

## **RELAZIONE FINALE DEL PROGETTO DI RICERCA: STUDIO RETROSPETTIVO DELL'APPLICAZIONE DELLO "SCORE" CITOFLUORIMETRICO DI OGATA ALL'ANALISI DEGLI ASPIRATI MIDOLLARI PER LA DIAGNOSI DI MIELODISPLASIA.**

Le mielodisplasie (MDS) sono un gruppo molto eterogeneo di neoplasie ematologiche sia dal punto di vista clinico sia da quello diagnostico e laboratoristico, sono caratterizzate da alterazioni più o meno marcate della maturazione di una o più linee emopoietiche, alterazioni che all'esordio della malattia possono essere di difficile valutazione o addirittura inapparenti, mentre nella fase terminale della malattia acquisiscono i caratteri delle leucemie acute mieloidi. La diagnosi delle MDS è tutt'ora fondata principalmente sull'analisi morfologica (citologica e istologica) del midollo osseo (striscio di aspirato midollare e biopsia osteo midollare), nella quale si valutano le alterazioni citologiche delle cellule midollari e architetturali del tessuto midollare nel suo insieme. Le reazioni citochimiche e immunoistochimiche volte ad esempio all'identificazione e al conteggio dei sideroblasti ad anello, del grado di fibrosi midollare o delle cellule con assetto blastico (CD34 e CD117) sono utili indagini complementari, che in taluni casi consentono una diagnosi circostanziata. La citofluorimetria, al contrario, pur essendo in grado di fornire informazioni estremamente articolate e precise (possibilità di analisi multiparametriche, di isolamento delle popolazioni di interesse e di valutazioni su centinaia di migliaia di cellule) nel caso delle MDS e in particolare delle MDS a basso rischio, è solo relativamente utile proprio per le caratteristiche intrinseche alle MDS, ossia la mancanza di marcatori specifici per i diversi tipi di MDS, fatta salva la conta delle cellule CD34+ (e CD117+) che d'altra parte può essere inficiata da una cattiva qualità del prelievo. L'uso più esteso della citofluorimetria nella diagnostica delle MDS non si discosta sostanzialmente dalle valutazioni di tipo morfologico, nel senso che si valutano i "pattern" di espressione di due o più marcatori, generalmente combinati per analizzare l'evoluzione maturativa delle serie granulocitopoietica o monocitopoietica, in rapporto ai "pattern" considerati di riferimento e osservati in campioni di aspirati midollari normali. È evidente che questo tipo di valutazione è influenzato non soltanto alla conoscenza ed esperienza dell'operatore, ma anche da tutta una serie di fattori esterni all'operatore (qualità del prelievo, dei reagenti e degli strumenti) che possono dar origine ad artefatti. Per ovviare a questi limiti sono stati proposti diversi approcci che rendono "oggettivabile" l'analisi e che generalmente si esprimono attraverso dei valori numerici o derivati direttamente dall'analisi o derivati dall'attribuzione di scores a determinati valori ottenibili in modo standardizzato. Tra questi sistemi lo "score di Ogata" è uno dei più interessanti dal momento che è costituito da soli quattro valori di cui tre derivati da rapporti numerici (che possono correggere eventuali errori di tipo tecnico-strumentale), inoltre non richiede di utilizzare marcatori particolari o "estranei" a quelli normalmente impiegati nell'analisi citofluorimetrica degli aspirati midollari.

I quattro parametri che vengono determinati sono:

1. il valore percentuale delle cellule CD34+ sul totale delle cellule nucleate
2. il valore percentuale di precursori CD34+ di linea B linfocitaria in rapporto al valore percentuale di cellule CD34 totali

3. il rapporto tra l'intensità di fluorescenza del CD45 sui linfociti e sui mieloblasti (CD34+)

4. il rapporto tra il valore di side scatter delle cellule granulocitopoietiche e dei linfociti.

Ciascuno di questi valori nei campioni di aspirato midollare normale è relativamente riproducibile e comunque rientra in un range sufficientemente ristretto, mentre nel caso delle MDS, alcuni di questi valori sono alterati.

In un studio del 2012 Della Porta et al dimostravano che uno score di Ogata pari o superiore al valore di 2 correlava significativamente con il rischio di MDS, e che l'applicazione sistematica di tale score, soprattutto nei casi di citopenie in cui l'analisi morfologica risultava non discriminante, aumentava la specificità diagnostica dal 50 al 90%.

Nel presente progetto di studio, di tipo retrospettivo, si intende raccogliere la consecutiva e indipendentemente dal sospetto clinico e dalla diagnosi finale di tutti gli aspirati midollari analizzati in citofluorimetria e su cui è stato applicato lo score di Ogata a partire dal 2014 sino al 2018 e verificare l'efficacia di questo approccio per predire l'esistenza di un disordine mielodisplastico.

## RISULTATI

**Tabella 1- Casistica generale**

Diagnosi istologica	Numero casi	%
Midolli non patologici	228	33,9
Midolli con iperplasia	70	10,4
LLC/LNH/HD	118	17,6
Mielomi	66	9,8
Diseritropoiesi/Dismielopoiesi	60	8,9
MDS	35	5,2
Mieloproliferative	56	8,3
LMMC	8	1,2
LAM	30	4,5
Totale	671	
Senza diagnosi istologica	Numero casi	%
MRD LAM/LAL	113	14,4
Totale generale	784	

**Tabella 2- Midolli "non patologici" e con neoplasie linfoproliferative croniche**

Diagnosi istologica	Num. casi	Score 0	Score 1	Score 2	Score 3	Score 4
Midolli non patologici	228	159	55	9	5	0
Midolli con iperplasia	70	53	14	3	0	0
Totale	298	212 (71,1%)	69 (23,1%)	12 (4%)	5 (1,7%)	0
<b>Specificità</b>	<b>94,2%</b>					
LLC/LNH/HD	118	66	41	9	2	0
Mielomi	66	37	23	4	2	0

Totale	184	103 (56%)	64 (34,8%)	13 (7%)	4 (2,2%)	0
<b>Specificità</b>	<b>90,8%</b>					
Totale	482	315 (65,3%)	133 (27,6%)	25 (5,2%)	9 (1,9%)	0
<b>Specificità</b>	<b>92,9%</b>					

**Tabella 3- Midolli con alterazioni della serie mieloide e/o eritroide**

Diagnosi istologica	Numero casi	Score 0	Score 1	Score 2	Score 3	Score 4
Diseritropoiesi/ Dismielopoiesi	60	23 (38,3%)	20 (33,3%)	11 (18,3%)	5 (8,3%)	1 (1,7%)
<b>Negativi</b>	<b>71,7%</b>					
<b>Positivi</b>	<b>28,3%</b>					
Mieloproliferative	56	25 (44,6%)	17 (30,4%)	10 (17,9%)	4 (7,1%)	0
<b>Negativi</b>	<b>75%</b>					
<b>Positivi</b>	<b>25%</b>					
LMMC	8	0	1 (12,5%)	3 (37,5%)	2 (25%)	2 (25%)
<b>Negativi</b>	<b>12,5%</b>					
<b>Positivi</b>	<b>87,5%</b>					
LAM	30	3 (10%)	3 (10%)	14 (46,6%)	8 (26,7%)	2 (6,7%)
<b>Negativi</b>	<b>20%</b>					
<b>Positivi</b>	<b>80%</b>					

**Tabella 4- Midolli con MDS**

Diagnosi istologica	Num. casi	Score 0	Score 1	Score 2	Score 3	Score 4
MDS	35	3 (8,6%)	4 (11,4%)	16 (45,7%)	10 (28,6%)	2 (5,7%)
		2 MDS sld (AR) 1 MDS mld	4 MDS sld (AR)	4 MDS sld (AR) 7 MDS mld 5 MDS eb	1 MDS sld (AR) 7 MDS mld 2 MDS eb	1 MDS sld (AR) 1 MDS mld
<b>Sensibilità</b>	<b>80,0%</b>					

**Tabella 5- Frequenza percentuale parametri Ogata Score**

	Midolli non	Iperplasi e (70)	MPL (56)	Diseri-dismielo	MDS (35)	LAM (70)	LNH (118)	LMMC (8)	MM (66)
--	-------------	------------------	----------	-----------------	----------	----------	-----------	----------	---------

	patologici (228)			(60)					
MB	9 (3.9%)	3 (4.3%)	9 (16%)	7 (11.7%)	21 (60%)	18 (25.7%)	3 (2.5%)	4 (50%)	3 (4.5%)
RATIO %LB/ %MB	40 (17.5%)	11 (16%)	23 (4.1%)	24 (40%)	29 (83%)	17 (24.3%)	20 (16.9%)	7 (87.5%)	18 (27.3%)
RATIO CD45L/ CD45MB	20 (8.8%)	4 (5.7%)	6 (11%)	12 (20%)	10 (29%)	16 (22.8%)	26 (22%)	4 (50%)	6 (9.1%)
RATIO SSC G/L	19 (8.3%)	2 (2.9%)	11 (20%)	18 (30%)	14 (40%)	12 (17.1%)	16 (13.6%)	6 (75%)	10 (15.2%)

## CONCLUSIONI

Nelle MDS la citofluorimetria multiparametrica permette di identificare numerose anomalie fenotipiche in diversi lineage cellulari, anche se molte informazioni derivanti da questa tecnica vengono interpretate soggettivamente.

Gli scoring system proposti presentano vantaggi e svantaggi e in molti casi non sono applicabili alla routine. Lo score di Ogata, di contro, è tra i più semplici, si basa su un numero minimo di parametri, è oggettivo e calcolabile con sistemi semiautomatici.

La sensibilità e la specificità di questo score sono riproducibili in casistiche ottenute dalla routine clinica. Sono però da indagare i casi "border line" sia per l'impatto clinico, sia per verificare la predittività dello score di Ogata eventualmente associato ad altri parametri.