

resultado de seus exames de biópsias de medula óssea no período Janeiro de 2018 a Dezembro de 2022. **Material e método:** Trata-se de um estudo observacional transversal, com aprovação no CEP sob número 6.039.868. O estudo descreve a distribuição dos resultados das biópsias de medula e outras características sem que haja uma preocupação com relações causais ou outras hipóteses. **Resultados e discussão:** Avaliamos retrospectivamente 33 biópsias e foram analisados dados como idade, sexo, indicação do exame, alterações encontradas e sua distribuição. Idade mediana anos (18 a 83 anos); Dos 33 exames, 8 tinham Mieloma Múltiplo como principal suspeita diagnóstica, outras indicações foram n = 7 pancytopenia, n = 6 organomegalia e n = 3 pesquisa de infiltração metastática ou infecciosa. A displasia de uma ou mais linhagens hematopoéticas esteve presente em n = 28 (84,84%). **Conclusão:** A partir dos dados obtidos, pode-se notar a necessidade de estudar a medula óssea, associando a clínica do apciente, em um número maior de pacientes. De modo a auxiliar na identificação diagnóstica precoce e no entendimento da patogênese das doenças mais incidentes neste serviço. Para realizar um mapeamento dos perfis sociodemográficos e clínicos, definindo assim o real direcionamento das demandas iniciais de investigação e que para no futuro poder subsidiar estudos de sobrevida e caracterização dos quadros de evolução, com possibilidade de discussão dos principais fatores relacionados aos desfechos encontrados.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2023.09.249>

CORPÚSCULOS DE ALDER-REILLY E SUA IMPORTÂNCIA NO DIAGNÓSTICO DE MUCOPOLISSACARIDOSE DO TIPO VI

TA Barros^a, BS Fernandes^a, IM Menezes^a, FM Gomes^a, GHT Lorangeira^b, NCKD Santos^b, MG Ribeiro^b

^a Grupo Fleury, São Paulo, SP, Brasil

^b Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira (IPPMG), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Objetivos: Demonstrar como a hematoscopia pode auxiliar no diagnóstico da mucopolissacaridose (MPS VI) na prática clínica. **Material e métodos:** Relato de dois casos de gemelares com achados de corpúsculos de Alder-Reilly na hematoscopia, característicos de MPS VI. O hemograma completo foi realizado pelo analisador automatizado XN-10 e a análise digital da morfologia celular pelo sistema automatizado CellaVision Di-60. **Resultados:** Criança de dois anos, após consulta de rotina em puericultura, realizou hemograma completo a pedido de sua médica. Embora apresentasse índices hematimétricos da série vermelha, plaquetometria e leucometria dentro da normalidade, houve alerta pelo aparelho por dúvida na contagem de basófilos. Seguindo o procedimento padrão, realizamos a hematoscopia que não demonstrava basofilia. No entanto, evidenciamos abundantes granulações púrpuras grosseiras em neutrófilos e inclusões metacromáticas citoplasmáticas, circundadas por áreas claras em linfócitos e monócitos. Achados característicos de MPS VI, conhecido

como corpúsculos de Alder-Reilly. Realizado, então, contato com a médica solicitante que encaminhou a criança para a avaliação de médico geneticista. Nessa consulta, foi evidenciado que tanto a criança quanto seu irmão gêmeo, filhos de pais consanguíneos saudáveis, apresentam alterações fenotípicas que corroboravam a hipótese diagnóstica: macrocra-nia, fâcies grosseira, ponte nasal deprimida, pescoço curto, manchas mongólicas, limitação articular generalizada, mãos e pés pequenos. Além disso, o posterior estudo radiológico evidenciou disostose multiplex e o irmão apresentava as mesmas alterações à hematoscopia. Na anamnese dirigida sobre a história pregressa: pré-natal de diabetes gestacional com insulino-terapia, nascidos de parto vaginal, idade gestacional de 30 semanas e medidas antropométricas adequadas. Ambos necessitaram de intubação orotraqueal e internação em UTI neonatal. Histórico de múltiplas infecções respiratórias, déficit auditivo e evolução com atraso dos marcos motores e da fala, distúrbio comportamental e déficit de crescimento. Realizado o exame genético confirmatório por sequenciamento de nova geração (NGS) que evidenciou variantes patogênicas, em homozigose, no intron 5 do gene ARSB (c.1143-1G>C), ratificando assim o diagnóstico de MPS VI em ambos. **Discussão:** MPS VI (ou síndrome de Maroteaux-Lamy) é uma doença de depósito lisossômico relacionada à deficiência da enzima arilsulfatase B, resultando em acúmulo de dermatan sulfato. A patologia possui herança autossômica recessiva e prevalência estimada em 0.23 a cada 100 000 nascidos vivos. Os pacientes com MPS VI exibem uma ampla variabilidade de sintomas multissistêmicos com evolução crônica e progressiva e acometimento músculo esquelético, cardiopulmonar, assim como córnea, pele, fígado, baço, cérebro e meninges. Atualmente, a reposição da enzima específica, melhora o prognóstico da doença e, quanto mais precocemente haja a suspeita e a confirmação do diagnóstico, menor a progressão do dano com maior qualidade de vida. **Conclusão:** A hematoscopia cuidadosa e a interação entre laboratório e médico solicitante, permitem que diagnósticos sejam feitos de forma precoce e assertiva. Nesses casos relatados, foi possível iniciar tratamento específico rapidamente, impactando positivamente na vida das crianças envolvidas.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2023.09.250>

VALIDATION OF A RAPID AND SENSITIVE MGB PROBE-BASED REAL-TIME PCR FOR DETECTING JAK-2 V617F MUTATION

C Pugliesi, RR Loiola, S Lanes, A Marinato, R Prot-Siqueira

Flow Diagnósticos, São Paulo, Brazil

Introduction: Research on point mutations in onco-hematology plays a critical role in understanding neoplasias and formulating effective treatment strategies. In this context, investigating the V617F mutation in the JAK-2 gene is of particular significance for diagnosing BCR-ABL negative myeloproliferative syndromes, notably Polycythemia vera. A range of techniques, including sequencing, PCR + RFLP, and real-time PCR, can be employed for this purpose. This study aims

to describe the utilization of real-time PCR with a specific MGB probe to detect the V617F mutation in the JAK-2 gene. We also present the retrospective results obtained from peripheral blood samples of 250 patients who were assessed between July 2022 and July 2023 due to suspected myeloproliferative disorders (MPD). **Objectives:** The primary objectives of this study are to validate a rapid, cost-effective, and sensitive MGB TaqMan probe-based real-time PCR method, coupled with automatic magnetic DNA extraction (EXTRACT MPTA, Locus) compared with column manual extraction (Promega), for detecting the JAK-2 V617F mutation in an onco-hematology remote laboratory (ROLF). Additionally, we aim to evaluate the incidence of the V617F mutation in the 250 cases submitted to ROLF. **Methods:** For the real-time PCR reaction, we utilized a specific MGB probe (Thermo) targeting the V617F mutation (rs77375493) along with the SNP detection master mix reagent. The PCR was performed using a Rotor-Gene Q instrument (Qiagen), and the raw fluorescence data were analyzed at cycle 45. To assess sensitivity, we conducted tests using a homozygous cell line for the mutation (HEL 92). **Results:** Among the 250 cases (126 females and 124 males) originating from 28 different hospitals in Brazil, 63 (25.2%) tested positive for the V617F mutation, with a relatively equal distribution between genders ($p=0.1459$). The mean age of V617F positive samples was 66 years compared to 55 years for negative samples ($p < 0.0001$). Analysis of fluorescence intensity at cycle 45 of real-time PCR in positive and negative samples for the V617F mutation revealed remarkable sensitivity, detecting the presence of the mutated allele down to 1% (limit of detection - LOD). The average fluorescence intensity was 0.52 for mutated samples and 0.04 for non-mutated samples ($p < 0.0001$, Mann-Whitney test). DNA from 32 samples and diluted controls were extracted manually and automatically (magnetic) and 100% agreement was obtained. **Conclusion:** Our study demonstrates the clinical relevance and high sensitivity of real-time PCR with the MGB probe for detecting the V617F mutation in the JAK-2 gene. It accurately identifies V617F mutation even at low levels (1% LOD). The automatic magnetic DNA extraction setting offers a rapid and cost-effective alternative to manual column extraction. Notably, we observed a significant correlation between the V617F mutation and older age, with positive samples having a mean age of 66 years compared to 55 years for negative samples ($p < 0.0001$). These findings have important implications for molecular diagnostics in onco-hematology, enabling early and precise diagnosis of myeloproliferative disorders (MPD).

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2023.09.251>

FAST AND COST-EFFECTIVE RNA EXTRACTION FOR BCR-ABL QUANTIFICATION IN ONCO-HEMATOLOGY LABORATORIES

C Pugliesi, RR Loiola, S Lanes, A Marinato, R Prot-Siqueira

Flow Diagnósticos, São Paulo, Brazil

Background: Chronic myeloid leukemia (CML) is a myeloproliferative neoplasm characterized by the presence of a

BCR-ABL1 rearrangement; its detection and quantification by real-time quantitative PCR (RQ-PCR) plays a central role in CML diagnosis, therapy monitoring, and sequencing to identify resistance mutations in case of therapy failure. To evaluate the molecular response of CML, BCR-ABL1 quantification must be calculated on the international scale (IS%) for which RQ-PCR has the necessary sensitivity (up to 10⁻⁵). Currently, BCR-ABL1 quantifications are ubiquitous in onco-hematology laboratories (OHLs; 70% of tests performed in our OHL), whereby quality, cost, and turn-around-time are of critical importance. Today, the majority of OHLs in Brazil rely on laborious manual RNA-extraction methods (e.g., Trizol) that usually require 8 mL of peripheral blood (PB) to monitor CML. Here, we report a strategy that requires only 2 mL of PB in combination with the automated magnetic DNA/RNA-extraction kit Extracta-MPTA (Locus do Brasil) for CML diagnosis and monitoring. **Methods:** BCR:ABL1 was quantified and its IS% determined using our developed kit, which was calibrated using ERM-AD263 and UK-NEQAS (external quality assessment). Total RNA was extracted from 40 PB samples, after erythrocyte lysis using two different methods: 1) Leukocytes from 8 mL of PB were extracted manually using Trizol; 2) leukocytes from 2 mL of PB were automatically extracted using Extracta-MPTA (Locus do Brasil). BCR-ABL1 quantification, BCR-ABL1 IS%, and BCR quantification (internal control) were compared statistically (paired t-test). The reproducibility was evaluated by analyzing 20 replicates; the low limit of the leucocyte number to BCR:ABL1 quantification using Extracta-MPTA were also evaluated. Median and moving means of 135 unpaired samples were used to monitor BCR-ABL1 IS% between Trizol, Extracta-MPTA, while EQA from UK-NEQAS was also evaluated using both methods. In parallel, RNA was extracted by both methods from 20 samples for the diagnosis of acute lymphoblastic leukemia (ALL) (BCR-ABL p190 transcript) and acute promyelocytic leukemia (APL) (PML-RARA transcript). **Results:** A comparison of BCR-ABL1, BCR, and %IS in 40 paired samples showed that the results obtained from Trizol or Extracta-MPTA are comparable (paired t-test: $p=0.4222$, $p=0.9263$, and $p=0.071$, respectively). The reproducibility was evaluated by BCR quantification (24%). A comparison of the medians from 135 unpaired samples extracted using Trizol and Extracta-MPTA revealed that BCR-ABL1 IS% distribution among our patients is stable over time ($p=0.7704$; Mann Whitney: $r^2=0.0012$). EQA was extracted using both methods and the results were identical. A comparison between Trizol and EXTRACTA_MPTA for ALL and APL was 100% identical (Fischer; $p=1,000$). **Conclusions:** Both RNA extraction methods are suitable for OHLs for PML-RARA and BCR-ABL (p190 and p210) detection and CML diagnosis/monitoring by BCR-ABL1 detection/quantification. By using Extracta-MPTA the amount of PB used to obtain RNA can be reduced by 75%, test results can be obtained within 4 h, and direct reagent costs are reduced by 25% with a minimum of hands-on time.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2023.09.252>