



PSDTA Mieloma Multiplo

Allegato 1 : Analisi citofluorimetrica alla diagnosi di mieloma multiplo

**A cura del Gruppo di Studio Mieloma Multiplo
Rete Oncologica Piemonte e Valle d'Aosta**

**Anno di pubblicazione 2022
Anno di revisione 2025**

L'esame citofluorimetrico viene eseguito per tutti i pazienti con riscontro di nuova diagnosi di Mieloma Multiplo (asintomatico e sintomatico) indipendentemente dall'età, su campione di sangue midollare per determinare la presenza dei marcatori di malattia, e nei pazienti alla recidiva di malattia a giudizio del curante se ritenuto utile per la conferma della progressione.

I laboratori nella regione Piemonte che eseguono l'immunofenotipo alla diagnosi utilizzano la seguente istruzione operativa:

- **ISTRUZIONE OPERATIVA MIELOMA-DIAGNOSI**

Al laboratorio deve pervenire almeno una provetta contenente sangue midollare intero, preferibilmente raccolto in anticoagulante EDTA. Il campione deve essere processato entro 24–48 ore dal prelievo. Eseguire il conteggio dei leucociti totali con un analizzatore contaglobuli. Per ciascun campione bisogna allestire 2 tubi con i seguenti anticorpi mandatori:

Tube 1: CD45, CD38, CD138, CD56, CD19 (CD117 opzionale)

Tube 2: CD45, CD38, CD138, CD56, CD19, cytoplasmatic Kappa, cytoplasmatic Lambda

Se la cellularità è >15.000 WBC/uL, diluire il campione con PBS/BSA 0,2% (in alternativa soluzione fisiologica, Isoflow, FacsFlow), in modo da ottenere una concentrazione cellulare di $1,5 \times 10^6$ cellule per tubo, con volume massimo 100uL.

Se la cellularità è <10.000 WBC/uL, prelevare 100uL di campione dalla provetta madre, per ciascun tubo.

TUBE 1

1. Marcare il campione di sangue midollare utilizzando gli anticorpi monoclonali del proprio pannello.
2. Incubare 15' al buio a temperatura ambiente.
3. Aggiungere alle provette 3 mL di lisante al Cloruro d'Ammonio o equivalenti.
4. Vortexare e incubare per 15' al buio a temperatura ambiente.
5. Centrifugare per 5' a 540g.
6. Eliminare il surnatante.
7. Aggiungere alla provetta 3 mL di PBS/BSA 0,2% (in alternativa soluzione fisiologica, Isoflow, FacsFlow).
8. Centrifugare per 5' a 540g.
9. Eliminare il surnatante.
10. Aggiungere alle provette 200uL di PBS/BSA 0,2% (in alternativa soluzione fisiologica, Isoflow, FacsFlow).
11. Conservare a +4°C fino all'acquisizione.

TUBE 2 Determinazione delle catene leggere intracitoplasmatiche

1. Aggiungere nella provetta gli anticorpi monoclonali contro gli antigeni di superficie.
2. Trasferire il campione nella provetta, secondo la formula sopra descritta per ottenere $1,5 \times 10^6$ cellule per tubo.
3. Vortexare e incubare per 15' al buio a temperatura ambiente.
4. Aggiungere alle provette 3 mL di PBS/BSA 0,2% (in alternativa soluzione fisiologica, Isoflow, FacsFlow).
5. Centrifugare per 5' a 540g.
6. Eliminare il surnatante.
7. Aggiungere 100uL di reagente A Fix&Perm.
8. Vortexare e incubare 15' al buio a temperatura ambiente.
9. Aggiungere alle provette 3 mL di PBS/BSA 0,2% (in alternativa soluzione fisiologica, Isoflow, FacsFlow).
10. Centrifugare per 5' a 540g.

11. Eliminare il surnatante.
12. Aggiungere 100uL di reagente B Fix&Perm e gli anticorpi monoclonali coniugati diretti contro le catene leggere intracitoplasmatiche di tipo kappa e lambda.
13. Vortexare e incubare 15' al buio a temperatura ambiente.
14. Aggiungere alle provette 3 mL di PBS/BSA 0,2% (in alternativa soluzione fisiologica, Isoflow, FacsFlow).
15. Centrifugare per 5' a 540g
16. Eliminare il surnatante.
17. Aggiungere alle provette 200uL di PBS/BSA 0,2% (in alternativa soluzione fisiologica, Isoflow, FacsFlow) e conservare a +4°C sino all'acquisizione.

- **ANALISI CITOFUORIMETRICA PER LA VALUTAZIONE DELLA MALATTIA MINIMA RESIDUA NEL MIELOMA MULTIPLO E LA CONFERMA DELLA REMISSIONE COMPLETA**

La valutazione della malattia minima residua (MMR) si è dimostrata utile a scopo prognostico per i pazienti che ottengono una risposta alla terapia eseguita e caratterizzarne la profondità¹⁻²⁻³⁻⁴, ed è tuttora in corso il suo utilizzo negli studi clinici come determinante nella scelta ad un tipo di terapia (Midas trial: NCT04934475, MASTER trial: NCT03224507, PERSEUS trial: NCT03710603, AURIGA trial: NCT03901963, DRAMMATIC trial: NCT04071457).⁵

Sulla base dei risultati di diversi studi, tale valutazione è pertanto raccomandata per i pazienti candidati a terapia con autotrapianto e successiva reinfusione cellule staminali che abbiano ottenuto una risposta completa (CR) sierologica, dopo almeno 3 mesi dalla procedura trapiantologica (singolo o doppio) prima di avviare la terapia di mantenimento, o prima del trapianto a giudizio del curante se ritenuto clinicamente utile.

Per lo studio dell'MMR negativa sostenuta (MMR negativa confermata su 2 campioni a distanza di almeno 12 mesi) è raccomandato nella stessa popolazione di pazienti una ripetizione della valutazione a +12 mesi e a +24 mesi dall'inizio del mantenimento.

Se disponibile presso un centro hub, la tecnica citofluorimetrica raccomandata per la valutazione dell'MMR è la next generation flow (NGF).

- **ISTRUZIONE OPERATIVA MIELOMA-VALUTAZIONE MMR SENSIBILITA' $\geq 10^{-5}$**

In laboratorio devono pervenire almeno 4-5 ml di sangue midollare intero preferibilmente con anticoagulante EDTA. Il campione va processato entro 24-48 ore dal prelievo.

PROTOCOLLO

1. Eseguire il conteggio dei leucociti totali con un analizzatore contaglobuli.
2. Aggiungere un volume di sangue midollare pari a 20×10^6 di cellule in falcon da 50 mL (Non superare i 2 mL di sangue per ogni falcon, per volumi maggiori, utilizzare provette da 50 ml aggiuntive).
3. Lisare i globuli rossi portando a volume di 50 mL con lisante al cloruro di ammonio o equivalenti per 15' a temperatura ambiente, tenendo le falcon su un agitatore rotante da laboratorio.
4. Centrifugare a 800 g per 10'.
5. Decantare o aspirare il surnatante con pompa a vuoto, risospendere il pellet e portare a volume di 50 mL con PBS-BSA 0,2% (in alternativa soluzione fisiologica, Isoflow, FacsFlow).
6. Centrifugare a 800 g per 5'.
7. Decantare o aspirare il surnatante con pompa a vuoto, risospendere il pellet in 200 μ L di PBS-BSA e suddividere le cellule in ugual misura in 2 tubi.

Per ogni campione allestire 2 tubi con i seguenti anticorpi mandatori:

Tube 1: CD45, CD38, CD138, CD56, CD19, CD117 opzionale

Tube 2: CD45, CD38, CD138, CD56, CD19, cytoplasmatic Kappa, cytoplasmatic Lambda

Tubo 1

1. Aggiungere alla sospensione cellulare gli anticorpi monoclonali, vortexare e incubare per 30' al buio.
2. Lavare con 3 mL di PBS-BSA 0,2% (in alternativa soluzione fisiologica, Isoflow, FacsFlow) centrifugare per 5 min a 540g.
3. Aspirare surnatante e aggiungere 500uL di PBS-BSA 0,2% (in alternativa soluzione fisiologica, Isoflow, FacsFlow)
4. Acquisire almeno $2,5 \times 10^6$ di cellule totali

Tubo 2

1. Aggiungere alla sospensione cellulare gli anticorpi monoclonali contro gli antigeni di superficie.
2. Vortexare e incubare per 30' al buio a temperatura ambiente.
3. Aggiungere alle provette 3 mL di PBS/BSA 0,2% (in alternativa soluzione fisiologica, Isoflow, FacsFlow).
4. Centrifugare per 5' a 540g.
5. Aspirare il surnatante.
6. Aggiungere 100uL di reagente A Fix&Perm
7. Vortexare e incubare 15' al buio a temperatura ambiente.
8. Aggiungere alle provette 3 mL di PBS/BSA 0,2% (in alternativa soluzione fisiologica, Isoflow, FacsFlow).
9. Centrifugare per 5' a 540g.
10. Aspirare il surnatante e aggiungere 100uL di reagente B Fix&Perm.
11. Aggiungere gli anticorpi monoclonali coniugati diretti contro le catene leggere intracitoplasmatiche di tipo kappa e lambda.
12. Vortexare e incubare 15' al buio a temperatura ambiente.
13. Aggiungere alle provette 3 mL di PBS/BSA 0,2% (in alternativa soluzione fisiologica, Isoflow, FacsFlow).
14. Centrifugare per 5' a 540g.
15. Aspirare il surnatante.
16. Aggiungere alle provette 500uL di PBS/BSA 0,2% (in alternativa soluzione fisiologica, Isoflow, FacsFlow).
17. Acquisire almeno $2,5 \times 10^6$ di cellule totali

- **REPORT DEI RISULTATI: REFERTO**

Il report dei risultati di MMR deve riportare:

- Numero dei leucociti totali acquisiti
- Plasmacellule totali acquisite
- Plasmacellule monoclonali acquisite
- % plasmacellule monoclonali
- LOD del campione espresso in % ($20/n^\circ$ cell nucleate x100)
- LOQ del campione espresso in % ($50/n^\circ$ cell nucleate x100)
- % MRD
- MRD viene definita negativa se $< LOD$, positiva ma non quantificabile se $\geq LOD$ e $< LOQ$ e positiva se $\geq LOQ$

- **ISTRUZIONE OPERATIVA MIELOMA-VALUTAZIONE MMR SENSIBILITA' $\geq 10^{-5}$ SECONDO TECNICA NEXT GENERATION FLOW (NGF).**

Per la valutazione della MMR mediante NGF è essenziale attenersi scrupolosamente alle raccomandazioni e alle procedure operative standard (SOP) definite dal consorzio EuroFlow. Tali indicazioni riguardano sia la preparazione del campione sia il corretto setting strumentale (consultabili sul sito: www.euroflow.it).

In laboratorio devono pervenire 4-5 ml di sangue midollare intero (primo aspirato) con anticoagulante EDTA e il campione va processato entro 24-36 ore dal prelievo. Per la valutazione della MMR con la tecnica NGF si consiglia di utilizzare il kit MM MRD (codice CYT-MM-MRD8). Il kit contiene tutti i reagenti necessari per l'esecuzione dell'analisi secondo la metodologia standardizzata.

Protocollo

La procedura descritta segue fedelmente le istruzioni operative contenute nel manuale d'uso del kit MM MRD (CYT- MM-MRD8) secondo la versione (Revisione: 4.1, 2024-03-06).

1. Determinare la conta assoluta delle cellule nucleate per μl del campione.
2. Lisare un volume di campione sufficiente in modo che, dopo la lisi massiva, possano essere colorate 10×10^6 cellule nucleate per provetta. Non utilizzare più di 2 ml di campione per 50 ml di soluzione Bulklysis™ 1X. Se sono necessari volumi di campione maggiori, utilizzare più provette da 50 ml. Nota: durante il processo di lisi, si verifica una perdita di cellule non selettiva e sono necessarie 10×10^6 cellule da colorare per ciascuna provetta MM-MRD (2 provette in totale). Nota: colorare almeno 10×10^6 cellule nucleate per ciascuna provetta e acquisire almeno 5×10^6 cellule/provetta.
3. Aggiungere la soluzione Bulklysis™ 1X per ottenere un totale di 50 ml in ciascuna provetta.
4. Miscelare bene capovolgendo manualmente la provetta e incubare per 15 minuti su un miscelatore a rulli o su un dispositivo di campionamento oscillante.
5. Centrifugare a 800 g per 10 minuti e rimuovere il surnatante utilizzando una pipetta Pasteur o un sistema a vuoto senza alterare il pellet cellulare (nella provetta devono rimanere circa 300 μl di sospensione cellulare).
6. Aggiungere 2 ml di tampone di lavaggio e risospendere il pellet cellulare vigorosamente, preferibilmente mescolandolo sul vortex.
7. Aggiungere il tampone di lavaggio alla provetta contenente la sospensione cellulare fino a 50 ml.
8. Miscelare bene capovolgendo manualmente la provetta.
9. Centrifugare a 800 g per 5 minuti e rimuovere il surnatante utilizzando una pipetta Pasteur o un sistema a vuoto, senza alterare il pellet cellulare.
10. Risospendere il pellet cellulare in 2 ml di tampone di lavaggio. Miscelare bene e trasferire questo volume in una provetta per citometria a flusso da 5 ml.
11. Aggiungere 2 ml di tampone di lavaggio alla provetta da 50 ml per recuperare le eventuali cellule rimaste sul fondo.
12. Trasferire le cellule nella provetta per citometria a flusso da 5 ml contenente il resto del campione come indicato al punto 10.
13. Centrifugare a 540 g per 5 min e rimuovere il surnatante mediante decantazione o utilizzando una pipetta Pasteur.

Nota: se sono state utilizzate più provette da 50 ml, combinare le sospensioni cellulari di tutte le provette in un'unica provetta prima di regolare la concentrazione cellulare. Mantenere il volume finale basso in modo che, quando la concentrazione cellulare deve essere regolata come indicato nel punto successivo, ciò possa essere effettuato mediante diluizione con tampone di lavaggio.

14. Risospendere il pellet con tampone di lavaggio per ottenere una concentrazione cellulare finale di 1×10^5 cellule/ μl .

Nota: per ogni provetta da colorare saranno necessari 100 μl contenenti 10×10^6 cellule del campione lisato (1×10^5 cellule/ μl).

Fasi di colorazione solo per marcatori della membrana superficiale (provetta 1 di MM-MRD)

1. Ricostituire il flaoncino liofilizzato (aggiungere 180 μL di acqua distillata nel flaoncino da 5 test)".
2. Aggiungere 30 μl di miscela di anticorpi ricostituita in una provetta per citometria a flusso da 5 ml.
3. Aggiungere 10 μl di CD27 BV510 e 3 μl di CD138 BV421 alla provetta.
4. Aggiungere 100 μl di sospensione cellulare contenenti 10×10^6 cellule alla provetta.
5. Mescolare bene agitando sul vortex.
6. Portare il volume finale a 200 μl con il tampone di lavaggio.
7. Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente al riparo dalla luce.
8. Aggiungere 2 ml di BD FACS™ Lysing Solution 1X (reagente non compreso nel kit, da acquistare separatamente)
9. Mescolare bene agitando sul vortex.
10. Incubare per 10 minuti a temperatura ambiente al riparo dalla luce.
11. Centrifugare per 5 minuti a 540 g.
12. Eliminare il surnatante utilizzando una pipetta Pasteur o un sistema a vuoto senza alterare il pellet cellulare,

lasciando circa 100 µl di volume residuo nella provetta.

13. Aggiungere 2 ml di tampone di lavaggio.

14. Mescolare bene agitando sul vortex.

15. Centrifugare per 5 minuti a 540 g.

16. Eliminare il surnatante utilizzando una pipetta Pasteur o un sistema a vuoto senza alterare il pellet cellulare, lasciando circa 100 µl di volume residuo nella provetta da 5 ml.

17. Risospendere il pellet cellulare con il tampone di acquisizione in un volume totale di 500 µl.

18. Acquisire un minimo di 5×10^6 cellule immediatamente dopo la colorazione o conservare a 4 °C (per 1 ora al massimo) fino all'acquisizione.

Fasi di colorazione per la colorazione combinata della membrana superficiale e dei marcatori citoplasmatici (provetta 2 di MM-MRD)

1. Ricostituire il flaconcino liofilizzato per la colorazione di superficie (aggiungere 120 µL di acqua distillata nel flaconcino da 5 test)

2. Aggiungere 20 µl di miscela di anticorpi per la colorazione superficiale ricostituita in una provetta per citometria a flusso da 5 ml.

3. Aggiungere 10 µl di CD27 BV510 e 3 µl di CD138 BV421 alla provetta.

4. Aggiungere 100 µl di sospensione cellulare contenenti 10×10^6 cellule alla provetta.

5. Mescolare bene agitando sul vortex.

6. Portare il volume finale a 200 µl con il tampone di lavaggio.

7. Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente al riparo dalla luce.

8. Aggiungere 2 ml di tampone di lavaggio alla provetta contenente il pellet cellulare.

9. Mescolare bene agitando sul vortex.

10. Centrifugare per 5 minuti a 540 g.

11. Eliminare il surnatante utilizzando una pipetta Pasteur o un sistema a vuoto senza alterare il pellet cellulare, lasciando circa 100 µl di volume residuo nella provetta.

12. Risospendere il pellet cellulare mescolando delicatamente.

13. Aggiungere 100 µl di Fix&Perm® Solution A (Fix&Perm®, Nordic-MUBio BV, Paesi Bassi) e miscelare accuratamente agitando sul vortex per 1–2 secondi.

14. Incubare per 15 minuti a temperatura ambiente al riparo dalla luce.

15. Aggiungere 2 ml di tampone di lavaggio alla provetta contenente il pellet cellulare.

16. Mescolare bene agitando sul vortex.

17. Centrifugare per 5 minuti a 540 g.

18. Eliminare il surnatante utilizzando una pipetta Pasteur o un sistema a vuoto senza alterare il pellet cellulare, lasciando circa 100 µl di volume residuo nella provetta da 5 ml.

19. Agitare energicamente sul vortex per risospendere il pellet cellulare.

20. Aggiungere 100 µl di Fix&Perm® Solution B (Fix&Perm®, Nordic-MUBio BV, Paesi Bassi).

21. Mescolare bene agitando sul vortex.

22. Ricostituire il flaconcino liofilizzato per la colorazione citoplasmatica (aggiungere 70 µL di acqua distillata nel flaconcino da 5 test)

23. Aggiungere 10 µl di miscela di anticorpi per la colorazione citoplasmatica ricostituita alla provetta contenente 200 µl di sospensione cellulare in Fix&Perm® Solution B (Fix&Perm®, Nordic-MUBio BV, Paesi Bassi) e sospensione cellulare.

24. Mescolare bene agitando sul vortex.

25. Incubare per 15 minuti a temperatura ambiente al riparo dalla luce.

26. Aggiungere 2 ml di tampone di lavaggio alla provetta contenente il pellet cellulare.

27. Mescolare bene agitando sul vortex.

28. Centrifugare per 5 minuti a 540 g.

29. Eliminare il surnatante utilizzando una pipetta Pasteur o un sistema a vuoto senza alterare il pellet cellulare, lasciando circa 100 µl di volume residuo nella provetta.

30. Risospendere il pellet cellulare con il tampone di acquisizione in un volume totale di 500 µl.

31. Acquisire un minimo di 5×10^6 cellule immediatamente dopo la colorazione o conservare a 4 °C (per 1 ora al massimo) fino all'acquisizione.

CRITERI DI RISPOSTA CITOFLUORIMETRICA secondo IMWG 2016 INCLUDENTI MRD NEI PAZIENTI IN CR⁶:

- Flow-MRD negative: Absence of phenotypically aberrant clonal plasmacells by next-generation flow (NGF) on BM aspirates using the EuroFlow standard operation procedure for MRD detection in MM (or validated equivalent method) with a minimum sensitivity of 1 in 10⁵ nucleated cells or higher.
- Sustained Flow-MRD negative: MRD negativity by flow cytometry as defined above, confirmed minimum of 1 year apart. Subsequent evaluations can be used to further specify the duration of negativity..

Referenze

1. Perrot A, Lauwers-Cances V, Corre J, et al. Minimal residual disease negativity using deep sequencing is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood*. 2018;132(23):2456-2464. doi:10.1182/blood-2018-06-858613
2. Paiva B, Puig N, Cedena MT, et al. Measurable residual disease by next-generation flow cytometry in multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2020;38(8):784-792. doi:10.1200/JCO.19.01231
3. Oliva S, Hofste op Bruinink D, Rihova L, et al. Minimal Residual Disease Assessment by Multiparameter Flow Cytometry in Transplant-Eligible Myeloma in the EMN02/HOVON 95 MM Trial, *Blood Cancer J*. 2021 Jun 3;11(6):106. doi: 10.1038/s41408-021-00498-0.
4. Munshi NC, Avet-Loiseau H, Anderson KC, et al. A large meta-analysis establishes the role of MRD negativity in long-term survival outcomes in patients with multiple myeloma. *Blood Adv*. 2020;4(23):5988-5999. doi:10.1182/bloodadvances.2020002827
5. Costa LJ, Chhabra S, Medvedova E, Daratumumab, Carfilzomib, Lenalidomide, and Dexamethasone With Minimal Residual Disease Response-Adapted Therapy in Newly Diagnosed Multiple Myeloma, *J Clin Oncol*. 2021 Dec 13;JCO2101935. doi: 10.1200/JCO.21.01935
6. 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):e328–46.