipo di monocitosi reattiva con un'elevata specificità (94,1%) e sensibilità (91,9%).

Questo test permette di distinguere la CMML da altre MPN con monocitosi.

Quantificazione dei blasti. I marcatori utilizzati per identificare i blasti nelle MPN sono: CD34, CD117, HLA-DR, CD13, CD33, CD64. Oltre a questi possono essere impiegati altri marcatori linea specifici (es. CD14 o CD61). Sebbene la morfologia sia un metodo tradizionale per la valutazione dei blasti, la citometria a flusso (MFC) offre una maggiore sensibilità e specificità, consentendo di identificare e quantificare anche piccole popolazioni di blasti con un fenotipo anomalo.

La comparsa di blasti nel sangue periferico o nel midollo osseo può segnalare una trasformazione in una fase accelerata (MPN-AP) o in una leucemia acuta.

La conta dei blasti è inclusa in tutti i modelli prognostici, sebbene con diverse soglie (1% nell'IPSS/DIPSS, 2% nel MIPSS70 e 3% nel MYSEC-PM).

Rilievi Tecnico-Laboratoristici

Si prega di fare riferimento a quanto riportato nel paragrafo 4.4 e nelle seguenti fonti bibliografiche: *Sutherland DR et al. 1996, Wagner-Ballon, O. et al. 2022.*

12.3 Citogenetica

Rilievi Clinico-Diagnostici

Nelle malattie mieloproliferative croniche *BCR::ABL1* negative l'analisi citogenetica viene richiesta principalmente per escludere la presenza della traslocazione t(9;22)(q34;q11.2) e per identificare un marcatore di clonalità genetico, sebbene non ci siano alterazioni specifiche. Infatti, solo una minoranza di casi presenta alterazioni cromosomiche al momento della diagnosi, le quali, peraltro, sono comuni a diverse patologie mieloidi, senza essere specifiche per una determinata malattia mieloproliferativa o per le malattie mieloproliferative in generale. La percentuale di cariotipi alterati aumenta con la progressione della malattia arrivando fino al 90% al momento della trasformazione leucemica (*Heim S et al, 2015*).

Nella tabella 12.4 sono riportate le frequenze di cariotipi alterati nelle diverse patologie mieloproliferative alla diagnosi, insieme alle alterazioni cromosomiche più frequentemente associate a ciascuna entità.

Tabella 12.4. Alterazioni cromosomiche associate alle malattie mieloproliferative croniche Philadelphia negative			
Patologia	Frequenza di cariotipo alterato alla diagnosi	Alterazioni cromosomiche (frequenza nei casi con cariotipo alterato)	Note
Policitemia Vera	15-25%	20q- (20-30%), +8 (20%), +9 e abn 9p (16-20%), +1q (10-15%), 13q- (10%)	Possono precedere l'evoluzione della malattia
Trombocitemia Essenziale	<10%	del(20q), +8, +9,	Alterazioni a carico dei cromosomi 7 e 17 (7q-, der(1;7), 17p-, i17q)

		+1q, del(13q), del(5q)	predicono la trasformazione leucemica
Milofibrosi Idiopatica	40-50%	13q- (20-25%), 20q- (20-25%) +8 (15%) +9 (3-10%) +21(2-5%)	La progressione della malattia si accompagna all'acquisizione di alterazioni quali: +1q, 5q-, abn cr. 7, 17p-, i17q

Nella mielofibrosi idiopatica le alterazioni cromosomiche hanno assunto un significato prognostico, in particolare sono state definite le seguenti categorie di rischio citogenetico:

- “Very High Risk (VHR) Karyotype”**: alterazioni singole o multiple quali: -7, i(17q), inv(3)/3q21, 11q-/11q23r, o altre trisomie (singole o multiple) che coinvolgono cromosomi autosomici ad esclusione delle trisomie dei cromosomi 8 e 9;
- “Unfavorable karyotype”**: tutte le altre alterazioni
- “Favorable karyotype”**: cariotipo normale o alterazioni singole quali: 13q-, +9, 20q-, traslocazioni/duplicazioni che coinvolgono il cromosoma 1, o alterazioni dei cromosomi sessuali compreso -Y (Tefferi A et al, 2018a).

Entrambi i modelli di prognosi che contengono il dato genetico: il Mutation and karyotype enhanced IPSS (MIPSS-70 + Version 2.0) ed il Genetically-Inspired Scoring Systems (GIPSS) valutano la presenza delle alterazioni che definiscono il *VHR karyotype* e l'*unfavorable karyotype* (Tefferi A et al, 2018a; Tefferi A et al, 2018b).

Rilievi Tecnico-Laboratoristici

Si rimanda alle tabelle 4.2 e 4.3 descritte nel paragrafo delle indicazioni generali.

12.4 Analisi Molecolare

Rilievi Clinico-Diagnostici

La diagnostica molecolare delle malattie mieloproliferative croniche Ph negative si basa sull'esclusione della presenza della fusione *BCR::ABL1* mediante reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). È raccomandato di iniziare il work up con la ricerca della mutazione del gene *JAK2* V617F su sangue periferico o aspirato midollare. In caso di risultato negativo si deve procedere con la valutazione degli altri due driver genetici, ovvero la ricerca della mutazione del gene *CALR* e del gene *MPL* quando il sospetto diagnostico comprende la trombocitemia essenziale

Tab 12.5. Alterazioni molecolari delle malattie mieloproliferative croniche non Ph+ e relativi saggi analitici

Patologia	Mutazioni Driver		Metodiche
Policitemia Vera	JAK2	<u>Esone 14</u> : p.(Val617Phe) (95%)	-PCR allele specifica (Sensibilità 0,1-1%) -qPCR (Sensibilità 0,01-0,1%) -Digital PCR (Sensibilità <0,1%)
		<u>Esone 12</u> (2-3%)	-Analisi dei frammenti (sensibilità <5%) e Sequenziamento di Sanger (Sensibilità 15-20%)
Trombocitemia Essenziale	JAK2	Esone 14: p.(Val617Phe) (60%)	-PCR allele specifica (Sensibilità 0,1-1%) -qPCR (Sensibilità 0,01-0,1%) -Digital PCR (Sensibilità <0,1%)
	MPL	Esone 10: p.(Trp515Leu/Lys) (1-4%)	-Analisi dei frammenti (sensibilità <5%) e Sequenziamento di Sanger (Sensibilità 15-20%)
	CALR	Esone 9 (20-35%) -Tipo 1: delezione di 52 bp -Tipo 2: inserzione di 5 bp (più frequente)	-Analisi dei frammenti (sensibilità <5%) e Sequenziamento di Sanger (Sensibilità 15-20%)
Mielofibrosi Idiopatica	JAK2	Esone 14: p.(Val617Phe) (60%)	-PCR allele specifica (Sensibilità 0,1-1%) -qPCR (Sensibilità 0,01-0,1%) -Digital PCR (Sensibilità <0,1%)
	MPL	Esone 10: p.(Trp515Leu/Lys) (5-8%)	-Analisi dei frammenti (sensibilità <5%) e Sequenziamento di Sanger (Sensibilità 15-20%)
	CALR	Esone 9 (20-35%) -Tipo 1: delezione di 52 bp (più frequente) -Tipo 2: inserzione di 5 bp	-Analisi dei frammenti (sensibilità <5%) e Sequenziamento di Sanger (Sensibilità 15-20%)

e la mielofibrosi; in caso di sospetto di policitemia vera si procede invece con la ricerca delle mutazioni del gene *JAK2* nell'esone 12. In alternativa all'approccio multistep, l'analisi NGS con un pannello multigenico, può identificare il driver della patologia o, nei casi triplo negativi, definire la clonalità della malattia (tabella 12.5) (Gerds A et al JNCCN 2022).

CALR Tipo 1 (delezione di 52 bp, p.(Lys367Valfs*46)

CALR Tipo 2 (inserzione di 5 bp, p.(Lys385Asnfs*47)

Una volta confermata la diagnosi di malattia mieloproliferativa l'analisi NGS diventa fondamentale per la caratterizzazione prognostica. Nella mielofibrosi idiopatica, le mutazioni a carico di *ASXL1*, *EZH2*, *SRSF2*, *TP53*, *IDH1*, *IDH2* e *U2AF1* rivestono un ruolo prognostico e sono definite mutazioni "High-molecular-risk" (HMR), in quanto si associano sia ad una ridotta sopravvivenza libera da leucemia sia ad una ridotta sopravvivenza complessiva. In particolare, i geni *ASXL1*, *EZH2*, *SRSF2*, *RAS* predicono la sopravvivenza globale, mentre *ASXL1*, *SRSF2*, *IDH1/2* predicono la trasformazione leucemica (Tefferi A et al, 2023).

Oltre alla presenza, anche il numero di mutazioni ad alto rischio (≥ 2 HMR) è risultato essere prognosticamente rilevante. Inoltre, la combinazione di *CALR* non mutato/*ASXL1* mutato identifica

pazienti con prognosi significativamente peggiore rispetto alla stessa con risultati invertiti (*CALR* mutato/*ASXL1* non mutato) (*Tefferi A et al, 2014*).

Rilievi tecnico-laboratoristici

Rispetto alle mutazioni dei geni driver più comuni descritte sopra, si riportano di seguito altre mutazioni meno frequenti

Mutazioni Aggiuntive di *JAK2*

- Mutazioni nell'esone 13: sono state riportate in rari casi di neoplasie mieloproliferative, specialmente in pazienti senza *JAK2 V617F* o *CALR/MPL* mutati.
- Mutazioni nell'esone 16 e 17: Sono state descritte mutazioni nel dominio catalitico della tirosina chinasi di *JAK2* (esoni 16-17), che possono alterare la regolazione dell'attività enzimatica. Alcune di queste mutazioni sono state associate a resistenza agli inibitori di *JAK2* (ruxolitinib).
- Mutazioni nell'esone 15, che sono state descritte oltre che nelle neoplasie mieloproliferative anche nella leucemia linfoblastica acuta (LLA).

Mutazioni *CALR* Non Canoniche:

Sono meno comuni (~10-15% delle mutazioni *CALR*) rispetto alle cosiddette canoniche e comprendono inserzioni e delezioni in-frame diverse dalle classiche tipo 1 e 2, possono comprendere anche mutazioni missenso.

Mutazione più rara del gene *MPL* (esone 10)

- c.1543_1544TG>CT (p.Trp515Arg) → MPL W515R
- c.1545_1546TG>AT (p.Trp515Ala) → MPL W515A
- c.1513G>A (p.Ser505Asn) → MPL S505N

12.5 Alterazioni genetiche nei disordini eosinofili

Le alterazioni genetiche rivestono un ruolo cruciale nei disordini eosinofili, condizionandone la diagnosi, la classificazione, la stratificazione prognostica e le scelte terapeutiche. Secondo le classificazioni WHO 5a edizione (2022) e ICC, sono state definite diverse entità cliniche nelle quali l'identificazione di specifici marcatori genetici è parte integrante del percorso diagnostico e gestionale (Arber DA et al, 2022; Khoury JD et al, 2022). È pertanto indicato indagare tali alterazioni mediante FISH, PCR o sequenziamento di nuova generazione (NGS), a seconda del tipo di anomalia sospettata. In particolare:

- Per le Neoplasie Mieloidi/Linfoidi con Eosinofilia e Fusioni di geni Tirosin-Chinasici (MLN-eo-TK), l'identificazione di specifiche fusioni geniche delle tirosin-chinasi come *PDGFRA*, *PDGFRB*, *FGFR1*, *JAK2*, *FLT3* o *ABL1* è critica, poiché queste alterazioni sono il bersaglio di terapie mirate altamente efficaci. Ad esempio, le fusioni che coinvolgono *PDGFRA* (in particolare *FIP1L1::PDGFRA*) o *PDGFRB* (più di 40 partner di traslocazione) rispondono in modo eccellente all'imatinib, trasformando una prognosi altrimenti sfavorevole in un esito favorevole e durevole.
- Nella Leucemia Eosinofila Cronica (CEL), la diagnosi richiede l'evidenza di anomalie clonali (citogenetiche e/o mutazioni somatiche), in assenza di altre neoplasie mieloidi ben definite. L'identificazione di mutazioni in geni come *ASXL1*, *DNMT3A*, *TET2* (spesso associate all'emopoiesi clonale di potenziale incerto, CHIP) o mutazioni attivanti in *JAK1* o *JAK2* è cruciale per la classificazione e può indicare una prognosi peggiore.
- La Sindrome Ipereosinofila - Variante Linfocitaria (Lymphocyte-variant HE) è definita dalla presenza di un clone aberrante di cellule T (spesso CD3-CD4+) che produce citochine eosinofilopoietiche. Le mutazioni attivanti nel dominio SH2 di *STAT3* (es. Y640F) e il riarrangiamento clonale dei geni del recettore delle cellule T sono alterazioni genetiche chiave che caratterizzano questa forma e guidano la scelta terapeutica.

Le analisi NGS sono inoltre fondamentali per la diagnosi differenziale tra CEL, NOS e Sindrome Ipereosinofila Idiopatica (HES) in quanto la presenza di alterazioni clonali delle cellule emopoietiche favorisce la diagnosi di CEL, NOS ed è considerata criterio di esclusione per la diagnosi di HES. In questo ambito, l'avanzamento delle tecniche di sequenziamento (NGS) ha permesso di identificare marcatori clonali, come mutazioni CHIP di *ASXL1*, *DNMT3A*, *TET2* o altre mutazioni mieloidi, che hanno portato a una riduzione dei casi di HES a favore della diagnosi di CEL, NOS o di altre neoplasie mieloidi con eosinofilia (Tabella 12.6) (Shomali W, et al 2024).

Tabella 12.6 Principali alterazioni genetiche nelle eosinofilie			
Gene/fusione o mutazione	Localizzazione cromosomica	Diagnosi associata (WHO/ICC 2022)	Terapia mirata / rilevanza clinica
<i>FIP1L1::PDGFRA</i> (e altre fusioni <i>PDGFRA</i>)	4q12	MLN-eo-TK	Imatinib altamente efficace; steroidi nelle prime fasi se danno cardiaco
<i>PDGFRB</i> (es. <i>ETV6::PDGFRB</i>)	5q31–33	MLN-eo-TK	Imatinib
<i>FGFR1</i> (es. <i>ZMYM2::FGFR1</i> , <i>BCR::FGFR1</i>)	8p11–12	MLN-eo-TK (precedentemente '8p11 myeloproliferative syndrome')	Pemigatinib approvato FDA; altri inibitori sperimentali
<i>PCM1::JAK2</i> e altre fusioni <i>JAK2</i> (<i>ETV6::JAK2</i> , <i>BCR::JAK2</i>)	9p24	MLN-eo-TK	Ruxolitinib e altri JAK2-inibitori (in studio);
<i>FLT3</i> (es. <i>ETV6::FLT3</i> , <i>TRIP11::FLT3</i>)	13q12	MLN-eo-TK	Inibitori <i>FLT3</i> (sorafenib, sunitinib, midostaurin, gilteritinib, quizartinib); spesso ponte a HSCT
<i>ETV6::ABL1</i>	9q34 / 12p13	MLN-eo-TK	Dasatinib, Nilotinib (risposte più durature di imatinib)
Altre fusioni rare (<i>ETV6::FGFR2</i> , <i>ETV6::LYN</i> , <i>ETV6::NTRK3</i> , RET fusions, ALK)	Vari	MLN-eo-TK	Terapie mirate disponibili o in trial clinici
Mutazioni somatiche in CEL/HES: <i>ASXL1</i> , <i>TET2</i> , <i>EZH2</i> , <i>SETBP1</i> , <i>CBL</i> , <i>NOTCH1</i> , <i>KIT D816V</i> , <i>JAK2 V617F</i> , <i>STAT5B N642H</i> , mutazioni <i>JAK1/JAK2</i>	Vari	CEL	Non targettabili in modo diretto (eccetto <i>KIT/JAK2/STAT5B</i>), ma hanno valore prognostico (peggiore OS, rischio trasformazione)

MLN-eo-TK: myeloid/lymphoid neoplasm with eosinophilia and TK fusion; CEL: Chronic eosinophilic leukemia, Leucemia Eosinofila Cronica

Tabella 12.7. MPN: Laboratori di afferenza per gli Hub ematologici della REV						
	AOUP PADOVA	AOUI VERONA	ULSS2 TREVISO	ULSS3 MESTRE-VENEZIA	ULSS8 VICENZA	IOV CFV
Valutazione patologica	X	X	X	X	X	X
Citometria a flusso	X	X	X	X	X	Lab ULSS2
Analisi Citogenetica	Lab IOV PD	X	X	Lab IOV PD	X	Lab ULSS2
Analisi Molecolare diagnosi	X Lab IOV PD	X	X	X Lab IOV PD	X	Lab ULSS2
NGS	Lab IOV PD	Lab IOV PD	X	Lab IOV PD	X	Lab ULSS2

X = presso il proprio laboratorio di competenza

13 Mastocitosi

Le mastocitosi sono neoplasie mieloidi caratterizzate da abnorme proliferazione di mastociti atipici. A seconda della presentazione clinica e delle caratteristiche biologiche, si distinguono tre gruppi principali di neoplasie mastocitarie: (i) le mastocitosi cutanee; (ii) le mastocitosi sistemiche (MS); e (iii) il sarcoma mastocitico. Le mastocitosi cutanee e sistemiche sono ulteriormente classificate in entità specifiche, caratterizzate da quadri clinici e prognosi molto variabili (Tabella 13.1).

Pur presentando alcune differenze nella classificazione (Tabella 13.1) e nei criteri diagnostici (Tabella 13.2) delle MS, le classificazioni WHO e ICC 2022 adottano il medesimo *workup* diagnostico, che si basa sull'integrazione di: (i) dati clinico-laboratoristici; (ii) caratterizzazione istologica e fenotipica degli infiltrati mastocitari; e (iii) analisi molecolari per mutazioni attivanti del gene *KIT* (Arber DA et al, 2022; Khoury JD et al, 2022).

Per la diagnosi di mastocitosi e, in particolare, per la diagnosi di tutte le forme di MS sono pertanto raccomandate la valutazione morfologica e fenotipica del midollo osseo (o di lesioni extra-midollari/extra-cutanee sospette) e analisi molecolari per lo *status* mutazionale di *KIT*. Diversamente da altre neoplasie mieloidi, le analisi citogenetiche rivestono un ruolo marginale nella diagnosi di MS, fatta eccezione per le sole MS con associate neoplasieematologiche.

Tabella 13.1 Classificazione delle mastocitosi (sec. ICC/WHO 2022)	
Mastocitosi cutanee	
Mastocitosi cutanea maculopapulare (orticaria pigmentosa)	
-	Monomorfa
-	Polimorfa
Mastocitosi cutanea diffusa	
Mastocitoma cutaneo	
Mastocitosi sistemiche (MS)	
MS midollare*	
MS indolente	
MS <i>smouldering</i>	
MS aggressiva	
MS con associata malattia ematologica**	
Leucemia mastocellulare	
Sarcoma mastocitico	

Tabella 13.2. Criteri diagnostici di Mastocitosi Sistemica (MS)	
Criterio maggiore	
Documentazione di aggregati densi e multifocali di mastociti Triptasi- e/o CD117-positivi (cellule/aggregato) nel midollo osseo o in altre sedi extra-cutanee	
Criteri minori	
1. >25% di mastociti fusati o con morfologia atipica in infiltrati midollari o extra-cutanei 2. Espressione aberrante di CD25, CD30 e/o CD2 in mastociti 3. Documentazione di mutazione D816V o di altre mutazioni attivanti di <i>KIT</i> 4. Livelli sierici di triptasi persistentemente >20 ng/mL	

Nota. Secondo la **Classificazione ICC 2022**, la diagnosi di MS è posta in presenza del solo criterio maggiore oppure di 3 criteri minori. Secondo la **Classificazione WHO 2022**, la diagnosi di MS è posta in presenza del criterio maggiore + 1 criterio minore oppure di 3 criteri minori

13.1 Valutazione citologica/istologica del midollo osseo

Rilievi Clinico-Diagnostici

La valutazione cito-istologica ha un ruolo fondamentale nella diagnosi di mastocitosi sistemica (MS). Tanto il criterio diagnostico maggiore quanto 2 dei criteri diagnostici minori di MS richiedono, infatti, la valutazione microscopica di campioni di midollo osseo o di lesioni extra-cutanee sospette (Tabelle 1 e 2).

In tutti i casi di sospetta MS sono pertanto raccomandate: (i) la valutazione citologica di aspirato midollare; e (ii) l'analisi istologica di biopsia osteomidollare (BOM) o di lesioni extra-midollari/extra-cutanee sospette. Nel caso della mastocitosi cutanea, il ricorso alla valutazione istologica è invece limitato a casi con presentazione clinica inusuale o ambigua (Arber DA et al, 2022; Hauser M et al 2022).

Rilievi Tecnico-Laboratoristici

Esame citologico del midollo osseo

In corso di MS, la valutazione citologica di aspirati midollari contribuisce a (i) identificare mastociti atipici o immaturi; (ii) identificare eventuali alterazioni delle restanti serie emopoietiche, che supportino la diagnosi di MS associata a neoplasia mieloide/ematologica (MS-AMM/AME).

Per la valutazione delle serie emopoietiche e dei mastociti, la colorazione raccomandata è quella di May-Grunwald/Giemsa. L'analisi citologica viene effettuata contando non meno di 500 cellule nucleate, che includano almeno 100 precursori eritroidi, 100 elementi della granulopoiesi e 30 megacariociti (Valent P et al, 2017).

Alla colorazione di May-Grunwald/Giemsa, i mastociti appaiono come cellule con citoplasma ricco di granuli metacromatici. A seconda dello stadio maturativo, la valutazione citologica consente di distinguere: (i) blasti con granuli metacromatici; (ii) promastociti o mastociti atipici di tipo I; e (iii) mastociti atipici di tipo II. La corretta identificazione di tali cellule supporta la distinzione tra leucemia mastocellulare (caratterizzata da >20% di mastociti immaturi nel midollo osseo) e altre forme di malattia.

Esame istologico del midollo osseo e di lesioni extra-midollari

La valutazione istologica delle BOM o di lesioni extra-midollari si effettua su preparati colorati con ematossilina/eosina e (ove disponibile) Giemsa. La valutazione morfologica considera i seguenti parametri: (i) presenza/assenza di aggregati ≥ 15 mastociti; (ii) uni/multifocalità degli aggregati mastocitari; (iii) caratteristiche citologiche dei mastociti; e (iv) percentuale di eventuali mastociti fusati. In caso di BOM, si devono inoltre valutare la maturazione delle serie emopoietiche e l'eventuale presenza/entità di fibrosi midollare (colorazione con impregnazione argentea).

Oltre alla valutazione morfologica, la diagnosi istologica di MS richiede analisi immunoistochimiche che confermino (i) la natura mastocitaria dell'infiltrato (positività per CD117 e, nella maggior parte dei casi, Triptasi) e (ii) documentino eventuali aberrazioni fenotipiche dei mastociti (positività per CD25 e/o CD30 e/o CD2). Ove opportuno, si può inoltre ricorrere a colorazioni aggiuntive per la valutazione delle serie emopoietiche (e.g. CD34, MPO, glicoforina, E-Caderina, CD61, CD42, etc).

La diagnosi di SM può essere impegnativa in casi con scarsa infiltrazione tissutale, con presenza solo di alcuni mastociti interstiziali atipici o nel caso di MS ben differenziate (*i.e.* mastocitosi costituite da mastociti maturi e ovalari). In tali situazioni, una diagnosi definitiva può essere raggiunta solo mediante integrazione con i dati clinici, laboratoristici (*i.e.* livelli sierici di triptasi >20 ng/mL) e molecolari (studio di mutazioni attivanti di *KIT*) (Arber DA et al, 2022; Hauser M et al 2022).

13.2 Valutazione immunofenotipica

Rilievi Clinico-Diagnostici

L'analisi immunofenotipica è impiegata per identificare e quantificare i mastociti nell'aspirato di midollo osseo e per valutare l'eventuale espressione di antigeni aberranti. I marcatori raccomandati per lo studio citofluorimetrico nel work-up diagnostico della MS sono riportati in Tabella 13.3 (Valent P. et al. 2021).

Tabella 13.3. Marcatori citofluorimetrici per la diagnosi di mastocitosi	
Antigeni per identificare i mastociti	CD117+++, CD34-, CD45+
Antigeni aberranti (criterio minore)	CD25+, CD2+, CD30+
Altri antigeni utili per l'identificazione e la caratterizzazione dei mastociti	CD33, CD203c, CD71, HLA-DR, CD123

L'indagine immunofenotipica permette il riconoscimento e la quantificazione degli antigeni aberranti con alti livelli di sensibilità e specificità, anche in presenza di un campione in cui i mastociti sono presenti a bassa frequenza (*Sánchez-Muñoz L et al. 2014*).

Rilievi Tecnico-Laboratoristici

Si prega di fare riferimento a quanto riportato nel paragrafo 4.4 e nelle seguenti fonti bibliografiche: *Sánchez-Muñoz L et al. 2014*.

13.3 Valutazione Genetica

Rilievi Clinico-Diagnostici e Tecnico-Laboratoristici

La mutazione del gene *KIT* D816V è presente in più del 95% delle forme indolenti di MS ed è necessario utilizzare un'analisi molecolare altamente sensibile per poterla rivelare. Attualmente le due metodiche raccomandate sono rappresentate da una PCR allele specifica quantitativa su DNA (ASO-qPCR), e dalla droplet digital PCR (ddPCR) su DNA che raggiungono una sensibilità di circa 0,01% (*Arock M et al, 2015; Hoermann GJ et al, 2022*).

In caso di sospetto diagnostico di MS, la ricerca della mutazione D816V del gene *KIT* può essere condotta come screening su sangue periferico in associazione alla triptasi sierica, tuttavia è da considerare che la triptasi può essere normale nelle MS e che su sangue periferico la ricerca della mutazione risulta negativa nel 20% delle forme indolenti.

A seguito di una positività della mutazione D816V a livello periferico, il test può essere eseguito anche su aspirato midollare a fresco su materiale fissato in formalina e incluso in paraffina, mentre non è possibile eseguire l'analisi mutazionale su materiale decalcificato.

La valutazione su midollo è necessaria con un metodo altamente sensibile nel caso in cui lo screening su sangue periferico sia risultato negativo e ci sia un forte sospetto di MS. Infatti, in circa il 5-10% dei pazienti la ricerca della mutazione di *KIT* D816V può risultare negativa per:

- a) falso negativo dovuto alla bassa rappresentatività dei mastociti, un campione sub-ottimale o la metodica utilizzata non è sufficientemente sensibile;
- b) assenza della mutazione del gene *KIT*;
- c) presenza di una mutazione del gene *KIT* differente dalla D816V (D816H, D816Y) o di mutazioni in altre regioni per le quali non sono disponibili dei saggi altamente sensibili (è necessario ricorrere al sequenziamento di tutta la regione codificante di *KIT* mediante NGS);

Nei casi di negatività per la D816V nelle forme indolenti di MS, si può considerare la ricerca della mutazione anche nelle lesioni cutanee o in altri organi interessati.

Si sottolinea che l'analisi NGS (pannello mieloide) per la ricerca della mutazione D816V o di altre mutazioni nella regione codificante di *KIT* ha una sensibilità nettamente inferiore, circa il 1-5%, rispetto alle due metodiche ASO-qPCR, ddPCR (*Hoermann GJ et al, 2022*).

L'analisi mutazionale dei geni mieloidi mediante NGS trova invece, indicazione nelle forme di MS associate ad una neoplasia mieloide sia a fini diagnostici che prognostici; a tal proposito il gruppo cooperativo EU-US raccomanda la valutazione in particolare di *SRSF2*, *ASXL1* e *RUNX1*, *DNMT3A* e *NRAS* e degli altri geni che frequentemente sono mutati nelle malattie mieloidi.

Il monitoraggio della carica allelica della mutazione D816V è oggetto di crescente interesse e al momento ristretto ai pazienti arruolati in trial clinici (*Hoermann GJ et al, 2022*).

Sempre nelle forme associate a neoplasie mieloidi trova indicazione lo studio del cariotipo (raccomandato), soprattutto per la valutazione delle alterazioni associate a prognosi sfavorevole (Poor-risk karyotype: -7; cariotipo complesso), mentre nei casi con ipereosinofilia è necessario escludere i riarrangiamenti associati alle malattie mieloidi/linfoidi con eosinofilia che coinvolgono i geni *PDGFRA*, *PDGFRB*, *FGFR1* e la fusione *JAK2::PCM1*. Per quest'ultimi è indicata l'analisi FISH in quanto molti di questi riarrangiamenti risultano criptici, più recentemente sono valutabili anche con pannelli NGS per fusioni geniche (*Arber DA et al, 2022*; *Khoury JD et al, 2022*; *Shomali W, et al 2024*; cfr Paragrafo 12.4).

Tabella 13.4. MS: Laboratori di afferenza per gli Hub ematologici della REV						
	AOUN PADOVA	AOUN VERONA	ULSS2 TREVISO	ULSS3 MESTRE- VENEZIA	ULSS8 VICENZA	IOV CFV
Valutazione patologica	X	X	X	X	X	X
Citometria a flusso	X	X	X	X	X	Lab ULSS2

RETE EMATOLOGICA VENETA
LINEE DI INDIRIZZO DIAGNOSTICO TERAPEUTICHE

Rev. N.0
Dicembre
2025

Analisi Citogenetica	Lab IOV PD	X	X	Lab IOV PD	X	Lab ULSS2
Analisi Molecolare diagnosi	Lab IOV PD	X	X	Lab IOV PD	X	Lab ULSS2
NGS	Lab IOV PD	Lab IOV PD	X	Lab IOV PD	X	Lab ULSS2
Analisi molecolare VAF		X			X	

X = presso il proprio laboratorio di competenza

14 Bibliografia

Agathangelidis A, Chatzidimitriou A, Chatzikonstantinou T, et al. Immunoglobulin gene sequence analysis in chronic lymphocytic leukemia: the 2022 update of the recommendations by ERIC, the European Research Initiative on CLL. *Leukemia*. 2022;36(8):1961-1968. doi:10.1038/s41375-022-01604-2

Akkari Y, Baughn LB, Kim A, et al. Section E6.1-6.6 of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) Technical Laboratory Standards: Cytogenomic studies of acquired chromosomal abnormalities in neoplastic blood, bone marrow, and lymph nodes. *Genet Med*. 2024;26(4):101054. doi:10.1016/j.gim.2023.101054

Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms [published correction appears in *Leukemia*. 2023 Sep;37(9):1944-1951. doi: 10.1038/s41375-023-01962-5.]. *Leukemia*. 2022;36(7):1720-1748. doi:10.1038/s41375-022-01620-2

Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-2405. doi:10.1182/blood-2016-03-643544

Arber DA, Orazi A, Hasserjian RP, et al. International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood*. 2022;140(11):1200-1228. doi:10.1182/blood.2022015850

Arock M, Sotlar K, Akin C, et al. KIT mutation analysis in mast cell neoplasms: recommendations of the European Competence Network on Mastocytosis. *Leukemia*. 2015;29(6):1223-1232. doi:10.1038/leu.2015.24

Avet-Loiseau H, San-Miguel J, Casneuf T, et al. Evaluation of Sustained Minimal Residual Disease Negativity With Daratumumab-Combination Regimens in Relapsed and/or Refractory Multiple Myeloma: Analysis of POLLUX and CASTOR. *J Clin Oncol*. 2021;39(10):1139-1149. doi:10.1200/JCO.20.01814

Avet-Loiseau H, Davies FE, Samur MK, et al. International Myeloma Society/International Myeloma Working Group Consensus Recommendations on the Definition of High-Risk Multiple Myeloma. *J Clin Oncol*. 2025;43(24):2739-2751. doi:10.1200/JCO-24-01893

Baliakas P, Espinet B, Mellink C, et al. Cytogenetics in Chronic Lymphocytic Leukemia: ERIC Perspectives and Recommendations. *Hemasphere*. 2022;6(4):e707. Published 2022 Mar 25. doi:10.1097/HS9.0000000000000707

Barosi G. Essential thrombocythemia vs. early/prefibrotic myelofibrosis: why does it matter. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2014;27(2):129-140. doi:10.1016/j.beha.2014.07.004

Bassan VL, Barretto GD, de Almeida FC, et al. Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms display alterations in monocyte subpopulations frequency and immunophenotype. *Med Oncol*. 2022;39(12):223. Published 2022 Sep 29. doi:10.1007/s12032-022-01825-6

Bernard E, Hasserjian RP, Greenberg PL, et al. Molecular taxonomy of myelodysplastic syndromes and its clinical implications. *Blood*. 2024;144(15):1617-1632. doi:10.1182/blood.2023023727

Bernard E, Tuechler H, Greenberg PL, et al. Molecular International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes. *NEJM Evid*. 2022;1(7): EVIDoa2200008. doi:10.1056/EVIDoa2200008

Bersanelli M, Travaglino E, Meggendorfer M, et al. Classification and Personalized Prognostic Assessment on the Basis of Clinical and Genomic Features in Myelodysplastic Syndromes. *J Clin Oncol*. 2021;39(11):1223-1233. doi:10.1200/JCO.20.01659

Bertamini L, Oliva S, Rota-Scalabrini D, et al. High Levels of Circulating Tumor Plasma Cells as a Key Hallmark of Aggressive Disease in Transplant-Eligible Patients With Newly Diagnosed Multiple Myeloma. *J Clin Oncol*. 2022;40(27):3120-3131. doi:10.1200/JCO.21.01393

Böttcher S, Engelmann R, Grigore G, et al. Expert-independent classification of mature B-cell neoplasms using standardized flow cytometry: a multicentric study. *Blood Adv*. 2022;6(3):976-992. doi:10.1182/bloodadvances.2021005725

Caers J, Garderet L, Kortüm KM, et al. European Myeloma Network recommendations on tools for the diagnosis and monitoring of multiple myeloma: what to use and when. *Haematologica*. 2018;103(11):1772-1784. doi:10.3324/haematol.2018.189159

Campo E, Jaffe ES, Cook JR, et al. The International Consensus Classification of Mature Lymphoid Neoplasms: a report from the Clinical Advisory Committee [published correction appears in *Blood*. 2023 Jan 26;141(4):437. doi: 10.1182/blood.2022019016.]. *Blood*. 2022;140(11):1229-1253. doi:10.1182/blood.2022015851

Chan A, Kumar P, Gao Q, et al. Abnormal B-lymphoblasts in myelodysplastic syndromes and myeloproliferative neoplasms other than chronic myeloid leukemia. *Cytometry B Clin Cytom*. 2023;104(3):243-252. doi:10.1002/cyto.b.22047

Chun K, Hagemeijer A, Iqbal A, Slovak ML. Implementation of standardized international karyotype scoring practices is needed to provide uniform and systematic evaluation for patients with myelodysplastic syndrome using IPSS criteria: An International Working Group on MDS Cytogenetics Study. *Leuk Res*. 2010 Feb;34(2):160-5.

Cross NC, White HE, Colomer D, et al. Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2015;29(5):999-1003. doi:10.1038/leu.2015.29

Cross NCP, Ernst T, Branford S, et al. European LeukemiaNet laboratory recommendations for the diagnosis and management of chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2023;37(11):2150-2167. doi:10.1038/s41375-023-02048-y

D'Agostino M, Cairns DA, Lahuerta JJ, et al. Second Revision of the International Staging System (R2-ISS) for Overall Survival in Multiple Myeloma: A European Myeloma Network (EMN) Report Within the HARMONY Project [published correction appears in *J Clin Oncol*. 2022 Dec 1;40(34):4032. doi: 10.1200/JCO.22.02228.]. *J Clin Oncol*. 2022;40(29):3406-3418. doi:10.1200/JCO.21.02614

De Leval L, Alizadeh AA, Bergsagel PL, et al. Genomic profiling for clinical decision making in lymphoid neoplasms. *Blood*. 2022;140(21):2193-2227. doi:10.1182/blood.2022015854

Della Porta MG, Picone C, Pascutto C et al. Multicenter validation of a reproducible flow cytometric score for the diagnosis of low-grade myelodysplastic syndromes: results of a European LeukemiaNET study. *Haematologica* 2012;97:1209-17

Dimopoulos MA, Moreau P, Terpos E, et al. Multiple myeloma: EHA-ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up† [published correction appears in *Ann Oncol*. 2022 Jan;33(1):117. doi:10.1016/j.annonc.2021.10.001.]. *Ann Oncol*. 2021;32(3):309-322. doi:10.1016/j.annonc.2020.11.014

Dispenzieri A, Fajgenbaum DC. Overview of Castleman disease. *Blood*. 2020;135(16):1353-1364. doi:10.1182/blood.2019000931

Döhner H, Wei AH, Appelbaum FR, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood*. 2022;140(12):1345-1377. doi:10.1182/blood.2022016867

Eichhorst B, Robak T, Montserrat E, et al. Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2021;32(1):23-33. doi:10.1016/j.annonc.2020.09.019

Fajgenbaum DC, Uldrick TS, Bagg A, et al. International, evidence-based consensus diagnostic criteria for HHV-8-negative/idiopathic multicentric Castleman disease. *Blood*. 2017;129(12):1646-1657. doi:10.1182/blood-2016-10-746933

Gaidano V, Tenace V, Santoro N, et al. A Clinically Applicable Approach to the Classification of B-Cell Non-Hodgkin Lymphomas with Flow Cytometry and Machine Learning. *Cancers (Basel)*. 2020;12(6):1684. Published 2020 Jun 24. doi:10.3390/cancers12061684

Gajzer DC, Fromm JR. Flow Cytometry for B-Cell Non-Hodgkin and Hodgkin Lymphomas. *Cancers (Basel)*. 2025;17(5):814. Published 2025 Feb 26. doi:10.3390/cancers17050814

Garcés JJ, Cedena MT, Puig N, et al. Circulating Tumor Cells for the Staging of Patients With Newly Diagnosed Transplant-Eligible Multiple Myeloma. *J Clin Oncol*. 2022;40(27):3151-3161. doi:10.1200/JCO.21.01365

Gerds AT, Gotlib J, Ali H, et al. Myeloproliferative Neoplasms, Version 3.2022, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2022;20(9):1033-1062. doi:10.6004/jnccn.2022.0046

Giné E, Martinez A, Villamor N, et al. Expanded and highly active proliferation centers identify a histological subtype of chronic lymphocytic leukemia ("accelerated" chronic lymphocytic leukemia) with aggressive clinical behavior. *Haematologica*. 2010;95(9):1526-1533. doi:10.3324/haematol.2010.022277

Gökbuğut N, Boissel N, Chiaretti S, et al. Diagnosis, prognostic factors, and assessment of ALL in adults: 2024 ELN recommendations from a European expert panel. *Blood*. 2024;143(19):1891-1902.

Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes [published correction appears in *Blood* 1998 Feb 1;91(3):1100]. *Blood*. 1997;89(6):2079-2088.

Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012;120(12):2454-2465. doi:10.1182/blood-2012-03-420489

Gurnari C, Robin M, Godley LA, et al. Germline predisposition traits in allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation for myelodysplastic syndromes: a survey-based study and position paper on behalf of the Chronic Malignancies Working Party of the EBMT. *Lancet Haematol*. 2023;10(12):e994-e1005. doi:10.1016/S2352-3026(23)00265-X

Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood*. 2018;131(25):2745-2760. doi:10.1182/blood-2017-09-806398

Hasserjian RP, Orazi A, Orfao A, Rozman M, Wang SA. The International Consensus Classification of myelodysplastic syndromes and related entities. *Virchows Arch*. 2023;482(1):39-51. doi:10.1007/s00428-022-03417-1

Hastings R, Howell R, Betts D, et al. Guidelines and quality assurance for acquired cytogenetics. A common European framework for quality assessment for banded chromosome studies and molecular cytogenetic investigations of acquired abnormalities. 2013

Heim, S., & Mitelman, F. (Eds.). (2015). *Cancer cytogenetics: Chromosomal and molecular genetic aberrations of tumor cells* (4th ed.). Wiley-Blackwell

Heuser M, Freeman SD, Ossenkoppele GJ, et al. 2021 Update on MRD in acute myeloid leukemia: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood*. 2021 Dec 30;138(26):2753-2767. doi: 10.1182/blood.2021013626. PMID: 34724563; PMCID: PMC8718623.

Hoermann G, Sotlar K, Jawhar M, et al. Standards of Genetic Testing in the Diagnosis and Prognostication of Systemic Mastocytosis in 2022: Recommendations of the EU-US Cooperative Group. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2022;10(8):1953-1963. doi:10.1016/j.jaip.2022.03.001

ISCN 2024 - An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2024). In: Hastings RJ, Moore S, Chia N (eds), (S Karger, Basel 2024)

Jevremovic D, Olteanu H. Flow Cytometry Applications in the Diagnosis of T/NK-Cell Lymphoproliferative Disorders. *Cytometry B Clin Cytom*. 2019;96(2):99-115. doi:10.1002/cyto.b.21768

Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VH, et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia*. 2012;26(9):1986-2010. doi:10.1038/leu.2012.122

Khoury JD, Solary E, Abal O, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia*. 2022;36(7):1703-1719. doi:10.1038/s41375-022-01613-1

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-e346. doi:10.1016/S1470-2045(16)30206-6

Langerak AW, Groenen PJ, Brüggemann M, et al. EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations. *Leukemia.* 2012;26(10):2159-2171. doi:10.1038/leu.2012.246

Lefebvre C, Veronese L, Nadal N, et al. Cytogenetics in the management of mature B-cell non-Hodgkin lymphomas: Guidelines from the Groupe Francophone de Cytogénétique Hematologique (GFCH). *Curr Res Transl Med.* 2023;71(4):103425. doi:10.1016/j.retram.2023.103425

Malcikova J, Pavlova S, Baliakas P, et al. ERIC recommendations for TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia-2024 update. *Leukemia.* 2024;38(7):1455-1468. doi:10.1038/s41375-024-02267-x

Mannelli F, Bencini S, Coltro G, et al. Integration of multiparameter flow cytometry score improves prognostic stratification provided by standard models in primary myelofibrosis. *Am J Hematol.* 2022;97(7):846-855. doi:10.1002/ajh.26548

Morán-Plata FJ, Muñoz-García N, Barrena S, et al. Maturation-Related and Functional-Associated Phenotypic Profile of Tumor T Cells in Mature/Peripheral T-Cell Neoplasms: Association With the Diagnostic Subtype of the Disease. *Lab Invest.* Published online April 25, 2025. doi:10.1016/j.labinv.2025.104180

Munir T, Cairns DA, Bloor A, et al. Chronic Lymphocytic Leukemia Therapy Guided by Measurable Residual Disease. *N Engl J Med.* 2024;390(4):326-337. doi:10.1056/NEJMoa2310063

Nadeu F, Diaz-Navarro A, Delgado J, Puente XS, Campo E. Genomic and Epigenomic Alterations in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Annu Rev Pathol.* 2020;15:149-177. doi:10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032810

National Comprehensive Cancer Network. (2025). NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Hodgkin Lymphoma. Version 2.2025. Retrieved from <https://www.nccn.org/guidelines/guidelines-detail?category=1&id=1439>

Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, et al. Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *J Clin Oncol.* 2015;33(26):2863-2869. doi:10.1200/JCO.2015.61.2267

Peñalver FJ, Sancho JM, de la Fuente A, et al. Guidelines for diagnosis, prevention and management of central nervous system involvement in diffuse large B-cell lymphoma patients by the Spanish Lymphoma Group (GELTAMO). *Haematologica.* 2017;102(2):235-245. doi:10.3324/haematol.2016.149120

Pizzi M, Agostinelli C, Santoro L, et al. Lymph node core needle biopsy for the diagnosis of lymphoproliferative disorders: A word of caution. *Eur J Haematol.* 2021;106(5):737-739. doi:10.1111/ejh.13578

Porwit A, Béné MC, Duetz C, et al. Multiparameter flow cytometry in the evaluation of myelodysplasia: Analytical issues: Recommendations from the European LeukemiaNet/International Myelodysplastic

Syndrome Flow Cytometry Working Group. *Cytometry B Clin Cytom.* 2023;104(1):27-50. doi:10.1002/cyto.b.22108

Rack KA, van den Berg E, Haferlach C, et al. European recommendations and quality assurance for cytogenomic analysis of haematological neoplasms. *Leukemia.* 2019;33(8):1851-1867. doi:10.1038/s41375-019-0378-z

Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2024 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol.* 2024;99(9):1802-1824. doi:10.1002/ajh.27422

Rawstron AC, de Tute RM, Haughton J, Owen RG. Measuring disease levels in myeloma using flow cytometry in combination with other laboratory techniques: Lessons from the past 20 years at the Leeds Haematological Malignancy Diagnostic Service. *Cytometry B Clin Cytom.* 2016;90(1):54-60. doi:10.1002/cyto.b.21271

Roncaglia E, Gaffo E, Calabretto G, et al. Circular RNA signature of aggressive CLL with t(14;19)(q32;q13). An ERIC study. *J Hematol Oncol.* 2025;18(1):74. Published 2025 Jul 22. doi:10.1186/s13045-025-01725-y

Saft L. The role of flow cytometry in the classification of myeloid disorders. *Rolle der Durchflusszytometrie bei der Klassifikation myeloischer Neoplasien. Pathologie (Heidelb).* 2023;44(Suppl 3):164-175. doi:10.1007/s00292-023-01272-8

Sánchez-Muñoz L, Teodosio C, Morgado JM, et al. Flow cytometry in mastocytosis: utility as a diagnostic and prognostic tool. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2014;34(2):297-313. doi:10.1016/j.iac.2014.01.008

Schäfer V, White HE, Gerrard G, et al. Assessment of individual molecular response in chronic myeloid leukemia patients with atypical BCR-ABL1 fusion transcripts: recommendations by the EUTOS cooperative network. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2021;147(10):3081-3089. doi:10.1007/s00432-021-03569-8

Selimoglu-Buet D, Wagner-Ballon O, Saada V, et al. Characteristic repartition of monocyte subsets as a diagnostic signature of chronic myelomonocytic leukemia. *Blood.* 2015;125(23):3618-3626. doi:10.1182/blood-2015-01-620781

Shanmuganathan N, Hughes TP. Accelerated-phase CML: de novo and transformed. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2023;2023(1):459-468. doi:10.1182/hematology.2023000446

Shomali W, Gotlib J. World Health Organization and International Consensus Classification of eosinophilic disorders: 2024 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol.* 2024;99(5):946-968. doi:10.1002/ajh.27287

Tefferi A, Guglielmelli P, Lasho TL, et al. CALR and ASXL1 mutations-based molecular prognostication in primary myelofibrosis: an international study of 570 patients. *Leukemia.* 2014;28(7):1494-1500. doi:10.1038/leu.2014.57

Tefferi A, Guglielmelli P, Lasho TL, et al. MIPSS70+ Version 2.0: Mutation and Karyotype-Enhanced International Prognostic Scoring System for Primary Myelofibrosis. *J Clin Oncol.* 2018;36(17):1769-1770. doi:10.1200/JCO.2018b.78.9867

Tefferi A, Guglielmelli P, Nicolosi M, et al. GIPSS: genetically inspired prognostic scoring system for primary myelofibrosis. *Leukemia*. 2018a;32(7):1631-1642. doi:10.1038/s41375-018-0107-z

Tefferi A. Primary myelofibrosis: 2023 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*. 2023;98(5):801-821. doi:10.1002/ajh.26857

Theunissen P, Mejstrikova E, Sedek L, et al. Standardized flow cytometry for highly sensitive MRD measurements in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2017;129(3):347-357. doi:10.1182/blood-2016-07-726307

Valent P, Akin C, Hartmann K, et al. Updated Diagnostic Criteria and Classification of Mast Cell Disorders: A Consensus Proposal. *Hemasphere*. 2021;5(11):e646. Published 2021 Oct 13. doi:10.1097/HS9.0000000000000646

Valent P, Orazi A, Steensma DP, et al. Proposed minimal diagnostic criteria for myelodysplastic syndromes (MDS) and potential pre-MDS conditions. *Oncotarget*. 2017;8(43):73483-73500. Published 2017 Jul 5. doi:10.18632/oncotarget.19008

Van de Loosdrecht AA, Ireland R, Kern W et al. Rationale for the clinical application of flow cytometry in patients with myelodysplastic syndromes: position paper of an International Consortium and the European LeukemiaNet Working Group. *Leuk Lymphoma* 2013;54:472-5.

Van den Brand M, Möbs M, Otto F, et al. EuroClonality-NGS Recommendations for Evaluation of B-Cell Clonality Analysis by Next-Generation Sequencing: A Structured Approach with the DEPART Algorithm. *J Mol Diagn*. 2023;25(10):729-739. doi:10.1016/j.jmoldx.2023.06.011

van der Velden VHJ, Preijers F, Johansson U, et al. Flow cytometric analysis of myelodysplasia: Pre-analytical and technical issues-Recommendations from the European LeukemiaNet. *Cytometry B Clin Cytom*. 2023;104(1):15-26. doi:10.1002/cyto.b.22046

Van Dongen JJ, Lhermitte L, Böttcher S, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*. 2012;26(9):1908-1975. doi:10.1038/leu.2012.120

Van Rhee F, Oksenhendler E, Srkalovic G, et al. International evidence-based consensus diagnostic and treatment guidelines for unicentric Castleman disease. *Blood Adv*. 2020;4(23):6039-6050. doi:10.1182/bloodadvances.2020003334

Verbeek MWC, Buracchi C, Laqua A, et al. Flow cytometric minimal residual disease assessment in B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia patients treated with CD19-targeted therapies - a EuroFlow study. *Br J Haematol*. 2022;197(1):76-81. doi:10.1111/bjh.17992

Wagner-Ballon O, Bettelheim P, Lauf J, et al. ELN iMDS flow working group validation of the monocyte assay for chronic myelomonocytic leukemia diagnosis by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*. 2023;104(1):66-76. doi:10.1002/cyto.b.22054

Westers TM, Ireland R, Kern W et al. Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: a report from an international consortium and the European LeukemiaNet Working Group. *Leukemia* 2012;26:1730-41

Wierda WG, Brown J, Abramson JS, et al. Chronic Lymphocytic Leukemia/Small Lymphocytic Lymphoma, Version 2.2024, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2024;22(3):175-204. doi:10.6004/jnccn.2024.0018

Wood BL. Acute Myeloid Leukemia Minimal Residual Disease Detection: The Difference from Normal Approach. *Curr Protoc Cytom*. 2020;93(1):e73. doi:10.1002/cpcy.73

15 Modalità di diffusione

Alle Direzioni aziendali, con indicazione alla diffusione interna aziendale con destinatari: tutte le UO coinvolte nel percorso di cura (Dirigenza Medica e Coordinatori infermieristici).

Ai professionisti sanitari che operano in ambito ematologico da parte della segreteria della REV, attraverso la mailing list della REV. Pubblicazione sul sito della REV.

16 Monitoraggio della LIDTR: definizione degli indicatori

- ☐ percentuale di pazienti sottoposti alle indagini di laboratorio consigliate: oltre il 90% dei casi
- ☐ tempo tra l'invio del campione diagnostico e la formulazione del referto: in accordo con quanto identificato nelle specifiche LIDTR per patologia.

17 Verifiche, revisioni, raccolta dati

Per le verifiche e revisioni di quanto riportato negli indicatori sono necessarie figure professionali con competenze certificate, che verifichino l'applicazione effettiva degli standard diagnostici indicati dal gruppo di lavoro. Questa valutazione sarà propedeutica ad un resoconto per singolo centro regionale, nonché alla prescrizione di azioni correttive/preventive nelle situazioni che documentassero scostamenti sostanziali dagli standard diagnostici proposti.

Le non conformità individuate dovranno essere notificate dalla Regione o dagli organi prefissi al centro per mettere in atto le misure correttive idonee. Questo presuppone, prima di avviare qualsiasi attività ispettiva, un periodo di formazione e condivisione delle LIDTR tra tutte le strutture che a qualsiasi titolo prendano in carico pazienti ematologici.

La raccolta dei dati di laboratorio in database condivisi, con notizie epidemiologiche al loro interno, previa autorizzazione locale dei singoli comitati etici e nel rispetto delle regole sulla privacy, rappresenta una priorità per la REV e per il gruppo di lavoro. Questa raccolta, da sottoporre poi a valutazioni statistiche mirate, servirà non solo ad evidenziare l'adeguatezza della diagnostica di laboratorio alle esigenze terapeutiche, ma anche a scopo di ricerca scientifica traslazionale all'interno della REV.

Revisione/aggiornamento della LIDTR: annuale.