

AGGIORNAMENTI IN EMATOLOGIA

FAENZA, Hotel Vittoria | 7 Giugno 2018 |

Responsabile Scientifico Francesco Lanza

Ricerca dei cloni EPN in Romagna

Dr. Giovanni Poletti

Dott.ssa Evita Massari

AUSL Romagna

Laboratorio Pievesestina

UO Patologia Clinica

Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria

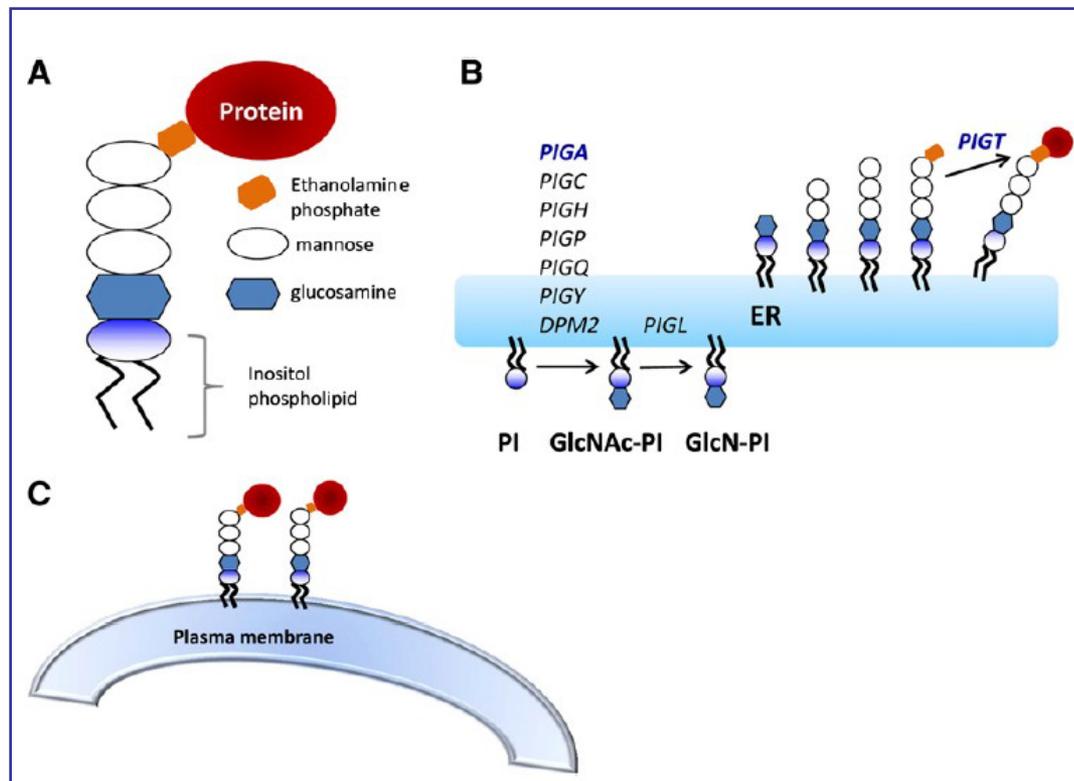
Robert A. Brodsky

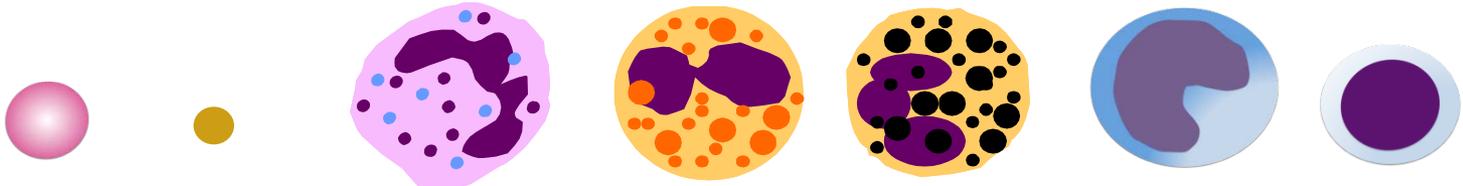
Division of Hematology, Department of Medicine, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD

Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is a rare bone marrow failure disorder that manifests with hemolytic anemia, thrombosis, and peripheral blood cytopenias. The absence of two glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins, CD55 and CD59, leads to uncontrolled complement activation that accounts for hemolysis and other PNH manifestations. GPI anchor protein deficiency is almost

always due to somatic mutations in phosphatidylinositol glycan class A (*PIGA*), a gene involved in the first step of GPI anchor biosynthesis; however, alternative mutations that cause PNH have recently been discovered. In addition, hypomorphic germ-line *PIGA* mutations that do not cause PNH have been shown to be responsible for a condition known as multiple congenital anomalies-hypotonia-

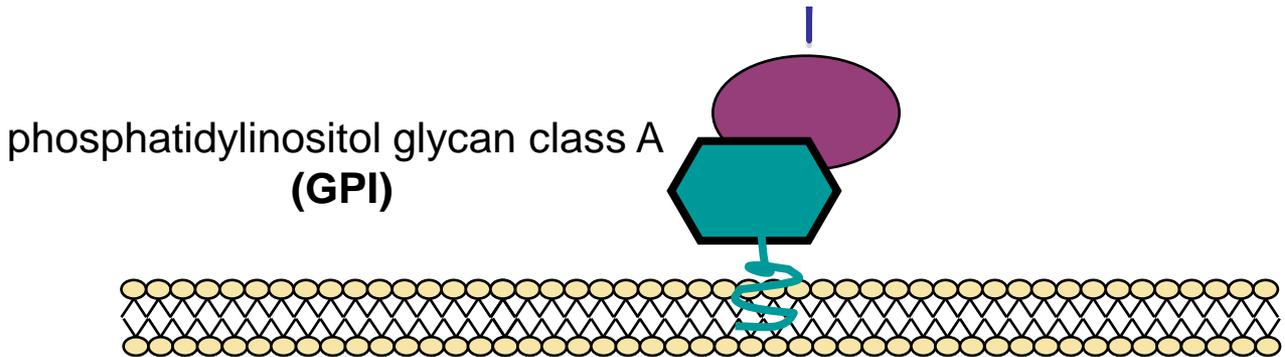
seizures syndrome 2. Eculizumab, a first-in-class monoclonal antibody that inhibits terminal complement, is the treatment of choice for patients with severe manifestations of PNH. Bone marrow transplantation remains the only cure for PNH but should be reserved for patients with suboptimal response to eculizumab. (*Blood*. 2014;124(18):2804-2811)



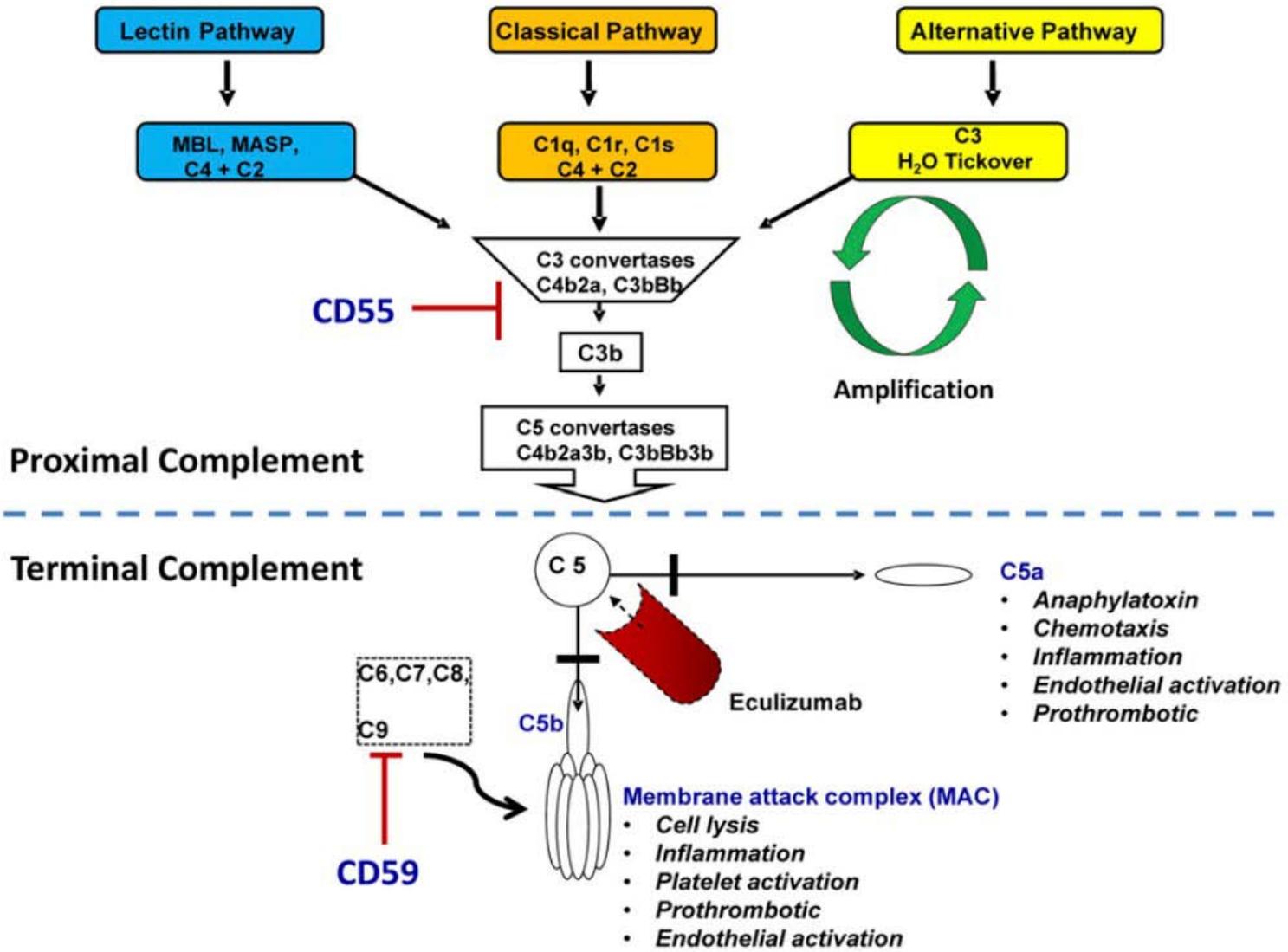


RBC	Plt	Neutrophil	Eosinophil	Basophil	Monocyte	Lymphocyte
AChE	CD55	AlkPh	CD24	CD24	CD14	CD24 (B)
CD55	CD59	CD14	CD55	CD55	CD16	CD52 (T)
CD58	...	CD16	CD58	CD58	CD52	CD55
CD59		CD24	CD59	CD59	CD55	CD58
...		CD55	CD58	CD59
		CD58			CD58	
		CD59			CD59	
		CD66b			CD157	
		CD157			...	

GPI anchored proteins (GPI-AP)



HEMATOPOIESIS



Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria

Charles Parker, Mitsuhiro Omine, Stephen Richards, Jun-ichi Nishimura, Monica Bessler, Russell Ware, Peter Hillmen, Lucio Luzzatto, Neal Young, Taroh Kinoshita, Wendell Rosse, and Gerard Socié, for the International PNH Interest Group

BLOOD, 1 DECEMBER 2005 • VOLUME 106, NUMBER 12

CLASSIC PNH

- Hemolytic Anemia
 - Thrombosis
 - Smooth Muscle Dystonia
- PNH clone > 30%**

PNH in the setting of another bone marrow disorder (AA,MDS)

- Hemolytic Anemia
 - Bone Marrow Failure
- PNH Clone < 10%**

PNH-subclinical in the setting of another bone marrow disorder

- No Clinical or Laboratory evidence of Hemolysis or Thrombosis
- PNH clone < 0.1%**

Table I. International recommendations for PNH testing (Borowitz *et al*, 2010).

Clinical indications for PNH testing	Additional features for testing
Intravascular haemolysis	Haemoglobinuria Elevated plasma haemoglobin
Unexplained haemolysis	Iron deficiency Abdominal pain Oesophageal spasm Cytopenias
Acquired Coombs-negative haemolytic anaemia	
Thrombosis with unusual features	Unusual sites: hepatic, portal, splenic, splanchnic, cerebral, dermal OR Accompanied with: haemolysis or unexplained cytopenia
Bone marrow failure	Suspected or proven aplastic anaemia Myelodysplasia Cytopenia of unknown aetiology

Original Article

ICCS/ESCCA Consensus Guidelines to detect GPI-deficient cells in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria (PNH) and related Disorders

Part 2 – Reagent Selection and Assay Optimization for High-Sensitivity Testing

D. Robert Sutherland^{1*}, Andrea Illingworth², Iuri Marinov³, Fernando Ortiz¹, John Andreasen⁴, Dan Payne⁵, Paul K. Wallace⁶, Michael Keeney⁷

¹University Health Network, Toronto General Hospital, Ontario M5G2C4, Canada

²Dahl-Chase Diagnostic Services in Bangor, Bangor, Maine

³Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic

⁴Diagnostic Flow Cytometry, ARUP Laboratories, Inc, Salt Lake City, Utah

⁵Flow Cytometry Service, Leicester Royal Infirmary UHL NHS Trust, Leicester, United Kingdom

⁶Flow and Image Cytometry, Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, New York

⁷Flow Cytometry London Health Sciences Centre, London, Ontario, Canada

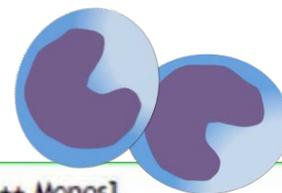
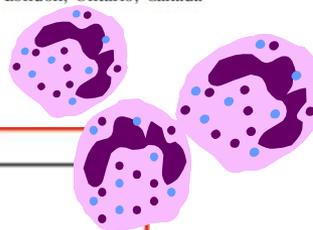
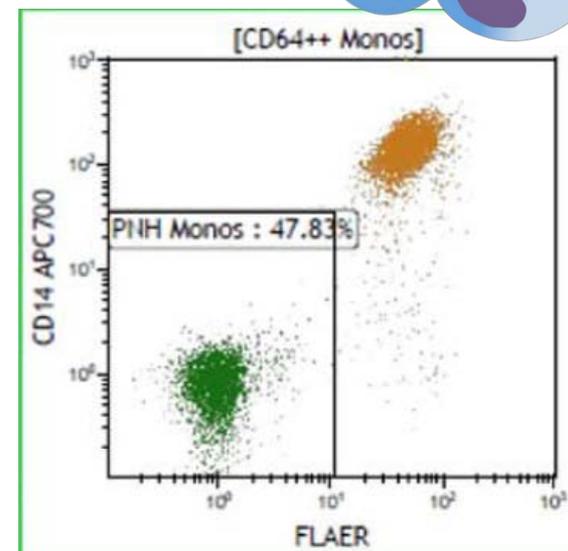
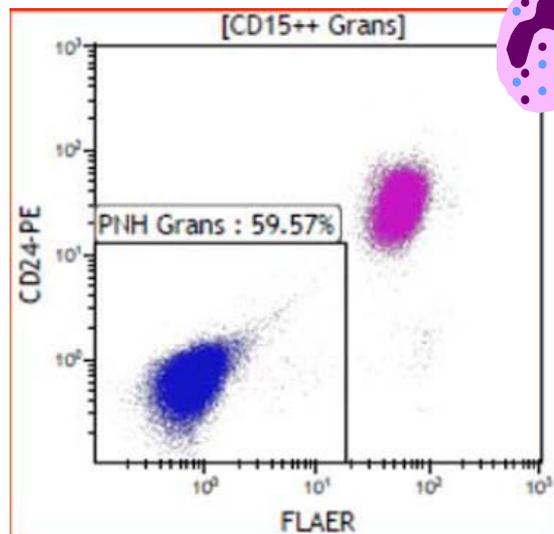
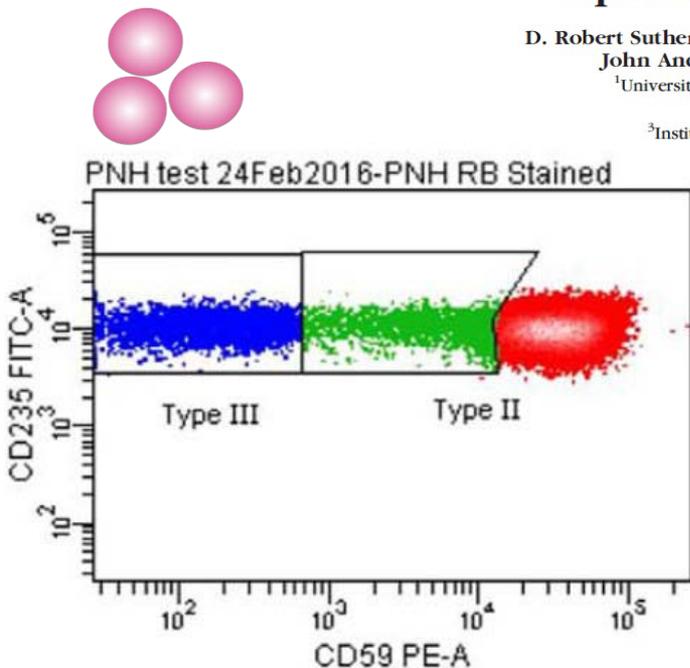


Table 1
Estimated LLOQ and LOD According to the Total Number of Cells Acquired

Total number of gated cells acquired	Quantitative assay using LLOQ (>50 PNH cells) (%)	Qualitative assay using LOD (>20 PNH cells) (%)
10,000	0.5	0.2
20,000	0.25	0.1
30,000	0.17	0.066
40,000	0.125	0.05
50,000	0.1	0.04
100,000	0.05	0.02
200,000	0.025	0.01
300,000	0.017	0.007
400,000	0.0125	0.005
500,000	0.01	0.004
1,000,000	0.005	0.002

Monocytes

Neutrophils

RBC

Level of Detection	Events	Results
LOB: Limit Of Blank	< 20	Not detected
LOD: Limit Of Detection	20-49	Rare cells
LLOQ: Lower Limit Of Quantification	>/= 50	%

Sg-Tipizzazione per ricerca clone EPN

Motivo della richiesta

Anemia aplastica: ricerca cloni EPN

EMAZIE

*Marcatore GPI-Linked: CD59PE
Gates: FS-SS CD45KO CD235aFITC
Sensibilità: 0.01%
Numero eventi acquisiti: 500 000*

NEUTROFILI

*Marcatori GPI-Linked: FLAER-FITC CD157PE
Gates: FS-SS CD45KO CD15PB
Sensibilità: 0.1%
Numero eventi acquisiti: 50 000*

MONOCITI

*Marcatore GPI-Linked: FLAER-FITC CD157PE
Gate: FS-SS CD45KO CD64ECD
Sensibilità: 0.25%
Numero eventi acquisiti: 20 000*

EMAZIE CLONI EPN

CD59: EPN I (normali) = 99.93%; EPN II = 0.00%; EPN III = 0.07%

NEUTROFILI CLONI EPN

*FLAER: EPN I (normali) = 99.3%; EPN II = 0.0%; EPN III = 0.7%
CD157: EPN I (normali) = 99.3%; EPN II = 0.0%; EPN III = 0.7%*

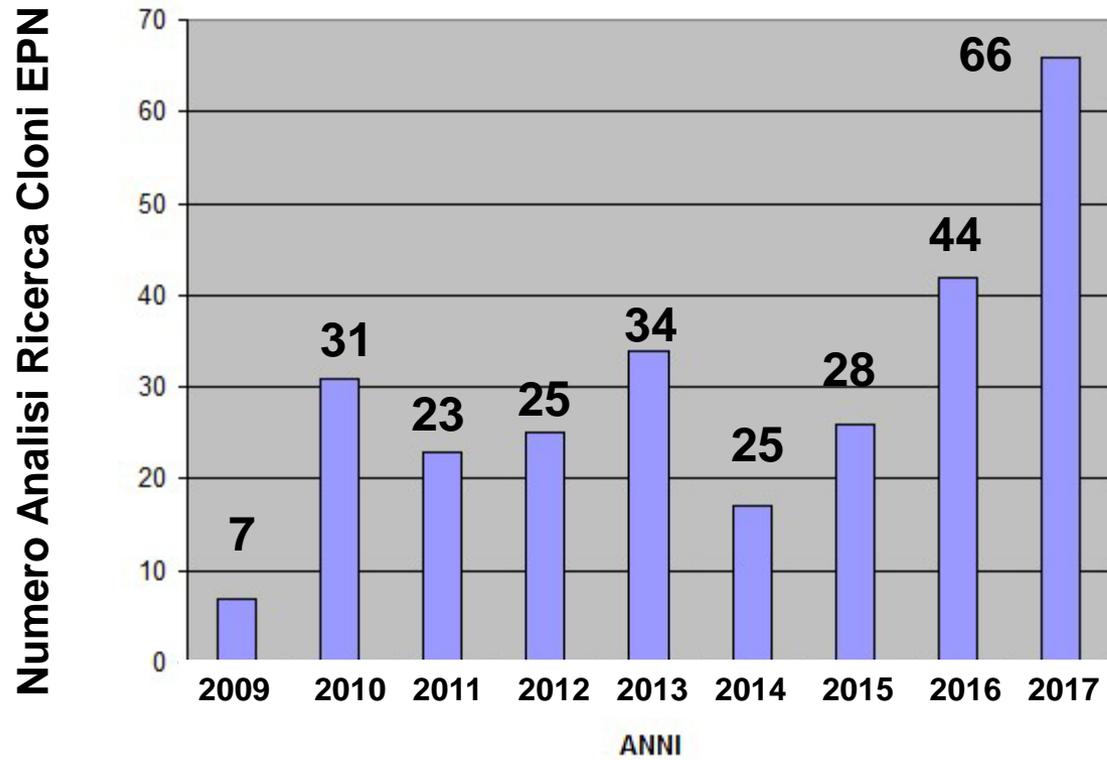
MONOCITI CLONI EPN

*FLAER: EPN I (normali) = 99.5%; EPN II = 0%; EPN III = 0.5%
CD157: EPN I (normali) = 99.5%; EPN II = 0%; EPN III = 0.5%*

CONCLUSIONI

Evidenziato un piccolo clone EPN in RBC, Granulociti e Monociti

AUSL Romagna Laboratorio Pievesestina



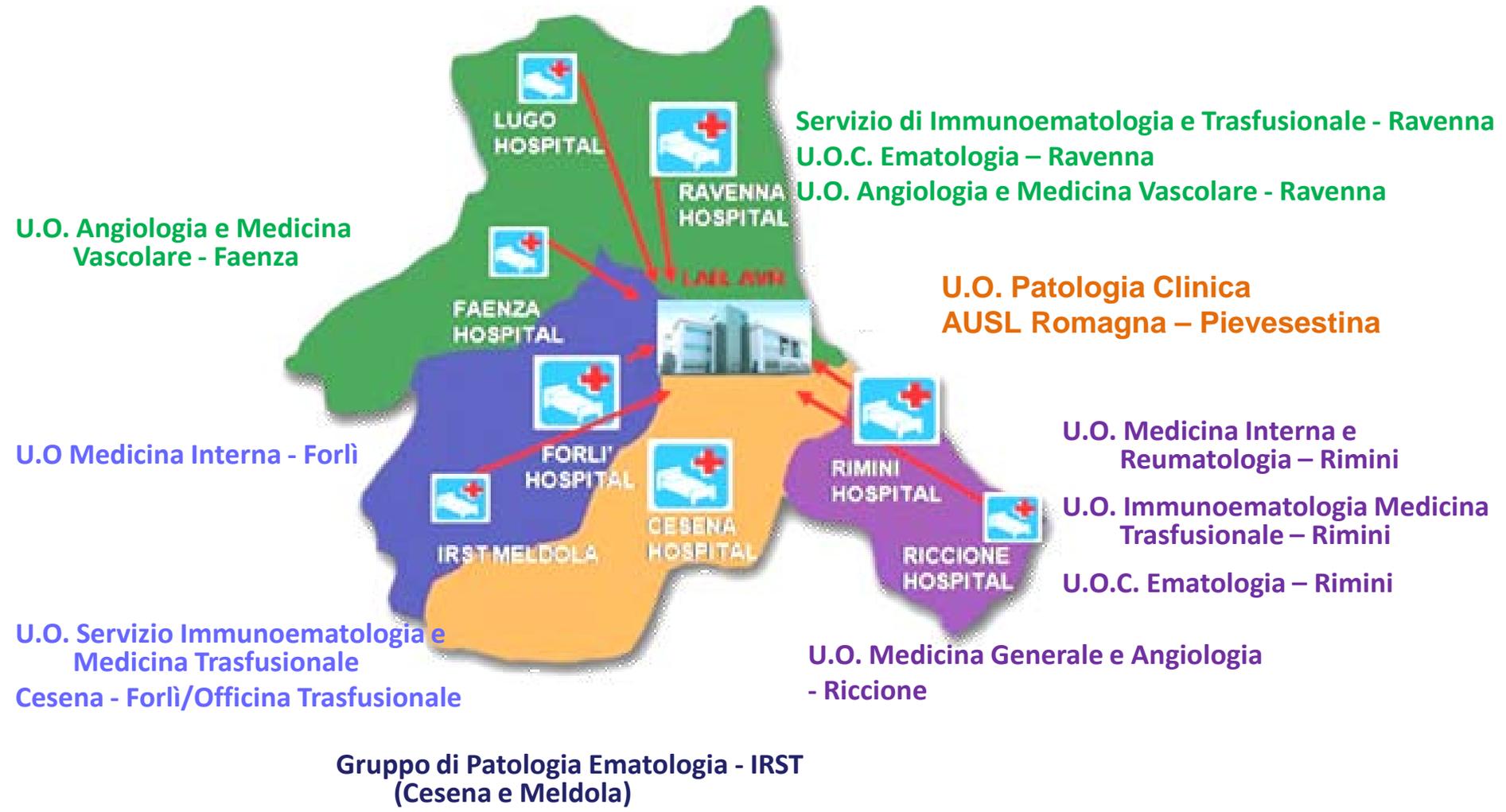
AVR-FLAER

“Progetto di studio di Area Vasta Romagna per lo screening di cloni EPN in pazienti con citopenia di diversa natura (idiopatica, in corso di anemia ipo-plastica o di mielodisplasia a basso grado IPSS), o associata a trombosi venosa idiopatica atipica o citopenia con segni di emolisi intravascolare: studio di validazione di un test rapido in citometria a flusso 3 colori”

Approvazione Comitato Etico 15/02/2017

AVR-FLAER Centri partecipanti

12 centri in AUSL Romagna



AVR-FLAER Criteri di inclusione

Diagnosi di:

- Anemia Aplastica** oppure
- Mielodisplasia a basso rischio** secondo IPSS oppure
- Citopenia Persistente** da almeno 6 mesi valutata con biopsia ossea o aspirato midollare, definita come Hb < 12.5 g/L-uomo o < 11.5 g/L –donna **oppure** WBC < 4000/uL con PMN< 1000/uL oppure
- Segni di emolisi**, definita come LDH> 1.5 x ULN **e/o** aptoglobina ridotta **e/o** reticolocitosi **E** test di COOMBS negativo, in assenza di altre patologie (congenite o acquisite) oppure
- Trombosi Venosa Idiopatica** (confermata da uno dei seguenti esami strumentali: angio-TC, angio-RMN, angiografia), se insorta in una sede atipica (vene profonde addominali, vene cerebrali, vene superficiali del derma) o durante terapia anticoagulante primaria, o durante profilassi anticoagulante secondaria o concomitante a citopenia idiopatica secondo i criteri sopra definiti

AVR-FLAER Obiettivi

OBIETTIVO PRIMARIO

Valutare l'**incidenza**, in AUSL Romagna, dei **cloni EPN** nei diversi sottogruppi di **pazienti a maggior rischio**

OBIETTIVI SECONDARI

1) Correlare i **risultati di laboratorio** (entità del clone eventualmente presente, e tipologia, grado di citopenia, parametri di emolisi intravascolare) con i diversi **quadri clinici** individuati, e fornire **informazioni** riguardo **all'indicazione all'esecuzione routinaria di tale test in patologie differenti** da quelle per cui viene attualmente richiesto

2) Contribuire all' **archivio nazionale Clonoteca EPN** tramite l'inserimento prospettico e retrospettivo di tutti i dati di laboratorio e clinici dei pazienti analizzati

CRITERI DI ESCLUSIONE

Terapia anticoagulante in corso ma scarsa compliance, con INR non mantenuto nel range terapeutico	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No
Impossibilità del paziente a firmare un Consenso informato	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No
Presenza di una condizione che a giudizio dello sperimentatore, possa interferire con la partecipazione spontanea del paziente allo studio osservazionale	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No

STORIA MEDICA

Storia di tromboembolismo venoso (personale o familiare)	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No
Storia di EPN (familiare)	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No
Stato trombofilico (personale o familiare):	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> non noto
Storia o riscontro di NMP Ph neg. o JAK2 mut	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> non noto
Fattori di rischio per trombosi:	
chirurgia recente	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No
trauma	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No
tumore solido	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No
infezione locale o sistemica	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No
malattie infiammatorie	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No
terapia ormonale	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No

A cura del Centro Coordinatore:

Conferma di Registrazione

Si conferma che il paziente

- è eleggibile per lo studio
- non è eleggibile per lo studio per il seguente motivo:

Data di registrazione |_|_|_|_|_|_|_|_|_|_| firma _____

d d m m y y y y

**PROTOCOLLO
AVR-FLAER**

**TARGET ARRUOLAMENTO:
200 PAZIENTI IN 24 MESI**

- 46 pazienti **SCREENATI**, 43 **ARRUOLATI** (marzo 2017 - oggi)
 - 19 pazienti da UOC Ematologia Ravenna (cod. 01)
 - 1 paziente da UO Angiologia e Medicina Vascolare Faenza (cod. 06)
 - 17 pazienti da UOC Ematologia Rimini (cod. 07),
di cui 3 non eleggibili
 - 4 pazienti da Ematologia IRST Meldola (cod. 08)
 - 4 pazienti da Ematologia IRST Cesena (cod. 09)
 - 1 paziente da UO Medicina Interna Faenza (cod. 10)
- 14 pazienti **POSITIVI** per presenza clone EPN:
 - 4 prospettici (di cui 1 in attesa di arruolamento)
 - 10 retrospettivi

Aggiornato al 06/06/2018

- **2 pazienti prospettici IN ATTESA di arruolamento**
(Ematologia RA, neg e IRST Meldola, pos)

20 pazienti tipizzati per ricerca cloni EPN ma non inseriti in protocollo

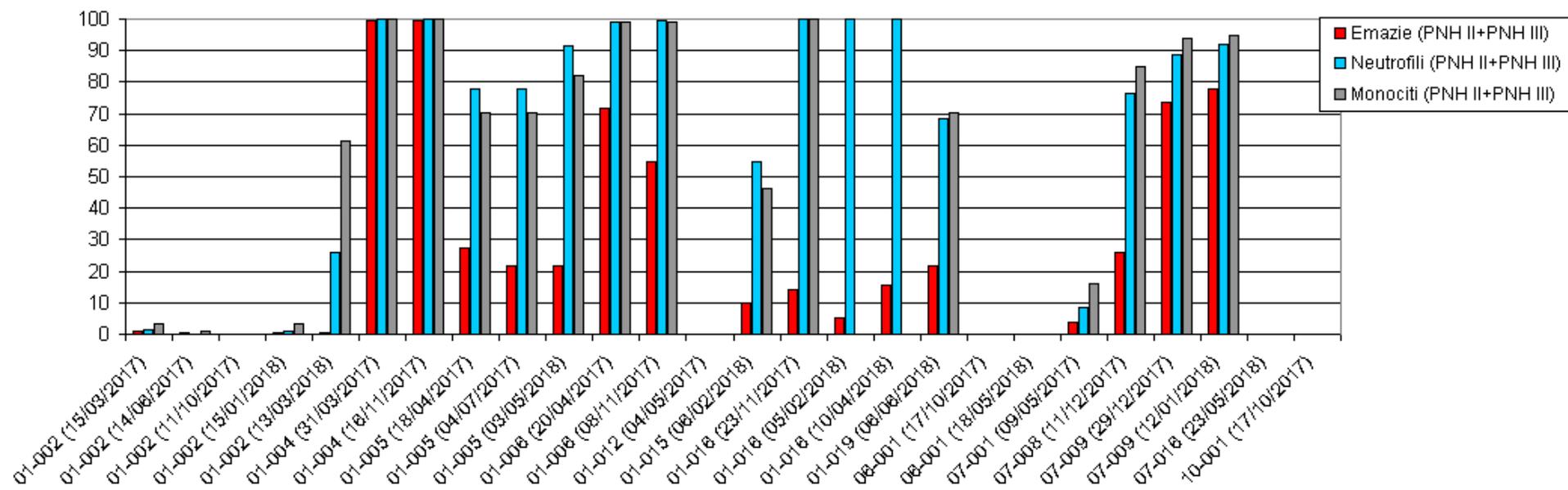
AVR-FLAER

Distribuzione per criteri di inclusione

PREGRESSA EPN	10	14%
ANEMIA APLASTICA	5	7%
MDS BASSO RISCHIO	12	17%
CITOPENIA PERSISTENTE	21	29%
SEGNI EMOLISI	16	22%
TROMBOSI VENOSA IDIOPATICA	9	13%

Aggiornato al 06/06/2018

PAZIENTI AVR-FLAER POSITIVI PER PRESENZA CLONE EPN



Aggiornato al 06/06/2018

STUDIO DI PREVALENZA DEI CLONI EPN IN PAZIENTI CON NEOPLASIE MIELOPROLIFERATIVE PHILADELPHIA-NEGATIVE

- 1. UOC Ematologia Ospedale S. Maria delle Croci Ravenna (centro coordinatore)**
 2. UOC Ematologia Ospedale Infermi - **Rimini**
 3. UO di Ematologia IRST IRCCS - **Meldola Forlì**
 4. UO Ematologia Azienda Ospedaliero Universitaria Integrata - **Verona**
 5. UO Ematologia Azienda Ospedaliero Universitaria - **Siena**
 6. Azienda Ospedaliero Universitaria - **Udine**
 7. Ospedale “S. Bortolo” - **Vicenza**
 8. Azienda Ospedaliero Universitaria - **Padova**
- Laboratorio Unico Pievesestina (Lab Citometria)
 - Laboratorio Bioscienze IRST IRCCS Meldola
 - Laboratori di Siena, Verona, Vicenza, Padova e Udine

STUDIO MyeloPNH

RAZIONALE

- **La trombosi ha un frequente riscontro** sia nei soggetti con EPN che con MPN
- **L'identificazione di un clone EPN** nel contesto di una MPN **verosimilmente aumenta il rischio trombotico**, specie se associata alla mutazione di JAK2

OBIETTIVI

principale:

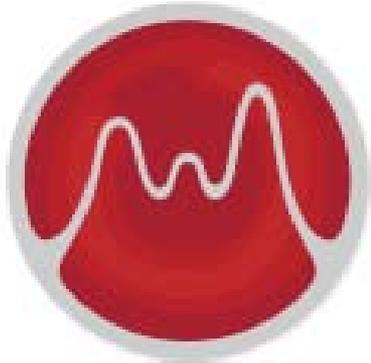
- valutare la **prevalenza dei cloni EPN** nei pazienti con **diagnosi accertata di MPN Ph-** con o senza mutazioni a carico dei 3 principali geni (JAK2, MPL, e Cal-R), ma con **emolisi e/o trombosi**

secondari:

- correlare le caratteristiche del clone EPN con le caratteristiche cliniche e di laboratorio delle MPN Ph-
- caratterizzare l'architettura genomica mediante tecnologia NGS dei casi risultati positivi

Analisi citometrica cloni EPN Duraclone (atc liofilizzati): standardizzazione del metodo condivisione protocollo

WBC	FLAER	CD157	CD64	CD15	CD45
Strumentazione Beckman Coulter	Alexa-488 FITC	PE	PC7	APC	5 canale
Strumentazione Beckton Dickinson	Alexa-488 FITC	PE	PC7	APC	5 canale



Clonoteca EPN

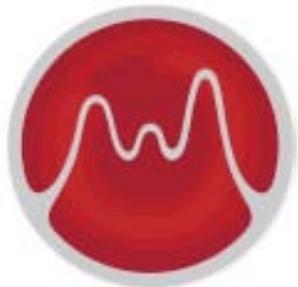
AUSL ROMAGNA
LABORATORIO UNICO
PIEVESESTINA

- 287 analisi **inserite**, corrispondenti a 239 pazienti (2009-oggi)
- 68 analisi **positive** per la presenza del clone EPN, corrispondenti a 23 pazienti
- 12 presidi ospedalieri di provenienza

Aggiornato al 06/06/2018

Provenienza campioni per tipizzazione clone EPN (2009-oggi)

RAVENNA OSPEDALE S. MARIA DELLE CROCI	86
RIMINI OSPEDALE INFERMI	73
MELDOLA IRST	32
FORLI' OSPEDALE PIERANTONI	30
CESENA OSPEDALE BUFALINI	29
FAENZA OSPEDALE DEGLI INFERMI	16
LUGO OSPEDALE UMBERTO I	7
BOLOGNA POLICLINICO S. ORSOLA MALPIGHI	6
RICCIONE OSPEDALE CECCARINI	3
CATTOLICA OSPEDALE CERVESI	2
IMOLA OSPEDALE NUOVO	2
SANTARCANGELO DI ROMAGNA OSPEDALE CIVILE	1



Clonoteca EPN



Riassunto attività per regione

Lab Pievesestina

48% delle analisi per ricerca cloni EPN in Emilia Romagna

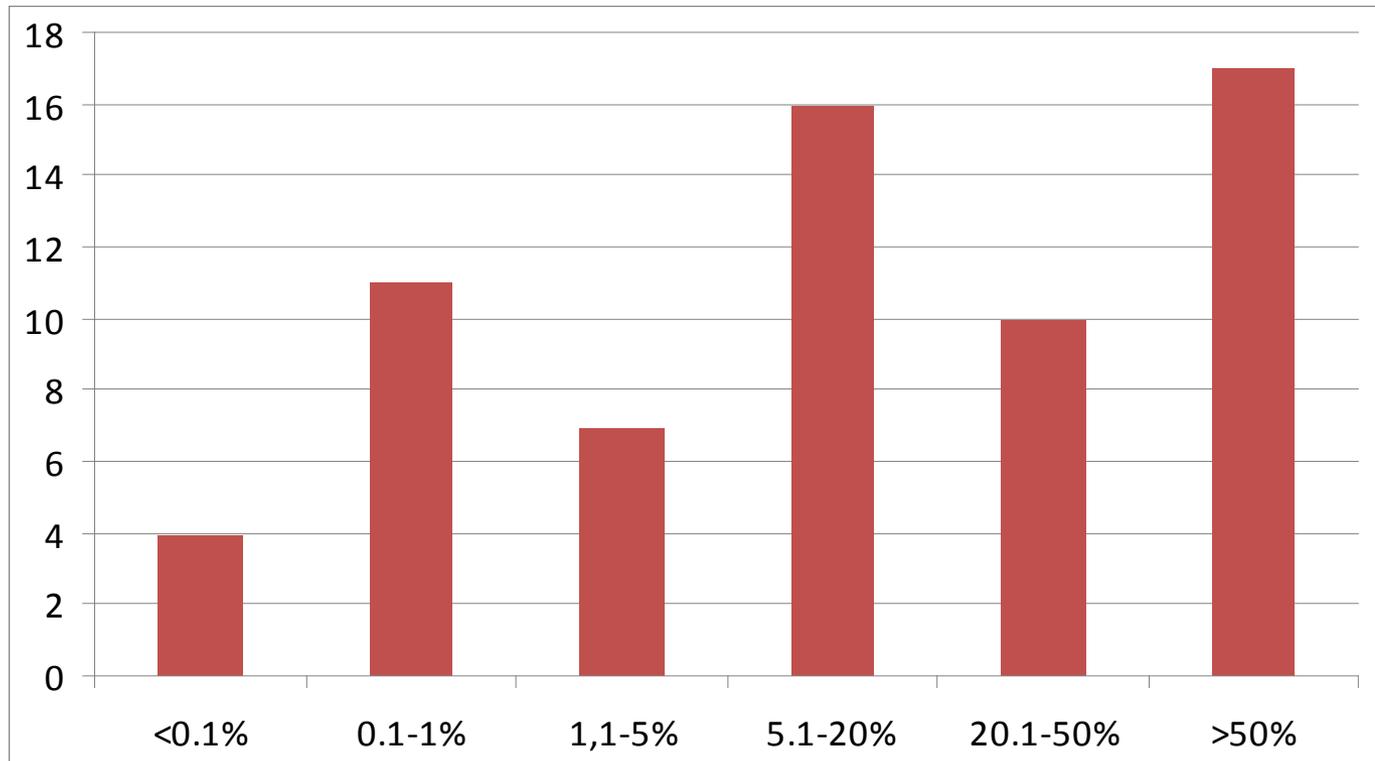
0/0 N. analisi / N. centri con inserimenti negli ultimi 12 mesi

Distribuzione su Reason for Testing (2009-oggi)

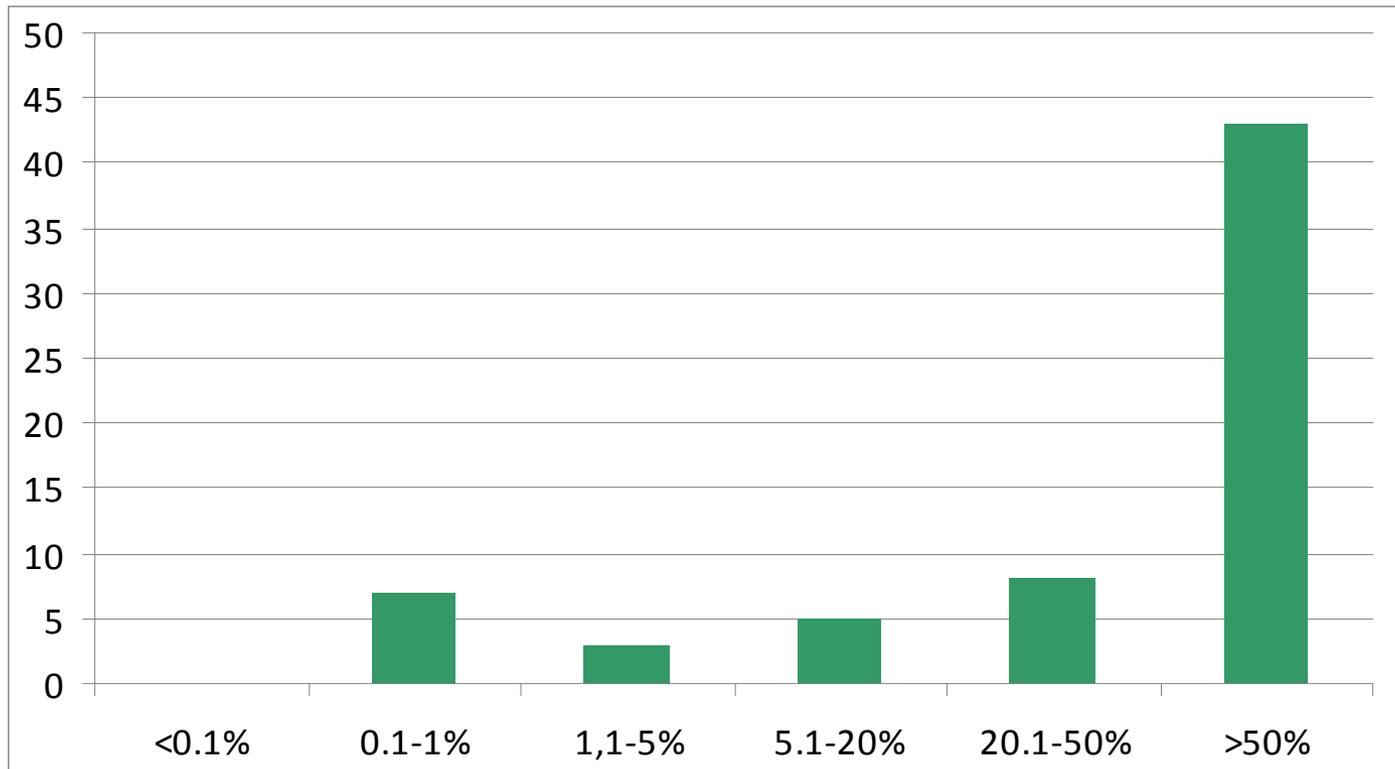
RFT	Analisi richieste	Cloni + RI-TEST	% RFT
Citopenia Idiopatica	30	2	9,93
Sindrome Mielodisplastica	22	6	7,28
Emoglobinuria	10	10	3,31
Anemia Emolitica	68	15	22,52
Insufficienza Midollare	7	0	2,32
Anemia Aplastica	25	15	8,28
Trombosi Ven. / Art. Atipica	35	3	11,59
Non dichiarato	51	3	16,89
Sclerosi Multipla	0	0	0
Altro	54	16	17,88

Aggiornato al 05/06/2018

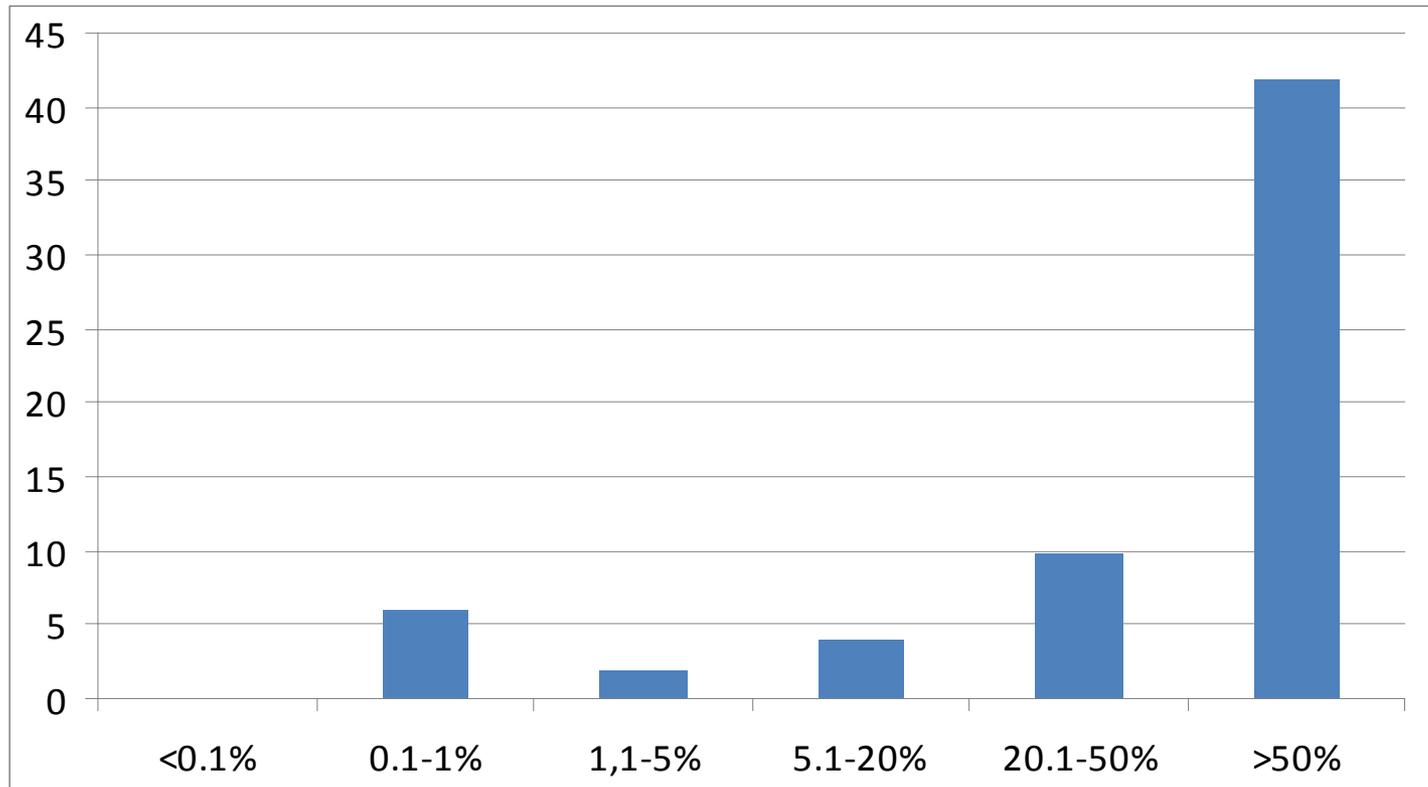
Distribuzione cloni EPN - Emazie



Distribuzione cloni EPN - Neutrofili



Distribuzione cloni EPN - Monociti



SEGNALAZIONI CLONOTECA

Dicembre 2017 – Maggio 2018

31 pazienti EPN+ non eseguono follow up
citofluorimetrico da almeno 6 mesi



inviata mail di segnalazione ai PI



3 pazienti segnalati sono stati rivalutati ed inseriti
in protocollo AVR-FLAER

Emoglobinuria Parossistica Notturna: STUDIO AVR FLAER

Newsletter Settembre 2017

PROGETTO AUSL ROMAGNA PER LO SCREENING DI CLONI EPN IN PAZIENTI CON CITOPENIA DI DIVERSA NATURA (IDIOPATICA, IN CORSO DI ANEMIA IPO-PLASTICA O DI MIELODISPLASIA A BASSO GRADO IPSS), O ASSOCIATA A TROMBOSI VENOSA IDIOPATICA ATIPICA O CITOPENIA CON SEGNI DI EMOLISI INTRAVASCOLARE:

STUDIO DI VALIDAZIONE DI UN TEST RAPIDO IN CITOMETRIA A FLUSSO 3 COLORI



Chief Investigator:

Dr. Lanza

Centro coordinatore:

Centro Servizi Pievesestina

Dr. Giovanni Poletti

Dr. Franco Monti



Sommario:

- × Lo studio
- × Stato di avanzamento
- × Contatti

× Lo studio

Disegno dello studio: Studio osservazionale multicentrico, prospettico e retrospettivo, volto a valutare l'incidenza della presenza di cloni EPN nei pazienti della AUSL Romagna mediante utilizzo di test diagnostico citofluorimetrico eseguito su sangue periferico

Target di arruolamento: 200 pazienti

Durata prevista: 2 anni

Primario: Valutare l'incidenza in Romagna della presenza del clone EPN nei diversi sottogruppi di pazienti che secondo le recenti segnalazioni di letteratura si sono dimostrati a maggior rischio.

Secondari:

•Correlare i risultati di laboratorio ottenuti (entità e tipologia del clone eventualmente presente, grado di citopenia, parametri di emolisi intravascolare) con i diversi quadri clinici individuati e fornire a livello locale informazioni riguardo alla indicazione routinaria di tale test in patologie differenti da quelle per cui viene attualmente richiesto.

•Contribuire al nuovo archivio nazionale EPN tramite l'inserimento prospettico e retrospettivo di tutti i dati di laboratorio e clinici dei pazienti analizzati.



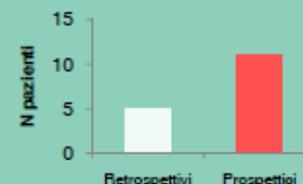
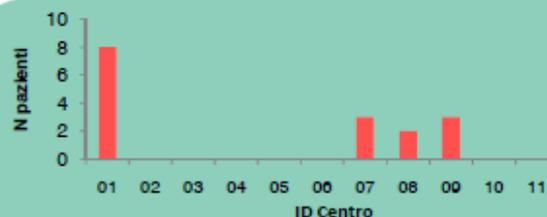
- Lo studio ha ricevuto il parere favorevole del CEIIAV il 15.02.2017.
- 11 centri attivi in AVR dal 02.03.2017

Emoglobinuria Parossistica Notturna: STUDIO AVR FLAER

*Stato di avanzamento
Centri attivi

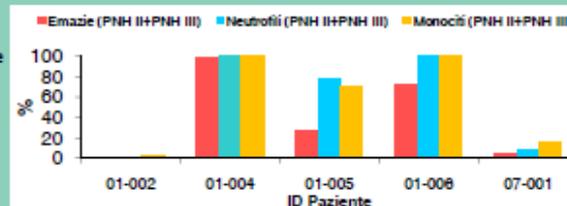
ID	PI	U.O.	Istituto
01	Dott.ssa Rondoni	U.O.C. Ematologia	Ospedale santa Maria delle Croci, Ravenna
02	Dott.ssa Agostini	U.O. Servizio Immunoematologia e Medicina Trastfusionale Cesena- Forlì /Officina Trastfusionale	Ospedale M. Butalini, Cesena Centro Servizi Pievesestina
03	Dr. Mascella	U.O. Medicina Interna e Reumatologia	Ospedale Infermi, Rimini
04	Dott.ssa Tassi	U.O. Immunoematologia Medicina Trastfusionale	Ospedale Infermi, Rimini
05	Dott.ssa Macchi	Servizio di Immunoematologia e Trastfusionale	Ospedale santa Maria delle Croci, Ravenna
06	Dr. Bucherini	U.O. Angiologia e Medicina Vascolare	Ospedale Infermi, Faenza
07	Dr. Rotondo	U.O.C. Ematologia	Ospedale Infermi, Rimini
08	Dott.ssa Giannini	Ematologia	IRST IRCCS, Meldola
09	Dott.ssa Liardo	Ematologia	IRST IRCCS, Cesena
10	Dr. Savini	U.O. Medicina Interna	Ospedale Infermi, Faenza
11	Dr. Nizzoli	U.O. Medicina Interna	Ospedale Morgagni Pierantoni, Forlì

17 pazienti screenati e 16 arruolati da Marzo 2017 ad Agosto 2017



5 pazienti retrospettivi confermati positivi per presenza clone EPN

- 2 pazienti con clone >50%
- 1 paziente con clone tra 20 e 50% per emazie e >50% per neutrofili e monociti
- 1 paziente con clone tra 1 e 5% per emazie e tra 5 e 20% per neutrofili e monociti
- 1 paziente con clone tra 1 e 5%



Vi ringraziamo per la collaborazione e Vi invitiamo a mantenere un costante impegno nella segnalazione di nuovi pazienti.

*Contatti



Grazie per l'attenzione