

or bone marrow samples (4mL), nucleic acids were stabilized and then extracted using Magna 96 (Roche). A one-step RT-qPCR QuantiNova Probe master mix (Qiagen) with primers and probes described by Gabert et al. 2003 (EAC) and by Pane et al. 1996 were used. BCR-ABL1 and ABL RNAs were co-amplified at Roche LightCycler 480II for e14a2/e13a2 (p210), e1a2 (p190), and e19a2 (p230) fusions. The degree of agreement between the test methods (flow cytometry) and the comparative methods (PCR for BCR-ABL) was quantified using Kappa statistics with three categories. **Results:** In this period, 21 samples from different patients were received at Sabin Medicina Diagnostica lab for CML investigation and medical order for flow cytometry and BCR-ABL assays. 10 samples were from peripheral blood and 11 from bone marrow. In 10 samples (3 bone marrows and 7 peripheral blood), flow cytometry assay did not show a CD26+ CML LSC population, and BCR/ABL PCR assay resulted negative. In 11 samples (8 bone marrows and 3 peripheral blood), a CD26+ CML LSC population was identified by flow cytometry and BCR-ABL PCR assay resulted positive. There were no discordant results. The degree of agreement between the test methods (flow cytometry) and the comparative methods (PCR for BCR-ABL) was a perfect agreement (kappa=1). **Conclusions:** In conclusion, our data are in accordance with the results previously described by Raspadori et al. Although we still believe that further studies are necessary, the identification of a CD26+ CML LSC population by flow cytometry may be a diagnostic tool for CML when a BCR-ABL PCR assay is not available.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2020.10.746>

745

CYTOLOGICAL AND MULTIPARAMETRIC FLOW CYTOMETRY ANALYSIS FOR DIAGNOSTIC OF BREAST IMPLANT-ASSOCIATED ANAPLASTIC LARGE CELL LYMPHOMA

A.P. Azambuja, F. Gevert, R.O. Merhy, A.P. Sebastiao, A.C. Groth

Hospital Nossa Senhora das Graças, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Background: Breast implant-associated anaplastic large cell lymphoma (BIA-ALCL) is a provisional entity with morphological and immunophenotypic characteristics indistinguishable from anaplastic large cell lymphoma (ALCL), as hallmark morphology and CD30 positivity. However, unlike ALCL, BIA-ALCL often presents as unilateral effusion associated to silicone breast implants. Diagnostic confirmation of BIA-ALCL can be difficult. In this setting, multiparametric flow cytometry (MFC) looking for CD30, HLA-DR and CD25 positivity may be a good option for help in diagnostic assistance. **Objective:** To describe cytological and flow cytometric findings of patients with suspected periprosthetic fluid and compare confirmed BIA-ALCL to negative patients. **Methods:** From mar/2018 and Jul/2020, all periprosthetic fluid (PF) collection sent to our lab to cytology and MFC analysis to quantification and characterization of pathologic, T and B cells were included. All specimens were collected in dry tubes and

sent immediately to the lab. A cytospin was prepared and cored with Wright-Giemsa staining for morphological evaluation. A total of 100 uL of the concentrated cells were stained with CD4-V450, CD45-V500, HLA-DR-FITC, CD30-PE, 7AAD, CD19-PE-Cy7, CD14+CD3-APC, CD8-APCH7 and Lymphocyte Screening Tube (Euroflow®). For each sample, 100,000 cells were acquired using FACSCanto-II cytometer and data were analyzed with Infinicyt(tm) software. Positive cases were submitted to a confirmation tube with HLA-DR-V450, CD45-V500, CD45RO-FITC, CD25-PE, CD5-PerCPcy5.5, CD2-PE-Cy7, CD14-APC, CD43-APCH7. Cases with less than 1000 cellular events available in flow cytometry acquisition were considered unavailable. **Results:** 83 PF collection from 77 patients were analysed in 28 months. Five patients had bilateral breast collection and one patient repeated the evaluation 2 weeks after first analysis. Median age was 50 years (31–57 years). We found seven positive cases (9.1% of patients); in one of them, the first sample was considered unavailable. Thus, the MFC sensitivity was 85.7% and specificity 100% in our cohort. From 76 negative samples, 9 (11.8%) were considered unavailable cause of lack of viable cells, 7 (9.2%) were blood contaminated, 11 had neutrophilic exudate (14.5%) and 49 (64.5%) had transudates with a predominance of mature lymphocytes. Cytological examination of all seven positive cases revealed numerous large, anaplastic cells with pleomorphic nuclei, prominent nucleoli, and moderate basophilic cytoplasm with frequent vacuoles. MFC immunophenotyping showed large tumor cells (increased FSC/SSC scatter) with bright expression of CD30, CD25 and HLA-DR, CD45^{dim} and absence of monocytic, B and NK cell antigens (CD14, CD19, CD20, CD38, CD56 and light chain expression). All had absence of CD3, five cases had CD4 heterogeneous expression, one had weak CD8, and one had CD5 dim. In negative cases available, scant or rare CD30 positive lymphocytes with normal morphology was considered reactive and corresponded to activated T cells. Furthermore, when we compared BIA-ALCL and normal cases, we detected a significant MFI difference, with overexpression of CD30, HLA-DR and CD25 and dim expression for T cell markers in tumor cells compared with normal samples. **Conclusion:** Here we describe seven patients with BIA-ALCL and could highlight the utility of cytologic evaluation and multiparametric flow cytometry immunophenotyping in diagnostic workup.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2020.10.747>

746

DESENVOLVENDO UM ALGORITMO SIMPLES BASEADO EM CITOMETRIA DE FLUXO MULTIPARAMÉTRICA PARA RASTREAMENTO RÁPIDO DE LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA AGUDA

V.C. Silva, K.B. Pagnano, G.B. Duarte, M.D.B. Pellegrini, B.K.L. Duarte, K. Metz, I. Lorand-Metze

Centro de Hematologia e Hemoterapia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil

Introdução: A leucemia promielocítica aguda (LPA) é um tipo de leucemia aguda genética e molecularmente bem definida que é curável, mas tem uma mortalidade precoce frequente devido a sangramento. Portanto, há uma necessidade de uma triagem diagnóstica rápida para iniciar a terapia apropriada. A citometria de fluxo multiparamétrica (MFC) geralmente é realizada em todos os tipos de leucemias mieloides agudas (LMA), mas apenas algumas características foram descritas como sendo características da LPA. **Objetivo:** desenvolver um algoritmo de diagnóstico baseado na intensidade de expressão de vários antígenos examinados pelo MFC na LMA que possam discriminar de forma confiável entre a LPA e os outros tipos de LMA. **Material e métodos:** LMAs consecutivamente diagnosticadas e tratadas em nossa instituição nos últimos 2 anos entraram no estudo. A imunofenotipagem foi incluída na investigação diagnóstica. Foi utilizada uma plataforma de 8 cores baseada nas recomendações da Euroflow. A intensidade média de fluorescência (MFI) de cada antígeno testado foi avaliada e as que melhor discriminaram entre LPA e todos os outros tipos de LMA foram obtidas por uma análise discriminante. As características fenotípicas dos mieloblastos normais, extraídas de exames de MFC da medula óssea (BM) realizados para o diagnóstico de citopenias, foram utilizados como controle. **Resultados:** 24 casos de LPA e 56 casos de outra LMA primária entraram no estudo. Idade média: 39 (23–56) e 62 (26–81) anos, respectivamente. Em relação aos grupos de risco da ELN de casos não relacionados a LPA, 13 eram de risco favorável, 26 eram intermediários e 9 eram de risco adverso. Em 8 casos, a avaliação de risco não foi possível realizar devido à ausência de citogenética. Além disso, entre os pacientes com LPA, 7 casos apresentaram uma mutação no FLT3-ITD. Entre os LMA não LPA, 4 tiveram mutação FLT3-ITD, 4 tiveram NPM1 e 10 tiveram mutação FLT3-ITD e NPM1. Em relação à expressão do antígeno, o CD34 foi expresso em apenas 1/24 amostras de APL e em 18/56 amostras de LMA não-LPA. As seguintes características de fluxo foram expressas diferencialmente nos dois grupos: SSC ($p < 0,0001$), CD45 ($p = 0,02$), CD13 ($p = 0,001$), CD64 ($p = 0,004$), HLA-DR ($p < 0,0001$) e CD33 ($p < 0,0001$) (tabela 1). Na análise discriminante, MFI CD34 e MFI HLA-DR foram capazes de classificar com precisão LPA e LMA não-LPA em apenas 62,5%. No entanto, após a adição da razão do SSC entre blastos e linfócitos, esses três parâmetros foram capazes de diferenciar LPA de LMA não-LPA em 91,2% dos casos. **Conclusão:** O MFC foi adequado para uma triagem rápida de LPA na maioria dos casos. A expressão de CD34 não foi muito útil, pois muitas LMAs não expressam esse antígeno, semelhante ao LPA, mas o SSC, juntamente com o HLA-DR, poderia discriminar ambos os tipos de leucemia na maioria dos casos.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2020.10.748>

747

IMUNOFENOTIPAGEM DE PLASMÓCITOS ANÔMALOS: DISCRIMINAÇÃO PELA INTENSIDADE MÉDIA DE FLUORESCÊNCIA (MFI)

H.V. Araújo^a, M.R. Ioshida^a, A.M.O. Facchinelli^a, I.Y. Takihi^a, E.N. Ferreira^a, C.M. Lopes^a, J.M. Real^b, N.S. Bacal^{a,c}

^a Centro de Hematologia de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

^b Hospital Santa Marcelina, São Paulo, SP, Brazil

^c < Beneficente Israelita Brasileira Hospital Albert Einstein, São Paulo, SP, Brazil

Objetivo: A citometria de fluxo (CF) é ferramenta importante no diagnóstico e monitoramento de neoplasias de células plasmocitárias. Essa metodologia diferencia plasmocitose reacional de neoplasia, auxilia na avaliação da progressão de Gamopatia Monoclonal de Significado Indeterminado (GMSI) para Mieloma Múltiplo (MM), e quantifica doença residual mínima (DRM). Comparada à citomorfologia, a CF apresenta maior sensibilidade, porém observa-se discrepância no número de plasmócitos, com menor porcentagem na CF, explicada em parte pelas características do plasmócito e por aspectos pré-analíticos. Os plasmócitos normais apresentam fenótipo CD45+, CD38+, CD138+, CD19+, CD56-/fraco, CD81+, CD117-, CD27+, clg policlonal. É possível observar, especialmente na GMSI e na pesquisa de DRM para MM, a presença de duas populações plasmocitárias diferentes, geralmente uma com fenótipo normal e outra com fenótipo anômalo. Nosso objetivo é avaliar o poder de discriminação dos marcadores CD19, CD27, CD38, CD45, CD56, CD81, CD117 e CD138, pela intensidade média de fluorescência (MFI), comparando duas populações plasmocitárias na mesma amostra, dentre elas uma normal e uma anômala. **Materiais e métodos:** Foram analisados 20 casos com presença de plasmócitos anômalos. O critério para inclusão foi presença de no mínimo 0,1% de células plasmocitárias anômalas, e > 100 eventos em cada população plasmocitária, em amostra de medula óssea detectada por CF. Nos casos avaliados, foi possível distinguir duas populações de plasmócitos, sendo uma delas com fenótipo normal e a outra anômala. Por fim, avaliou-se o MFI de cada marcador nas duas populações plasmocitárias. Todos os casos foram avaliados por CF, utilizando os seguintes anticorpos: cyLambdaFITC, cyKappaPE, CD56ECD, CD138PC5.5, CD27PC7, CD117APC, CD19A700, CD38A750, CD81PB e CD45KO. Os dados foram analisados em citômetro Navios e software Kaluza. Para a análise da distribuição dos dados, utilizou-se o software estatístico R. **Resultados:** Dos 20 casos analisados, 55,6% dos pacientes eram do sexo feminino. A mediana de idade foi de 65,5 anos (37–87). Ao avaliar o MFI dos marcadores por representação gráfica em boxplot, observou-se que no geral houve uma menor dispersão dos dados nas populações plasmocitárias anômalas, enquanto nas populações normais os valores do MFI se apresentam com maior dispersão. Com exceção do CD81, os demais marcadores apresentaram valores sobrepostos entre a população normal e a anômala. O CD56 apresentou baixa dispersão dos dados nas populações

