

Problemas diagnósticos de las leucemias agudas



Muestras a estudiar: obtención,
envío, procesamiento.



Obtención de muestras en leucemias agudas

Sangre

Médula ósea

Otros: LCR, sarcoma mieloide...

MORFOLOGIA

INMUNOFENOTIPO

GENETICA: CARIOTIPO, FISH, PCR..

MORFOLOGIA SANGRE PERIFERICA

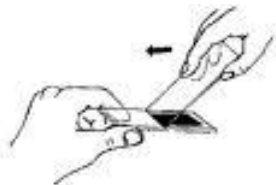
Hemograma

Frotis:

adecuada extensión

adecuada tinción

contar suficientes células. % blastos



>20% blastos en sp es leucemia aguda

MORFOLOGIA EN MÉDULA ÓSEA

Punción medular: esternón, crestas, meseta tibial...

Anestesia, consentimiento informado..

La mayor riqueza de grumo está en las primeras gotas que se aspiran. Lo ideal está en los 2 ml (a repartir, pero no llega...).

A veces parece seco, pero extender igual





MORFOLOGIA EN MÉDULA ÓSEA

- suficientes extensiones grumo aplastado y finas (bien hechas)
- Se guardan en cajas adecuadamente etiquetadas.
- adecuada tinción (WG; MGG; Peroxidasas, esterasas, Fe, otras)
- contar mínimo 500 células

Si seco: Biopsia médula: improntas de cilindro (t^a ambiente, formol si día siguiente).



MORFOLOGIA EN MÉDULA ÓSEA

CONSERVACION Y ALMACENAMIENTO Y TRANSPORTE:

rotular extensiones, secado

ideal: teñir en 24h-48h (panóptica: disminuye calidad). Citoquímica: 2-6 días.

una vez teñidas duran años

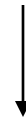
almacenar sin teñir: T^a ambiente.

INMUNOFENOTIPO

Sangre periférica
Médula ósea
Otros...



Diagnóstico
Clasificación
Pronóstico
Enfermedad mínima residual



% células leucémicas

Inmunofenotipo



Médula ósea:

1.5-2 ml de buen grumo.

Si más volumen, suele estar diluido.

Si <1ml: añadir PBS y pasar varias veces por aguja de 25G para deshacer los grumos

Sangre periférica:

5 ml

ideal si >5% blastos.

Inmunofenotipo

Si EMR:

3ml de médula y/o

5ml de sangre



Fundamental procesar en el mismo centro del diagnóstico: ya conocemos las células blásticas



Inmunofenotipo: conservación

Procesar lo antes posible.

Ideal: <24h

Si procesamiento inmediato: T^a ambiente.

Si no, +4°C.

Disminuye la calidad.

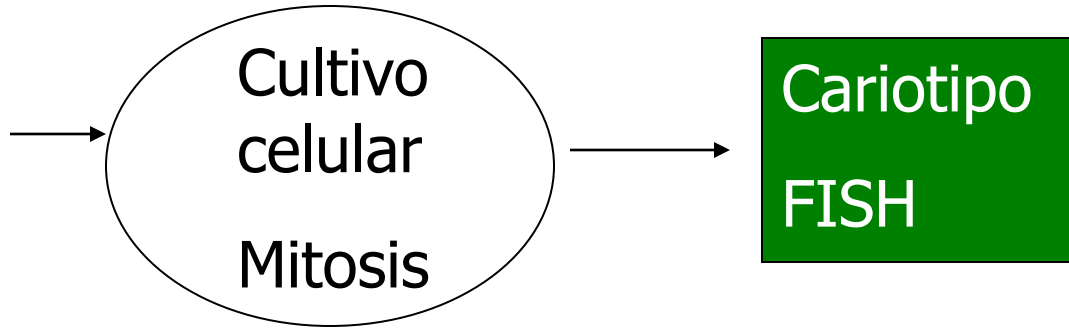
Se pueden añadir estabilizantes como el TRANSFIX (5 días) al 1/10

Si mal conservada o vieja: lisis, debris, pérdida de Ag normales..

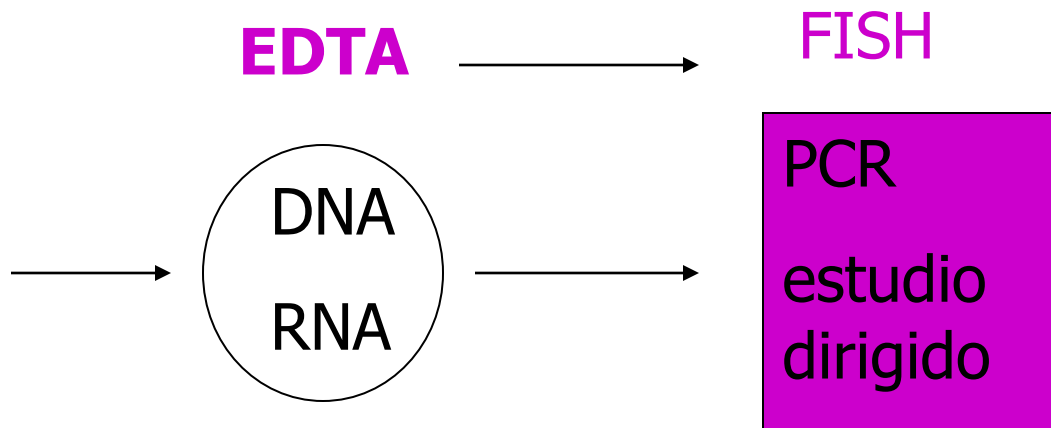
Recogida de muestras para genética



HEPARINA



EDTA



Recogida de muestras para genética

Cariotipo/FISH

PCR

Médula ósea

2 ml



Sangre periférica

5-20 ml





Citogenética: cariotipo

Manual, poca automatización

A partir de cultivos celulares.

El cultivo implica que no se puede hacer todos los días.

Citogenética: necesita metafases. FISH puede ser con interfase

Su obtención y transporte son claves

Traslado de muestras a centros de referencia,
>100 km



Citogenética: cariotipo

Cultivos: cada muestra tiene unos tiempos y condiciones diferentes, y debemos conocerlos y comunicarlos:

Mieloide: 24h 48h

Linfoide: 48-72h

Mieloma: 72h-5días

Citogenética convencional y molecular



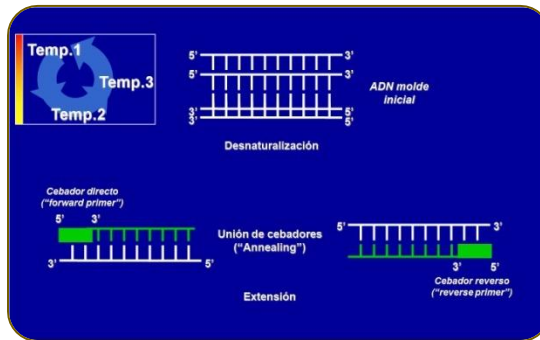
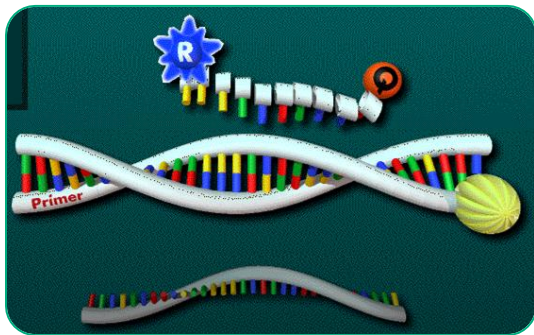
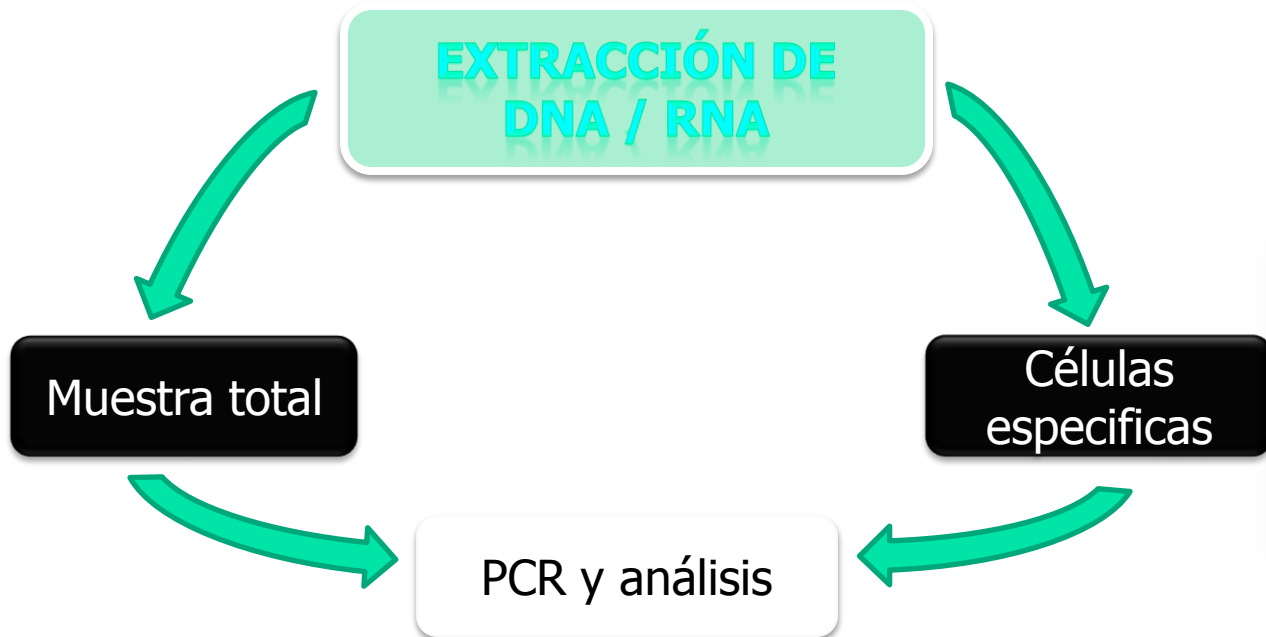


Citogenética: cariotipo

Si heparina sódica y temperatura ambiente en transporte:

Desde obtención de muestra hasta el cultivo: **máximo 24h.**

Biología molecular



24-48h

Biología molecular

ADN: southern blot:

inv (16)

MLL

Vale hasta 72h a 4° C.

RNA: PCR:

PML-RARa

t(8;21)

inv (16)

MLL

Procesar en <24h, mejor inmediato, sino, 4° C

**Si congelado, -20-80°, indefinido: nieve carbónica.
Extracción RNA: Ficoll + isotiocianato...**



Protocolo de envío de muestras para genética

Citogenética/FISH: tubos de heparina.

Sangre: 5-20 ml

Médula: 2ml



TRANSPORTE

Si <4h de extracción: t^a ambiente.

Si >4h, pero <16h desde extracción: almacenar a +4°C y transporte en hielo

Médula ósea: mejor 1ml y con grumo, que el tubo lleno y diluida con sangre.

Protocolo de envío de muestras

PCR: tubos de EDTA

Sangre: 5-20 ml

Médula: 2ml

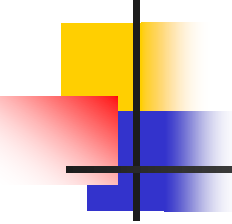
TRANSPORTE

Si <6h de extracción: t^a ambiente.

Si >6h, pero <16h desde extracción: almacenar a +4°C y transporte en frío.

Nunca congelar

Hay laboratorios que aceptan 24-48h a T^a ambiente, si está garantizada.



Protocolo de envío de muestras: transporte

Adecuado etiquetado de tubos, recipiente y enviar formulario

Formulario de identificación de paciente y muestra, tipo de muestra y estudios que se solicitan.

Si ensayo o estudio: formulario de registro del protocolo...

SISTEMA DE EMBALAJE TRIPLE



Contenedor externo

Recipiente secundario



RECIPIENTE PRIMARIO

|



Si tª ambiente no garantizada,
colocar hielo o placas frías en
recipiente secundario.



ETIQUETA BIOHAZARD
PARA TODO TIPO
DE MUESTRA BIOLÓGICA



Debe cumplir normas de acuerdo europeo sobre transporte internacional de mercancías peligrosas por carretera ADR 2003 (clase 6.2 Materias infecciosas: muestras de diagnóstico de laboratorio: clase 6.2 I4), y las de la ONU para etiquetado y embalaje (UN 3373)



Recepción de muestras en el laboratorio

Velar por garantías de transporte y de identificación

Normativa de aceptación de muestras

Hojas de registro de recepción

Si no se admite la muestra, comunicarlo lo antes posible.

Clasificación y procesamiento según técnica



Almacenamiento muestras en biobancos

Documento guía en web AEHH.

Consentimiento informado al paciente para extracción y almacenamiento de muestras para investigación futura. Revisión por comité ético del centro.

Cumplir normativa vigente de transporte de muestras biológicas

Recomendaciones de etiquetado, procesamiento...

Biobanco: almacén de muestras, sin ánimo de lucro, con controles de calidad y cumpliendo requisitos de procesamiento, etc destinado a diagnóstico o investigación

ANEXO 3. MODELO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ENVÍO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS ESTUDIOS BIOLÓGICOS EN PACIENTES CON HEMOPATIA

Desde hace años, todos los datos tanto clínicos como biológicos relativos al diagnóstico y al seguimiento de los pacientes diagnosticados de hemopatía, además de almacenarse en una base de datos propia de cada centro hospitalario, se envían al registro de un grupo cooperativo en función del diagnóstico final de la enfermedad, en este caso el Grupo PETHEMA. El objetivo de estos registros es de carácter epidemiológico y científico, siempre con la intención de analizar grandes grupos de pacientes tratados de acuerdo a protocolos clínico-biológicos previamente consensuados para ir mejorando de manera continuada el diagnóstico y tratamiento de las diferentes enfermedades de la sangre. La información referente a usted, a su diagnóstico y seguimiento es confidencial y anónima, empleando sólo números de identificación para mantener la total privacidad de sus datos.

Asimismo, al diagnóstico y durante el seguimiento, además de los estudios biológicos imprescindibles para el seguimiento y control de su enfermedad se le extraerán muestras de sangre adicionales, las cuales tras extracción de ADN y ARN, se congelaran para realizar o bien al momento o en el futuro, de acuerdo a los avances científicos, estudios moleculares que permitan profundizar en las causas de la enfermedad y por tanto en la mejora del tratamiento, con un único interés científico. Dichas muestras se almacenaran también a través de códigos, lo cual asegurará su anonimato.

La legislación actual exige que usted sepa que sus datos y muestras biológicas son recogidos y que dé su consentimiento por escrito para ambas cuestiones.

DECLARO

- Que he sido informado por el Médico después mencionado de:
 - que mis datos serán registrados en bases de datos locales, nacionales e internacionales,
 - que mis muestras biológicas pueden ser almacenadas y usadas para estudios de investigación actuales o futuros,
- He comprendido la información recibida y podido formular todas las preguntas que he creído oportunas

Nombre: Firma:

PETHEMA: LAL



Anexo 1: solicitud de estudio de EMR

Datos del solicitante, del paciente, de la muestra: fecha envío, momento de estudio (diagnóstico, +14, postinducción, tras consolidación, pre TPH, post TPH, pre consolidación tardía y premantenimiento) y tipo de muestra (sp/ mo)

EDTA: 3ml médula

Enviar siempre al mismo centro de referencia.

PETHEMA: LAL



Citometría: remitir muestra al diagnóstico para detección de fenotipos aberrantes. Servirá para detectar EMR. Antígenos B, T y mieloides....

Centros de referencia:

Barcelona: H Sant Pau, Vall d´Hebrón

Castilla y León: H Salamanca

Galicia: CHUS

Madrid: H 12 Octubre, Getafe y Clínico S Carlos

Valencia: H La Fe.



PETHEMA: LAL

Anexo 2: citogenética

- Cultivo corto de 24h y análisis según normas internacionales

- PCR o FISH

BCR/ABL

MLL si marcadores mieloides o si alter 11q23

Centros de referencia:

HU Germans Trias i Pujol, Badalona (Dra. Granada)

HCU Salamanca (Dr Hernández Rivas)

PETHEMA: LMA-99

Valor de la citogenética y de la monitorización de EMR.

Determinaciones habituales de cada centro +

Fenotipo: Salamanca. EDTA mo: 2ml

Biología molecular: almacenamiento en Salamanca:
EDTA mo: 2ml

Identificar correctamente, nombre, protocolo, momento. Fotocopia de hoja de recogida de datos. Usar contenedores SARSTED, previo tfno a secretaria PETHEMA- MRW. Se compromete a entregar muestras en Salamanca antes de las 10h del día siguiente



Protocolo PETHEMA LMA-2007

Conseguir caracterización citogenética y molecular básica y en el menor tiempo posible

Crear un registro de muestras (ADN; ARN y células)

Disponer estratificación pronóstica al final de inducción basada en nivel de EMR por CMF, genética y molecular.

Evaluar factores pronósticos de LMA (cariotipo, molecular y citometría) y su papel en el seguimiento de EMR



Protocolo PETHEMA LMA-2007

CMF a todas

Cariotipo y FISH: inv(16), t(8;21) y t(15;17)

Estudio molecular: FLT3 (ratio) y NPM1. AML1/ETO y
CBFB/MYH11 si procede. CEBPA, EVI1, KIT, MLL

Almacenar muestra para ADN, ARN y células para
estudios futuros y banco de muestras.
(consentimiento informado específico)



Protocolo PETHEMA LMA-2007

Muestras para citogenética, molecular y almacenamiento. Si no hacen todo, remitirlo a centros de referencia.

Citogenética mo: heparina: 2ml

Consentimiento
informado específico

ADN, ARN y células en mo: EDTA: 1+1+2ml

Si no hay mo, pero
hay blastosis, vale sp.

Dx, pre consolid, pre TPH, 3,6 12 18 m
post tph

Enviar en 1^a 24h. Mandar fax. Envían código para
muestras



Centros de Referencia que realizan todas las técnicas

HU Salamanca

H Central de Asturias

H 12 Octubre

CNIO

HU La Fe

H Vall d´Hebrón

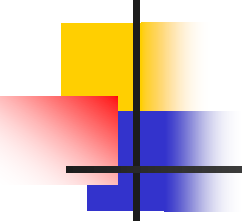
H Reina Sofía

H Virgen del Rocío

CHUS

Lab genética: Univ Navarra.

PETHEMA: LPA R 2007



Muestras para molecular:
Valencia (P Bolufer) y

Salamanca (M González)

Como siempre:

3-4 frotis de sp y mo sin teñir. T^a ambiente. Son para almacenamiento o para anti-pML

EDTA: 1-2 ml de mo y 5-20 ml de sp a **4°**, para **extracción de ARN** y det de PML/RAR. Lo sobrante: - 20°

Heparina: 1-2ml de mo en 6ml de RPMI heparinizado, a t^a ambiente para cariotipo y FISH.

Protocolo CETLAM LMA <70años. Protocolo LMA-2003

Hospital Sant Pau (Dra Brunet y Drs Sierra y Nomdedeu)

Al diagnóstico:

2 extensiones médula ósea

1 extensión sangre periférica

15 ml de médula en heparina (2 tubos) + 5 ml en EDTA: remitir a temperatura ambiente.

FLT3 y MLL y otros

Seguimiento:

Médula: 5ml en heparina y 5ml en EDTA + 2 extensiones médula + 1 sp.

Consentimiento informado para extracción de muestras biológicas. Registro de datos, almacenamiento de ADN ARN

Llamar a SEUR antes de las 12h,
Si no, guardar a Tª ambiente y enviar al día siguiente
Si fuera de Cataluña, antes de Jueves a las 12h.
Identificar la muestra y acompañarlo de hoja de petición de estudio de médula