

8LLA-T), 484 amostras seguimento em diversos momentos pós quimioterapia, 43 DRM pré-TMO e 157 DRM pós-TMO. Na fase de implantação da bulky-lise demonstramos que a maioria das amostras alcançou a sensibilidade/LOD/LOQ menor que 0,001% (mais de 5.000.000 de eventos obtidos), e o uso do citômetro de fluxo de 8-10 cores foi padronizado no setor. Entre as crianças com diagnóstico de LLA, 46 (85,1%) fizeram a avaliação do D15; 42 (77,8%) d33 e 41 (75,9%) fizeram análise da semana 12; entre os pacientes com LMA a maioria realizou ao menos 2 avaliações pós quimioterapia. Os pacientes que foram submetidos ao TCTH foram seguidos para avaliação da cinética de recuperação pós transplante, e analisados em estudo específico. **Discussão:** A utilização dos recursos do PRONON permitiu a renovação do parque tecnológico do laboratório, como consequência houve uma melhoria evidente na pesquisa de Doença Residual Mínima, com aumento da sensibilidade e especificidade do teste em relação ao método de citometria de 4 cores. Além disso foi possível a capacitação de profissionais na área de hematologia e citometria de fluxo, com discussão dos aspectos técnico científicos e acompanhamento dos resultados, permitindo melhoria substancial no cuidado aos pacientes com leucemias agudas atendidos pelo SUS.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2022.09.971>

RELATO DE CASO LLA PRÉ-B CD19 NEGATIVO

SHT Silva ^a, FFS Zacchi ^a, AVS Sousa ^a,
YH Maekawa ^a, TTT Catelan ^a, MCA Silva ^a,
CE Miguel ^b, AF Sandes ^a, MV Goncalves ^a

^a Grupo Fleury, Brasil

^b Fundação Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, SP, Brasil

Introdução: A leucemia linfoblástica aguda B (LLA-B), é uma neoplasia originária de células linfoides imaturas já comprometidas com a linhagem B, sendo o tipo mais comum de LLA tanto em adultos quanto em crianças. Nas LLAs, o exame de Imunofenotipagem é essencial para a definição da origem celular, se T ou B, para identificação de subtipos imunofenotípicos para a pesquisa de doença residual. Classicamente, a linhagem B é demonstrada pela expressão do CD19 associado na, à expressão de CD79a, CD10, CD22 (estes quase sempre positivos), CD20 e IgM (estes em proporções variáveis). Casos de LLA-B sem expressão do CD19 são extremamente raros e representam um grande desafio diagnóstico. **Objetivo:** Descrever um caso com diagnóstico de LLA pré-B sem expressão de CD19. **Relato de caso:** Paciente do sexo feminino, 55 anos, apresentando esplenomegalia, e com hemograma mostrando Hb = 9,6 g/dL, Leucócitos totais = 5.400/ mm³ (30% de células anômalas de aspecto linfóide) e plaquetas = 35.000/ mm³. Foi realizado mielograma e imunofenotipagem para investigação da pancitopenia, mas o aspirado da medula mostrou-se de difícil execução, com relato de punção seca e hemodiluição. À morfologia, observou-se cerca de 40% de células de pequeno tamanho, alta relação núcleo citoplasma, cromatina frouxa a intermediária e sem grânulos, sugerindo linhagem linfóide. A imunofenotipagem (BD FACSLytic, 8

cores) utilizou os seguintes marcadores para estudo: MPO citop, CD79a citop, CD34, CD19, CD7, CD3, CD3 cit, CD45, TdT nuclear, CD81, CD10, CD38, CD20, IgM cit, CD58, CD22, CD66c, NG2, CD13, CD44. Foram positivos nas células neoplásicas: CD45 (moderada intensidade), TdT, HLA-DR, CD79a, CD10 (elevada intensidade), CD81, CD38, CD20 parcial, CD22, CD24, CD58 (baixa intensidade) e IgM (citoplasmático). Os demais marcadores foram negativos. Apesar da positividade para CD10, CD20 e CD79a, geralmente presentes em células B, o CD19 foi negativo tanto com o fluorocromo PE quanto o PE-Cy7. Para descartar leucemias raras, foram realizados marcadores para pesquisa de LMA e leucemia de células dendríticas (CD13, CD33, CD117, CD64, CD36, CD14, CD123), todos negativos, excluindo estas hipóteses. Por fim, para resolução clínica, a amostra foi encaminhada para o setor de anatomia patológica onde foi submetida à centrifugação e inclusão em agarose. Posteriormente, foram realizados cortes histológicos corados por hematoxilina/eosina e por imuno-histoquímica para os marcadores TdT, Pax5 e CD34, que demonstraram fraca positividade de TdT e Pax5 nas células de interesse. Os achados em agregados foram compatíveis com o diagnóstico de LLA pré-B CD19 negativo. **Discussão:** Casos de LLA-B CD19-negativo ao diagnóstico são extremamente raros, compondo um enorme desafio ao laboratório uma vez que, a própria classificação da OMS traz a presença de CD19 como pilar de caracterização desta população. Casos de recaída de LLA-B sem CD19 após o uso de terapia alvo como blinatumumab eventualmente são observados, mas o diagnóstico prévio de LLA-B traz mais segurança à análise. O uso de marcadores acessórios bem como a exclusão de outras linhagens e o estudo imuno-histoquímico podem ser fundamentais neste cenário. **Conclusão:** Casos de LLA-B CD19 negativo são raros, desafiadores e podem ser melhor caracterizados pela abordagem multidisciplinar.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2022.09.972>

NEOPLASIA PLASMOCITÁRIA BICLONAL – ASPECTOS CLÍNICOS E IMUNOFENOTÍPICOS

BF Bueno, AVS Sousa, MC Bruno, TTT Catelan,
ACT Silva, RG Souza, YH Maekawa, MCA Silva,
MV Goncalves, AF Sandes

Grupo Fleury, Brasil

Objetivo: Apresentar série de casos em que identificou-se biconalidade no mieloma múltiplo e analisar as características clínicas dos pacientes. **Materiais e Métodos:** Entre 2018 e 2022, identificamos seis casos de neoplasia plasmocitária biclonal. As amostras de medula óssea foram marcadas com os AcMo CD20, CD138, CD45, CD19, CD56, CD38, CD27, CD81, CD3, CD117, IgG, IgM, IgA, IgD, cadeia leve Kappa e cadeia leve Lambda por citometria de fluxo de 8 cores. Também analisamos os resultados de exames complementares como mielograma, cariótipo de medula óssea, hibridização *in situ* para mieloma múltiplo, eletroforese e imuno-eletroforese de proteínas séricas e pesquisa de cadeias leves livres no sangue. **Resultados:** A idade mediana dos pacientes foi de 62 anos (59-73 anos), sendo três homens e três mulheres. Cinco pacientes

realizaram eletroforese e imunoeletroforese de proteínas no plasma, sendo detectado mais de um componente monoclonal em 4/5 amostras. Do ponto de vista imunofenotípico, cinco casos apresentaram duas populações com cadeia leve distinta (um clone kappa e um clone lambda) e um caso apresentou duas populações com a mesma cadeia leve (kappa). Dentre a população plasmocitária, o tamanho médio do primeiro clone foi de 72% (57-90%), enquanto o segundo clone foi de 28% (10-43%). A distinção entre os dois clones e os plasmócitos normais residuais foi realizada de acordo com a presença de imunofenótipo anômalo (perda de expressão de CD19 e expressão anômala de CD56 e CD117). Quatro casos realizaram FISH e todos apresentaram inúmeras anormalidades. Deleção dos genes RB1, LAMP1 e MAF foi encontrada em 3/4 casos, um caso apresentou deleção do cromossomo 17 e um caso apresentou t(14;16)/rearranjo IGH::MAF. **Discussão:** Neoplasias plasmocitárias biclonais são definidas como uma proliferação clonal de plasmócitos que produz duas proteínas monoclonais diferentes. Essas duas paraproteínas podem resultar da produção de dois clones de plasmócitos diferentes ou de um único clone de plasmócitos. Relatos da literatura mostram que aproximadamente 4% de todos os pacientes com proliferação de plasmócitos clonais expressam 2 ou mais proteínas monoclonais detectadas por imuno eletroforese. No entanto, casos de mieloma biclonal com detecção de mais de uma população plasmocitária clonal por citometria de fluxo são extremamente raros, não sendo encontrada descrição de séries de casos na literatura. O presente estudo mostra uma pequena série de casos, com descrição de seis pacientes com neoplasia plasmocitária biclonal detectada por citometria. A maioria dos casos apresentou clones com diferentes cadeias de imunoglobulina leve e inúmeras anormalidades citogenéticas detectadas por FISH. Alguns estudos sugerem que pacientes com mieloma biclonal detectados por eletroforese apresentam taxas de resposta e sobrevida semelhantes aos pacientes com mieloma monoclonal. No entanto, a evolução de casos de mieloma biclonal detectados por citometria de fluxo são desconhecidos na literatura, sendo necessário maior número de casos para entendimento clínico e biológico dessa entidade. **Conclusão:** Neoplasias plasmocitárias biclonais detectadas por citometria de fluxo são raras e ainda não muito estudadas. A imunofenotipagem é importante para detecção de distintos clones de plasmócitos e definição de neoplasia plasmocitária biclonal verdadeira.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2022.09.973>

ANALYSIS OF B-LYMPHOCYTE MATURATION KINETICS WITH A 10-COLOR BCP-ALL MINIMAL RESIDUAL DISEASE DETECTION TUBE BY FLOW CYTOMETRY: A COMPARISON OF REGENERATING BONE MARROW BEFORE AND AFTER HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION

AP Azambuja^a, MP Beltrame^b, YC Schluga^a, JLP Justus^a, M Malvezzi^a, C Bonfim^a, R Pasquini^a

^a Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR, Brazil

^b Hospital Erasto Gaertner, Curitiba, PR, Brazil

Introduction: Minimal residual disease (MRD) measurement in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL) has been consolidated in the literature as the strongest adverse prognostic factor for overall and disease-free survival in both child and adult studies. However, only recently has multiparametric flow cytometry (MFC) been fully standardized with the addition of new markers and acquisition of a higher number of cellular events, which can improve the objectivity and sensitivity of the test. **Objective:** This prospective study aims to test a single 10-color flow cytometric assay compared to standardized 8-color two tubes in patients with BCP-ALL before bone marrow transplantation, follow by analysis of the kinetic of medullary B-cell recovery after transplant. **Methods:** Prospective analysis of 75 consecutive patients (pcts) transplanted between 2019/January and 2022/May, with MRD evaluation in the month before HSCT, day30, day100 and day360. Flow cytometry was performed on bone marrow samples after bulk-lysis with ammonium chloride when necessary, and subsequent staining with antibody panels. A 10-color tube included the backbone markers CD19, CD45, CD34, CD10, and CD20, in addition to CD38 and CD81 to improve separation between normal/reactive and malignant BCP, and four discriminatory markers placed in the same tube (CD66c and CD123 in PE, CD73 in BV605, and CD304 in APC-R700). This tube was compared to the standardized Euro-Flow[®] method, which was composed of two 8-color tubes previously described. FACSCantoII[™] and FACSLytic[™] flow cytometry's were used. Data were analyzed with Infinicyt. The achieved sensitivity and percentages of lymphoblasts, normal mature and precursor B-cells, plasmatic cells and stromal cells were compared before and after transplantation. Statistical analyses were performed in SPSS Statistics v.20.0 software. **Results:** 34 ALL (42.6%), being 26 BCP-ALL and 8 high-risk T-ALL, and 41 AML (57.4%), median age 31.6 (4.1-62.5 years) for ALL and 42.9 (0.6-74.2 years) for AML; 45(60%) in first complete remission (CR1), 21 CR2 (28%), one CR3 and 7 active diseases. Among 64 patients in morphologic remission, we found 38(59.4%) MRD negative and 26(40.6%) MRD positive before transplant. Pos-transplantation MRD and maturation analysis was possible in 26 pct's at d30, 24 at d60, 57 at d100 and 18 at d360. All but two samples had more than 9.000.000 cell events acquired, median lower limit of detection (LoD) was 0,0002% and lower limit of quantification (LoQ) was 0,0005% in both assays. All patients had the same percentages of lymphoblasts, normal mature and precursor B-cells, plasmatic cells, in the two different assays. The posttransplant B-cell recovery kinetic was similar between BCP-ALL, T-cell ALL and myeloid leukemia recovery after transplantation, and different between adults and children at day100 and day360, but not in day30. **Conclusion:** This study showed that this 10-color single tube strategy achieves the same sensitivity as the 8-color assay and allows correct identification of MRD, achieving maximum sensitivities and specificities in a single tube, and still maintaining the best discrimination between pathological B cells and normal B cell precursors. B-cell maturation