

Diagnostisches Zusammenspiel bei hämatologischen Erkrankungen Teil II

ZYTOLOGIE und Durchflusszytometrie

OÄ Dr. Anne Black

OÄ Priv.-Doz. Dr. Margot Egger-Salmhofer

OÄ Priv.-Doz. Dr. Katrin Hefler-Frischmuth

OKH Zentrallabor Linz

OKH Zentrallabor Linz

OKH Zentrallabor Linz

KLINIK

FÄ Dr. Claudia Hos

Ordensklinikum Linz BHS

HISTOLOGIE

OÄ Dr. Eva Maier, MSc

Institut für klin. Pathologie und Molekularpathologie OKL Linz

MOLEKULARGENETIK

Laura Lamplmayr, MSc

Mag. Barbara Zellhofer

Labor für Molekulargenetische Diagnostik, OKL Linz

Labor für Molekulargenetische Diagnostik, OKL Linz

FALL 3

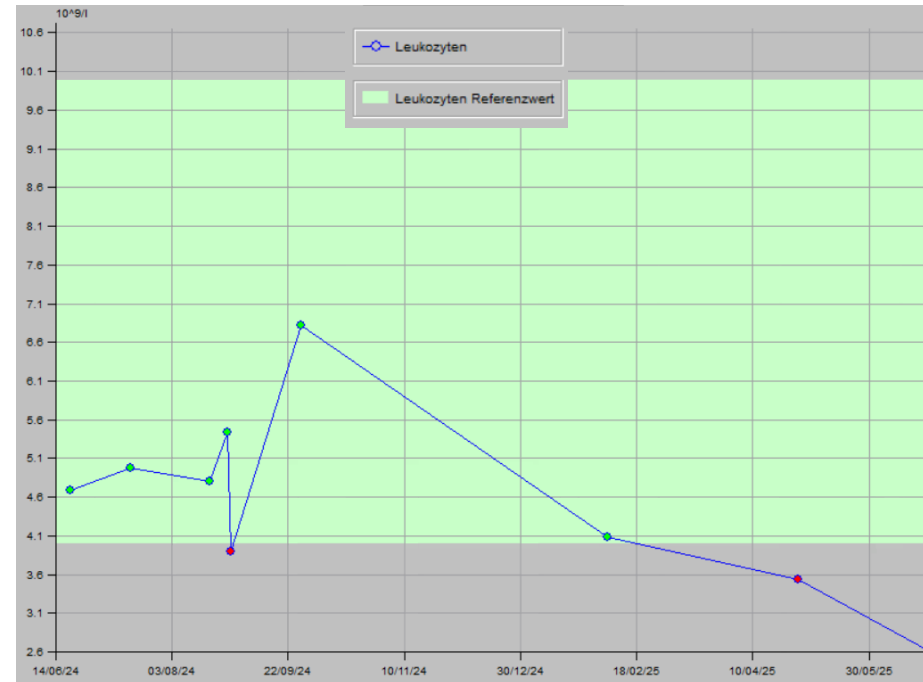
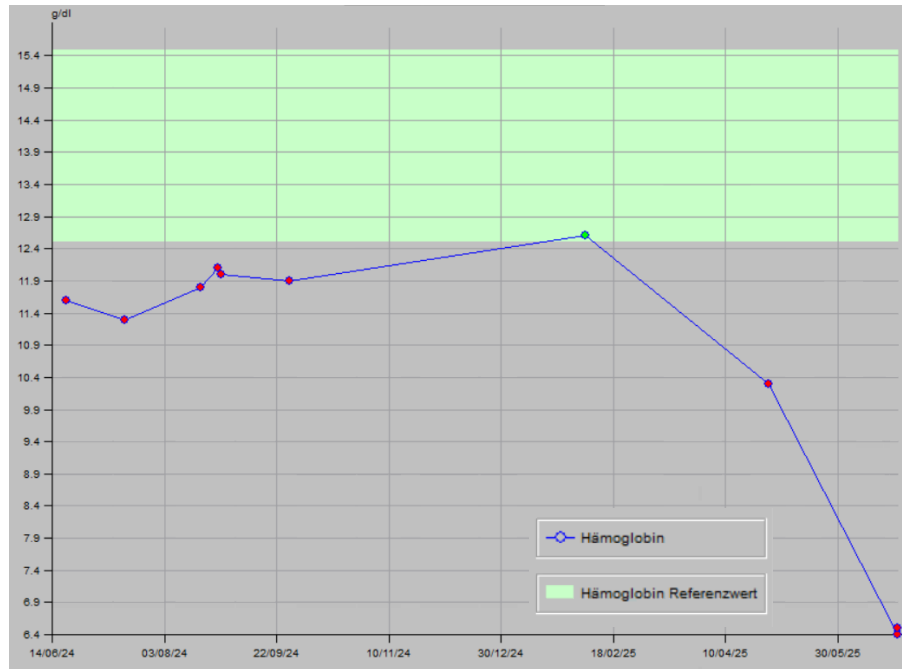
FALL 3

61-jährige Patientin
06/2025

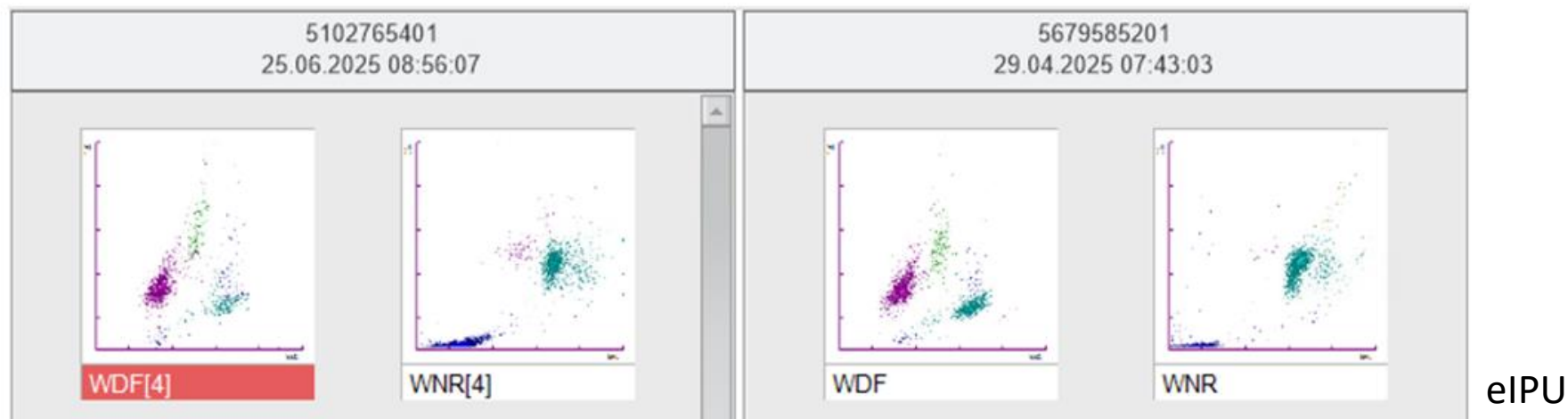


Leukozyten	2.61 $10^9/l$	(4.00 - 10.00)	3.54	29/04/25	4.09	06/02/25
WPC-Abrechnung	1					
Erythrozyten	1.82 $10^{12}/l$	(4.00 - 5.30)	2.86	29/04/25	3.58	06/02/25
Hämoglobin	*6.4 g/dl	(12.5 - 15.5)	10.3	29/04/25	12.6	06/02/25
Hämatokrit	18 %	(37 - 47)	28	29/04/25	35	06/02/25
MCV	100 fl	(80 - 100)	97	29/04/25	99	06/02/25
Mikrozytäre Ery %	1 %	(0 - 10)	1	29/04/25	0	06/02/25
MCH	35.2 pg	(26.0 - 34.0)	36.0	29/04/25	35.2	06/02/25
MCHC	35.0 g/dl	(31.0 - 36.0)	37.2	29/04/25	35.6	06/02/25
RDW-CV	14.9 %	(12.0 - 15.0)	13.6	29/04/25	12.6	06/02/25
Thrombozyten	*65 $10^9/l$	(150 - 370)	182	29/04/25	221	06/02/25
Thromb.Imp	59 $10^9/l$		182	29/04/25	221	06/02/25
IPF	3.8 %	(1.0 - 6.3)				

Verlauf Hämoglobin und Leukozyten

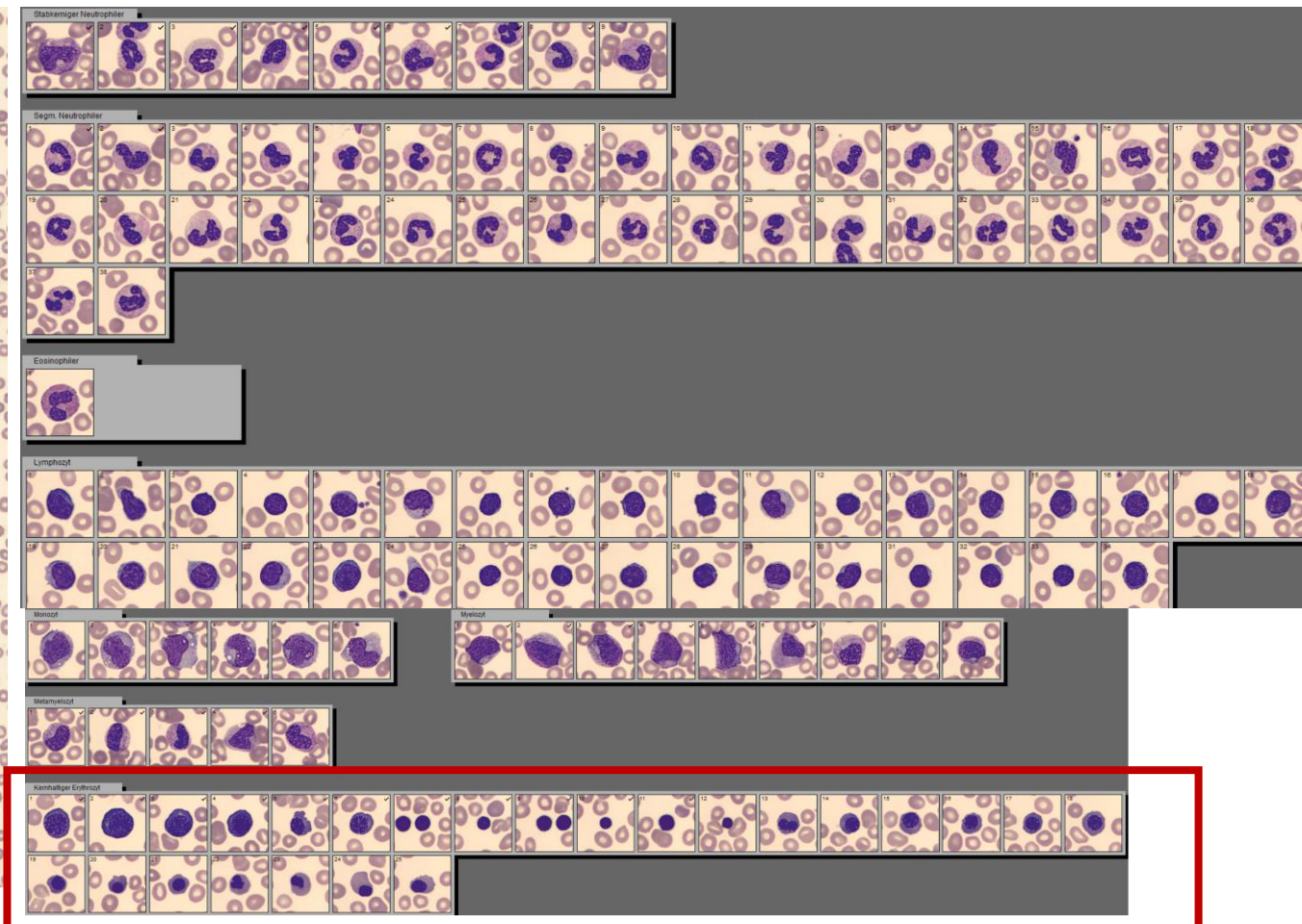
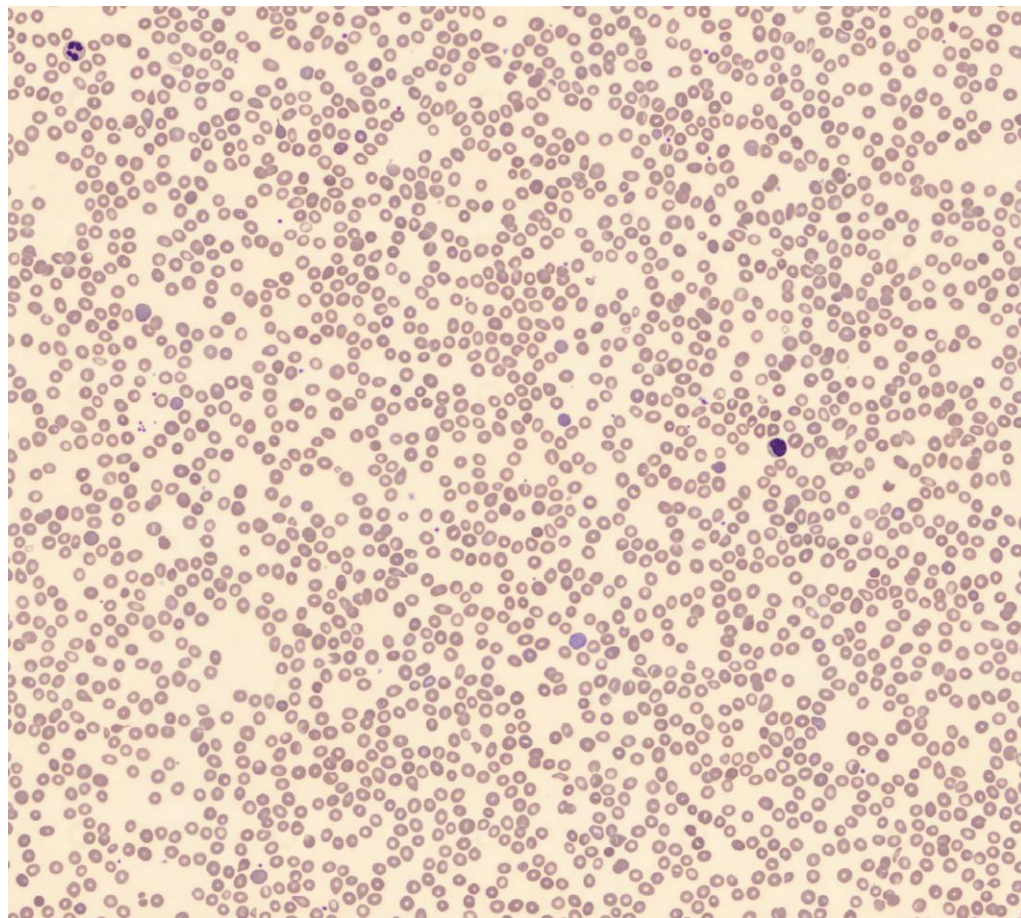


WDF – technisches DIFF



Neutrophile (rel.)	22.6 %	(40.0 - 74.0)	35.1	29/04/25
lymphozyten (rel.)	67.0 %	(16.0 - 45.0)	55.6	29/04/25
Monozyten (rel.)	10.0 %	(2.6 - 10.0)	7.9	29/04/25
Eosinophile (rel.)	0.0 %	(0.0 - 7.0)	0.3	29/04/25
Basophile (rel.)	0.4 %	(0.0 - 1.5)	1.1	29/04/25
Neutrophile (abs.)	0.59 10 ⁹ /l	(1.60 - 7.00)	1.24	29/04/25
lymphozyten (abs.)	1.75 10 ⁹ /l	(0.80 - 3.00)	1.97	29/04/25
Monozyten (abs.)	0.26 10 ⁹ /l	(0.10 - 0.80)	0.28	29/04/25
Eosinophile (abs.)	0.00 10 ⁹ /l	(0.00 - 0.50)	0.01	29/04/25
Basophile (abs.)	0.01 10 ⁹ /l	(0.00 - 0.15)	0.04	29/04/25

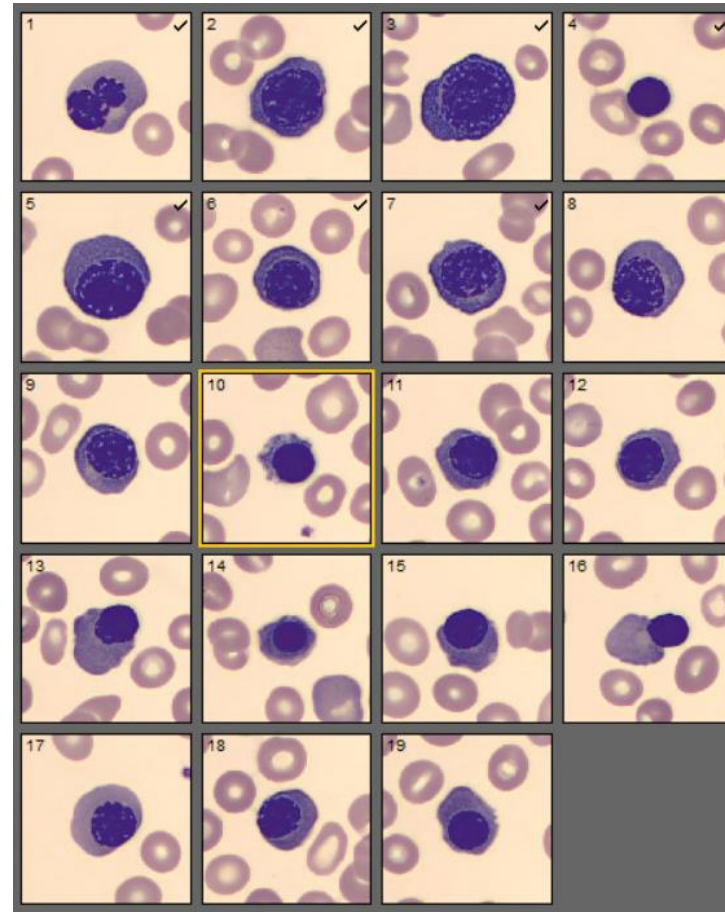
Digitale Mikroskopie



Rote Vorstufen im peripheren Blut

Physiologisch: bei Neugeborenen

- **Gesteigerter Erythrozytenumsatz**
 - Starke/akute Blutverluste
 - Schwere Hämolyse (AIHA)
- **Knochenmarkserkrankungen**
 - Myelofibrose (PMF)
 - Leukämien
 - MDS
 - KM-Infiltration
- **Asplenie** (Splenektomie, funktionell)
- **Schwere Infektionen/Sepsis**
- **Extramedulläre Blutbildung**



Klinik

Claudia Hos

BHS Linz

Interne I, Hämato-Onkologie

Vorgeschichte:

61 jährige Pat. mit Mamma-CA

- Erstdiagnose Mammakarzinom rechts 03/24
 - + Knochenmetastasen (Rippe, Schulterblatt, Os ilium, Os sacrum,...)
 - Hormonrezeptoren positiv
 - 1. Linie palliativ Kinase-Inhibitor/Letrozol (Antihormonelle Therapie)/Denosumab („Knochenspritze“)
 - Bestrahlung Schulterblatt und Rippe
 - Schmerzen
 - gutes Ansprechen für über 1 Jahr



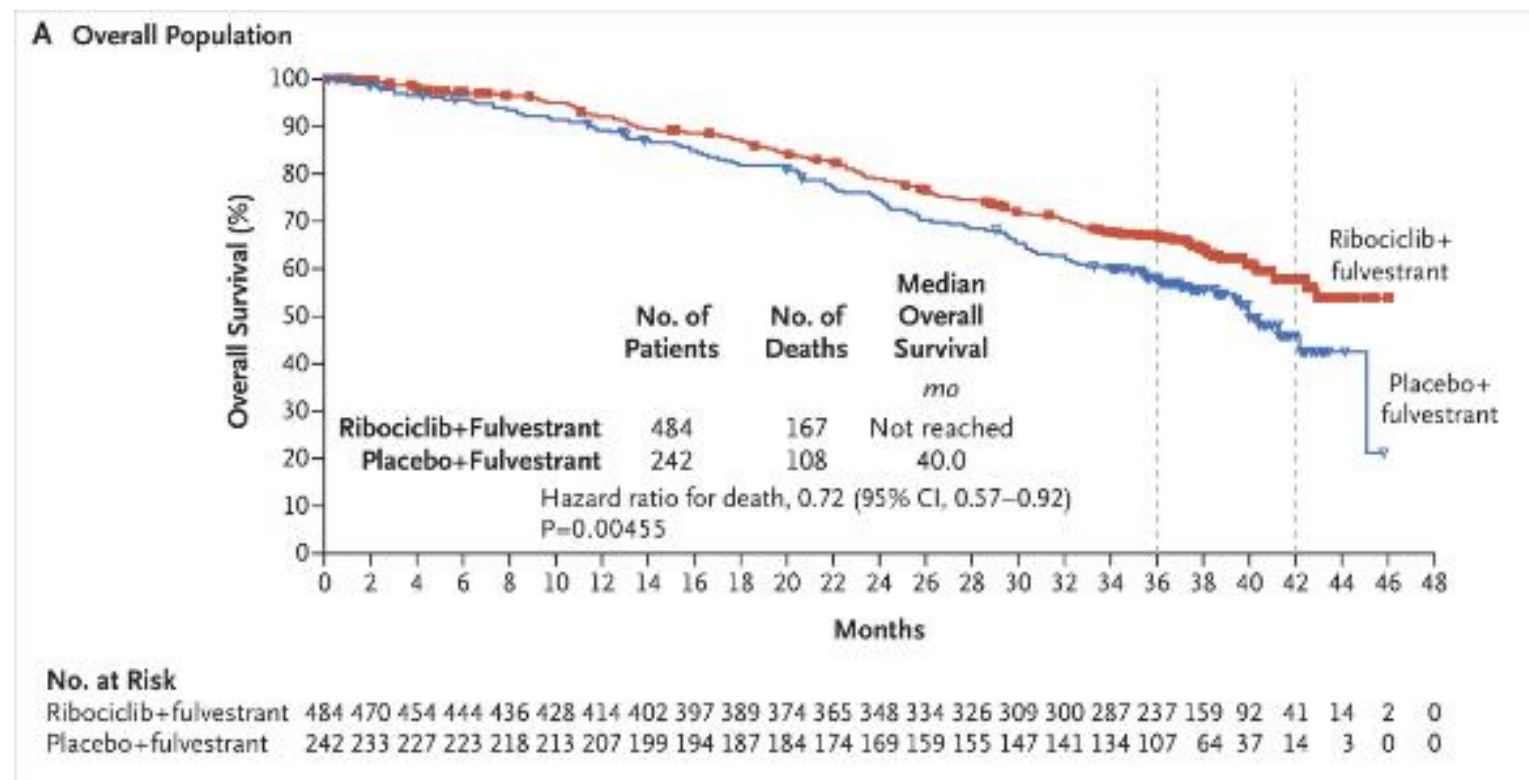
Exemplarische OS-Kurve

(OS = Overall Survival)

Metastasiertes,
Hormonrezeptor positives
Mammakarzinom

Kinaseinhibitor +
Antihormonelle Therapie
Vs.

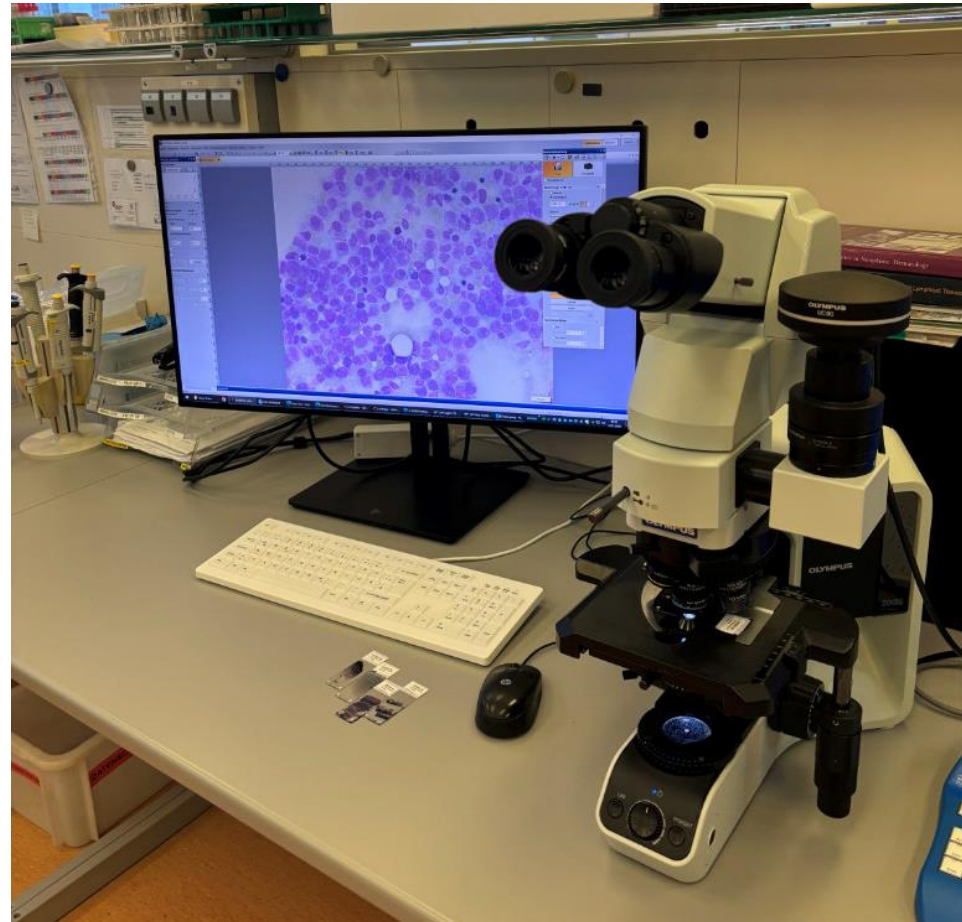
Antihormonelle Therapie



1 Jahr später....

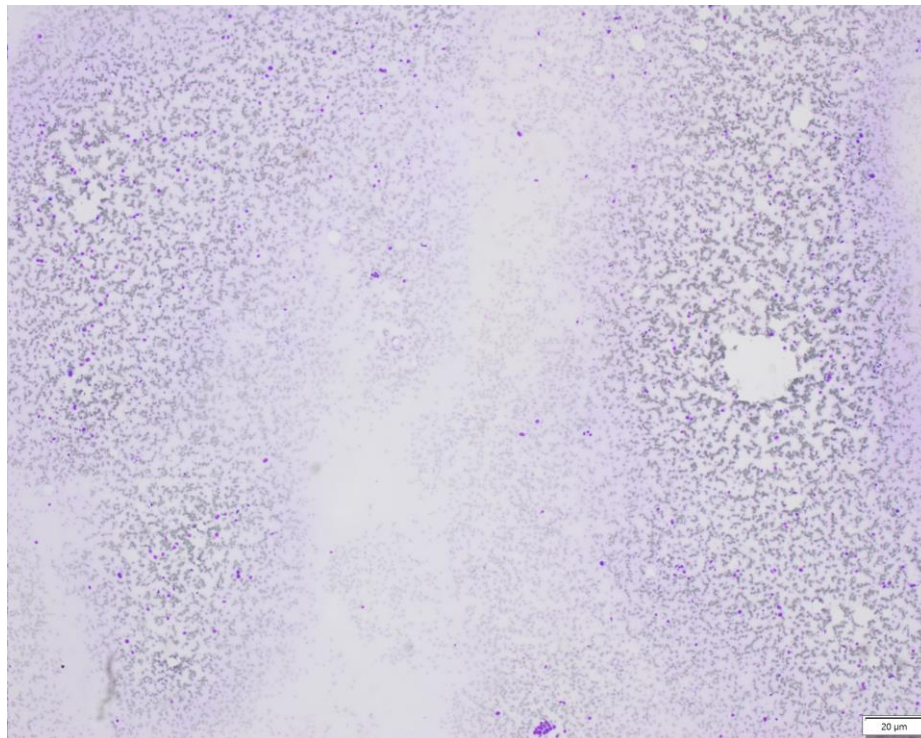
- schlechter Allgemeinzustand + Blässe + Belastungsdyspnoe
- Panzytopenie
 - DD: Medikamentös toxisch DD: hämatologische Neoplasie etc.
- Gabe von 2 EKs
- CT-Stamm zum Re-Staging
 - Einzelne **neue** Herde ossär
- KMP

KM-Zytologie



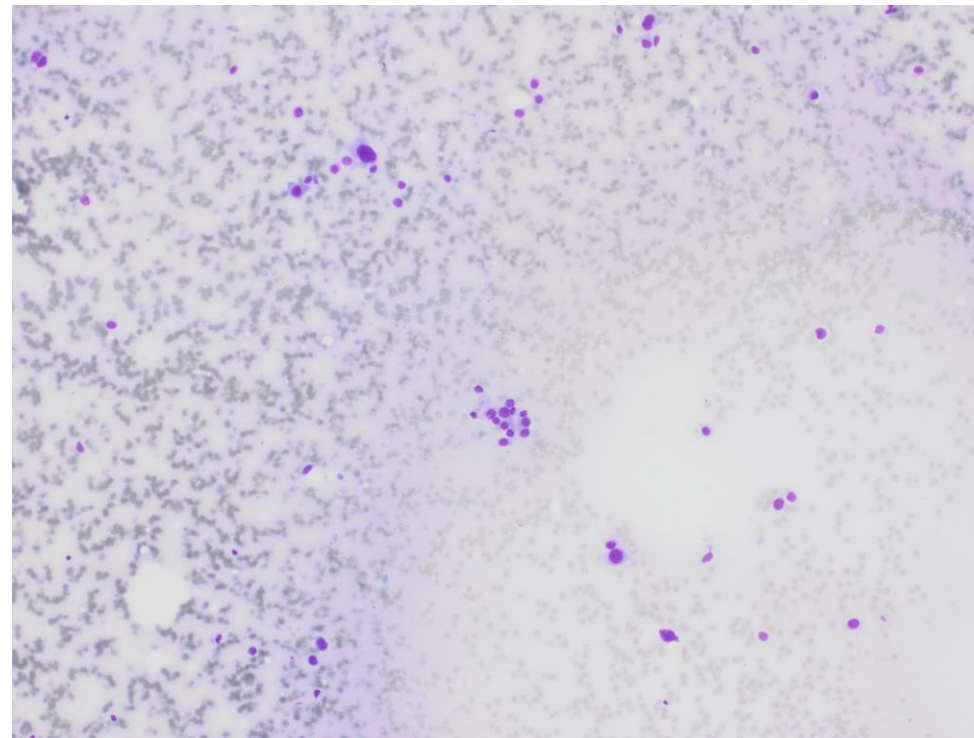
KM-Zytologie

Hypozelluläre Abklatschpräparate



40x

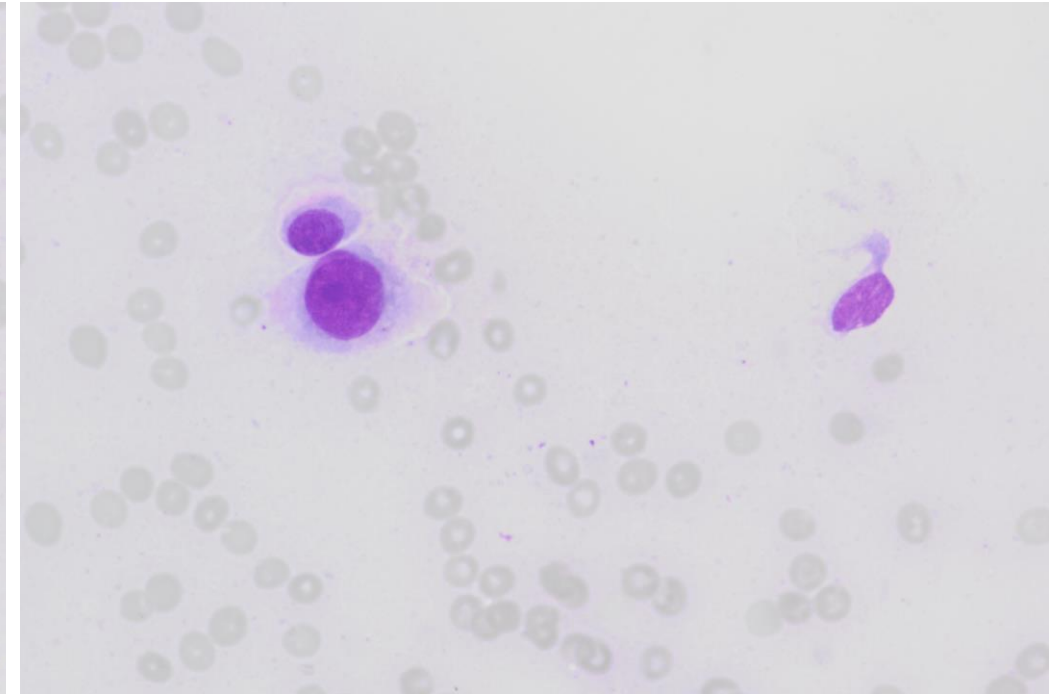
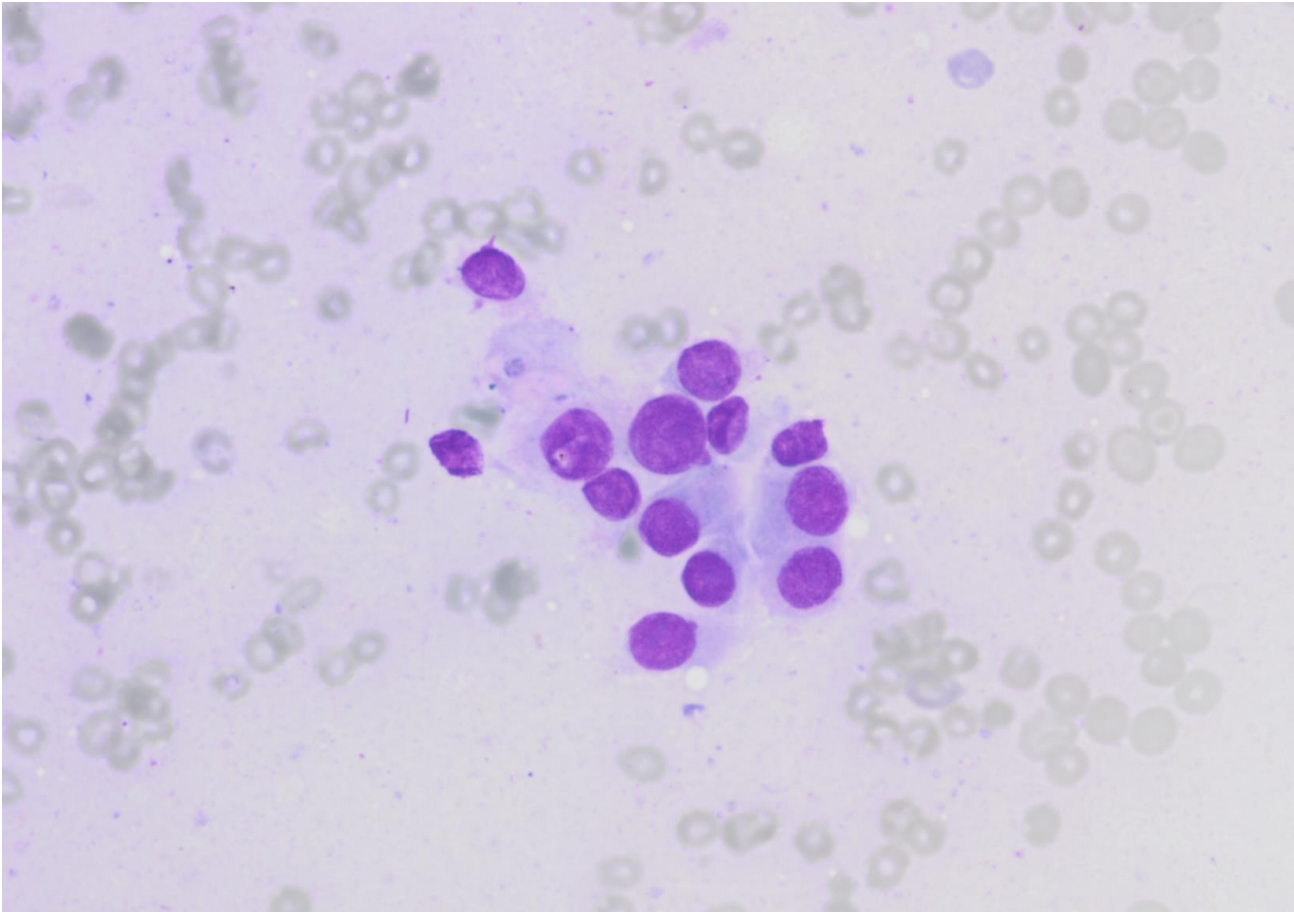
Zellansammlungen



100x

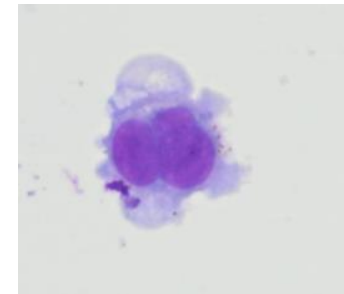
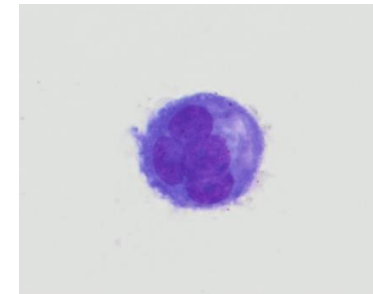
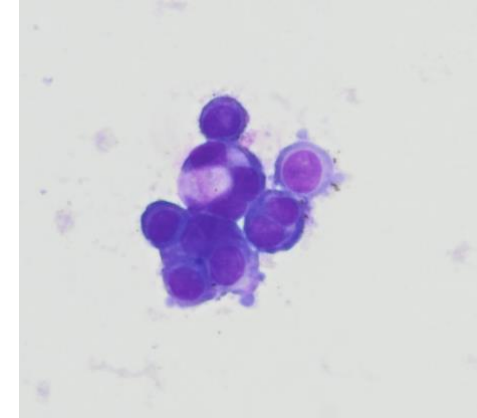
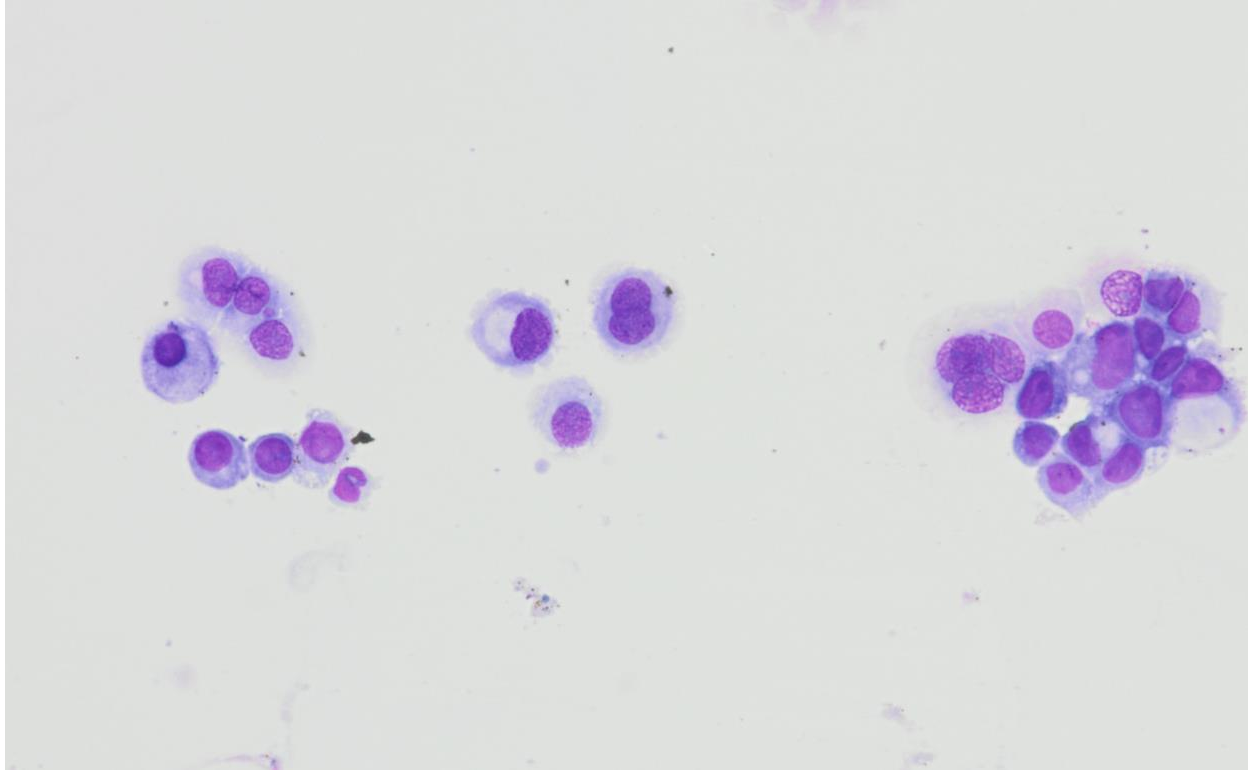
KM-Zytologie

Zellverbände mit Knochenmarksfremden Zellen



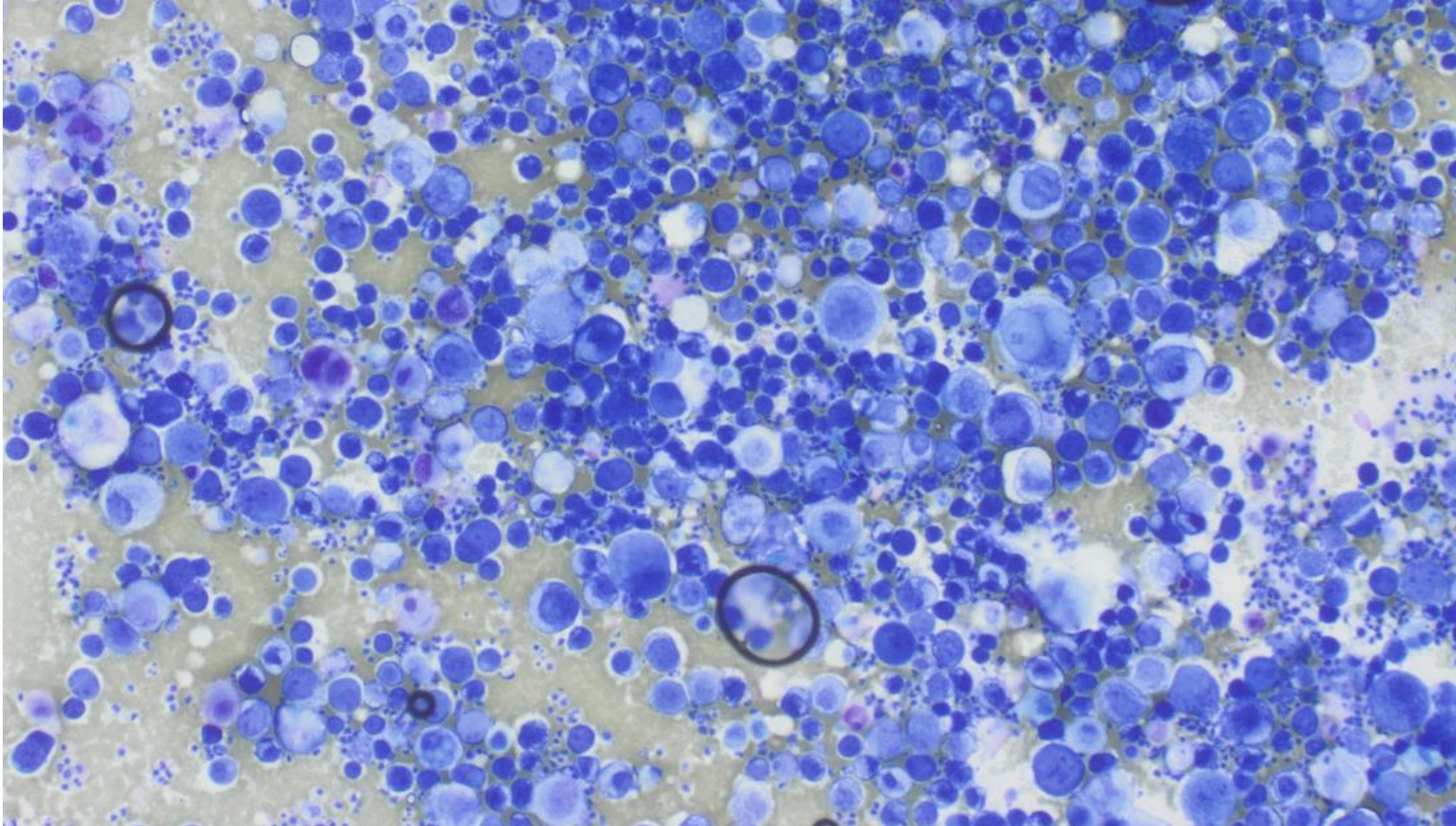
Knochenmarkskarzinose

Tumorzellen Liquor

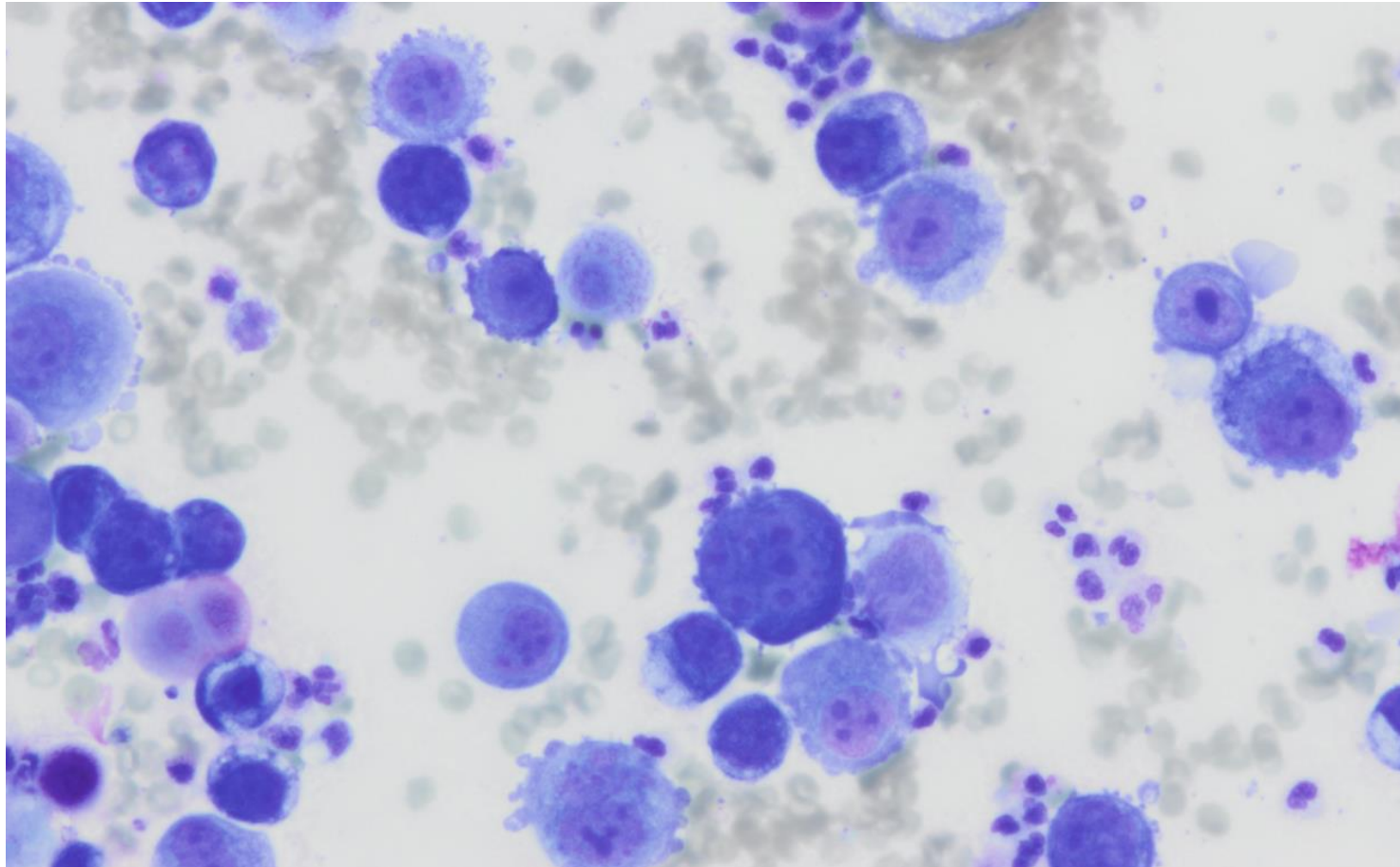


Hinweise: große Zellen, prominente Nucleolen, Kernatypien, atypische Mitosen, Zellverbände, Größenvarianz, Zytoplasmaeinschlüsse

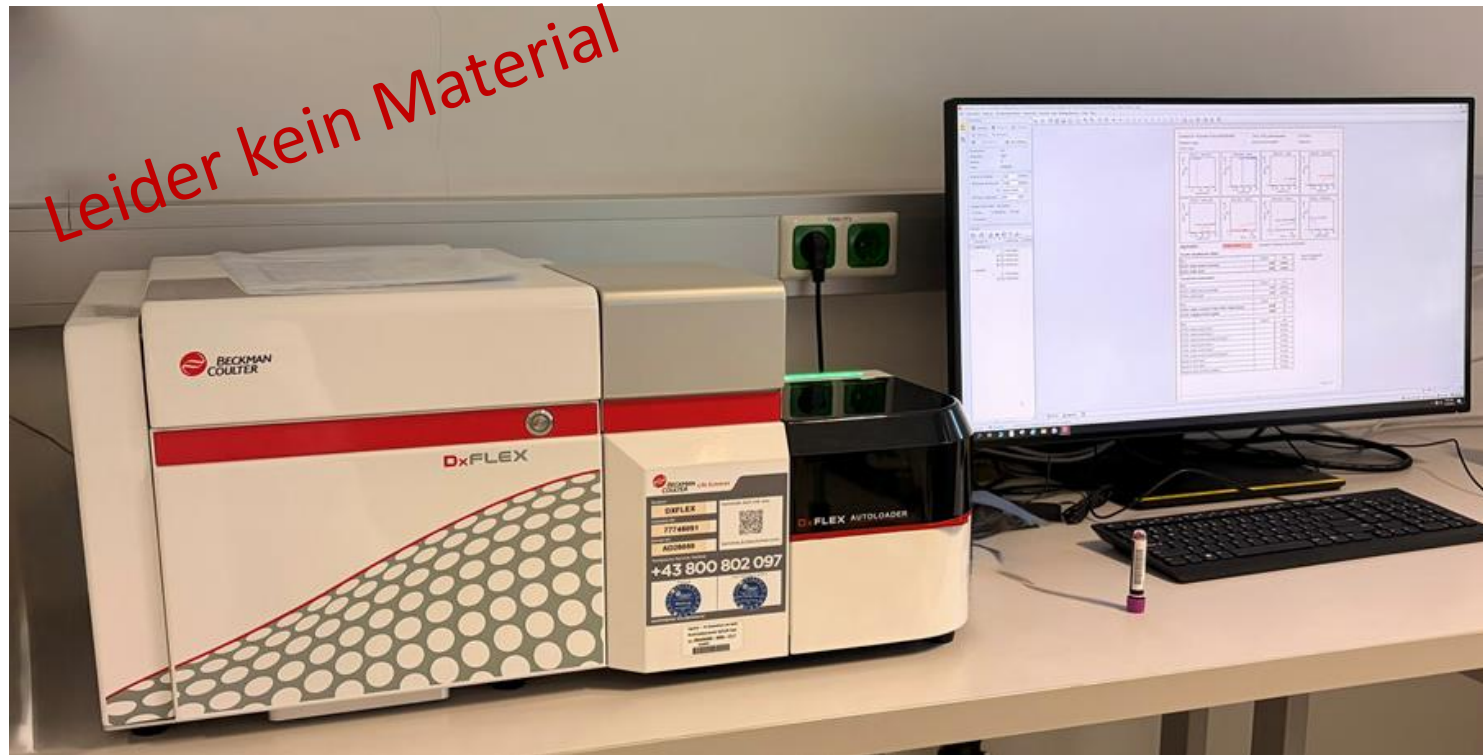
Tumorzellen Pleurapunktat



Tumorzellen Pleura



Durchflusszytometrie



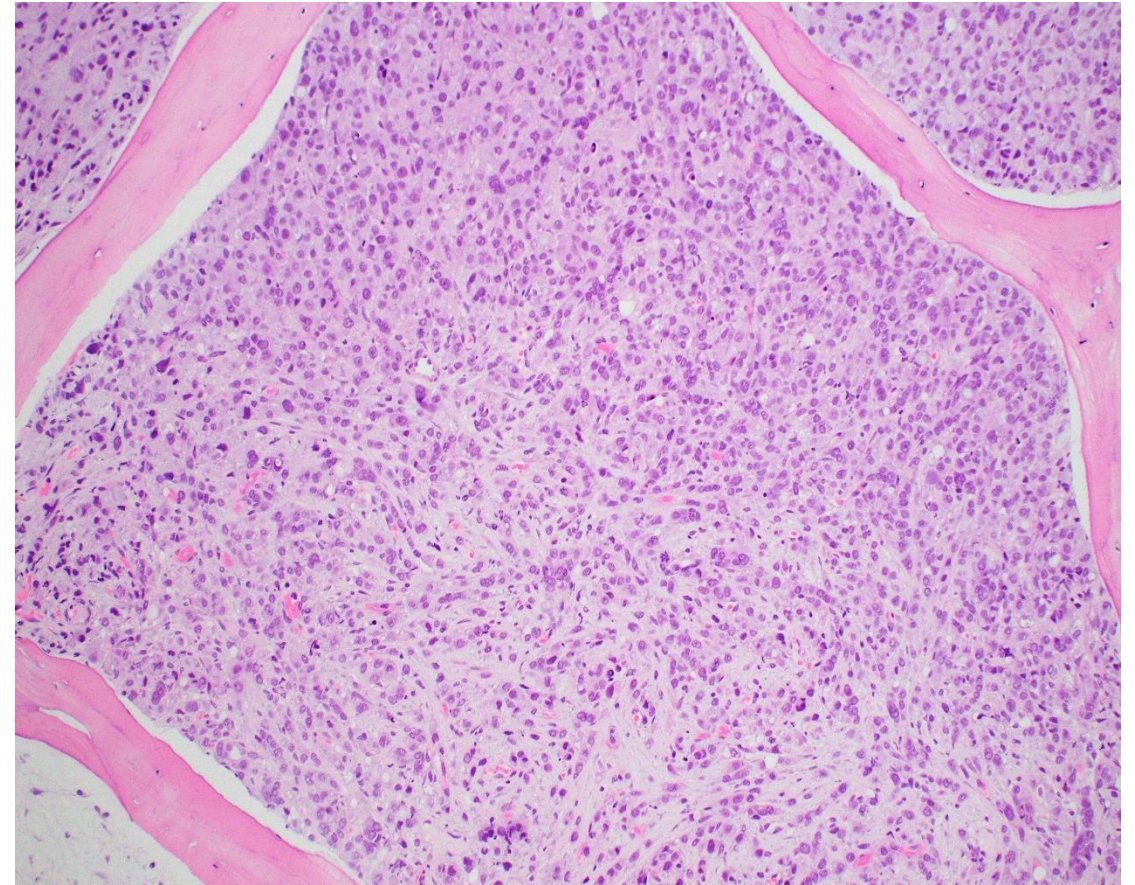
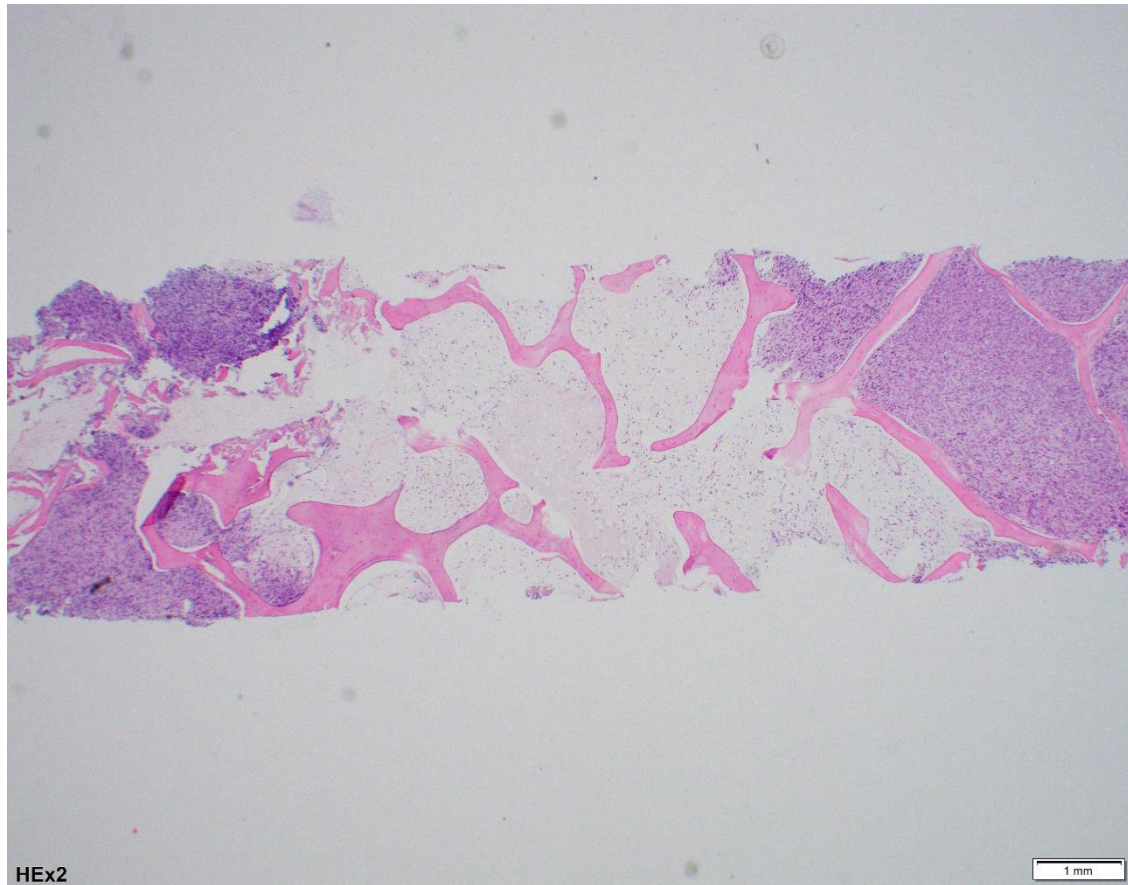
HISTOPATHOLOGIE

Eva Maier

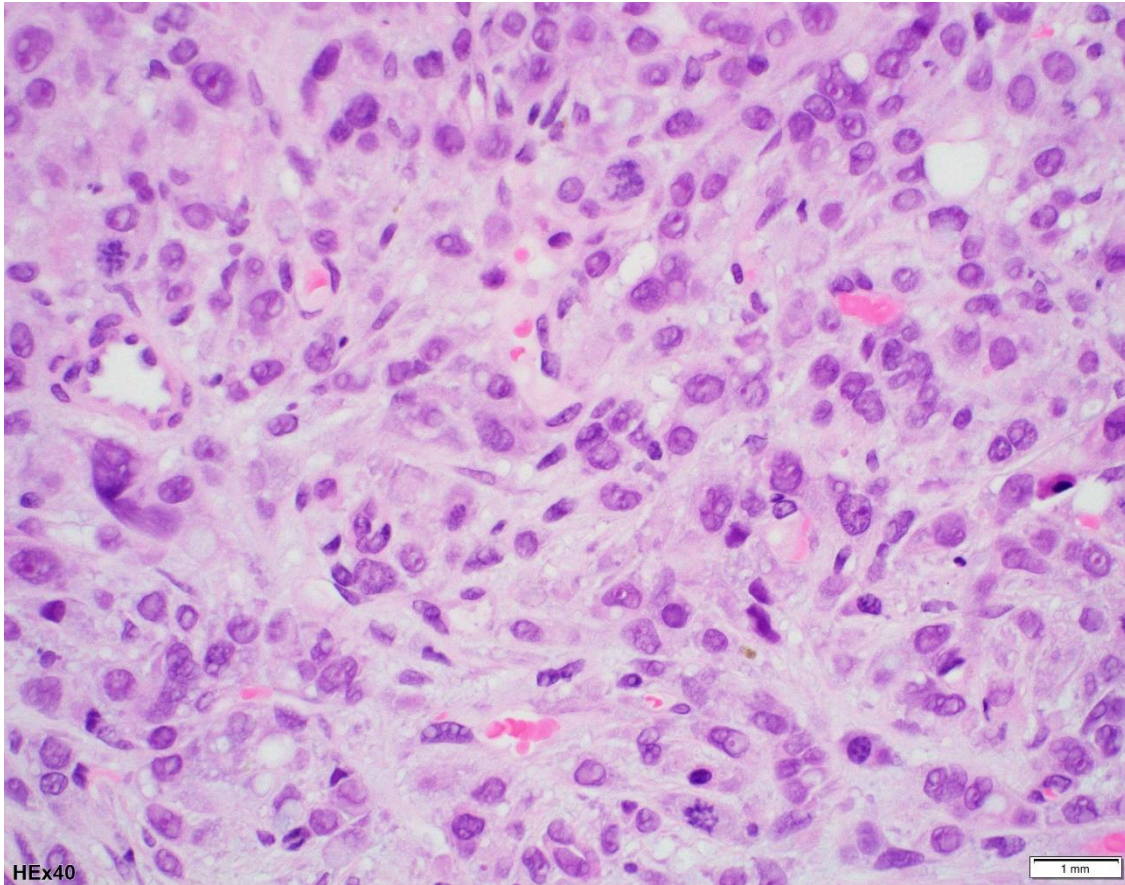
Institut für klinische Pathologie und Molekularpathologie

Vinzenz Pathologieverbund Ordensklinikum Barmherzige Schwestern Linz

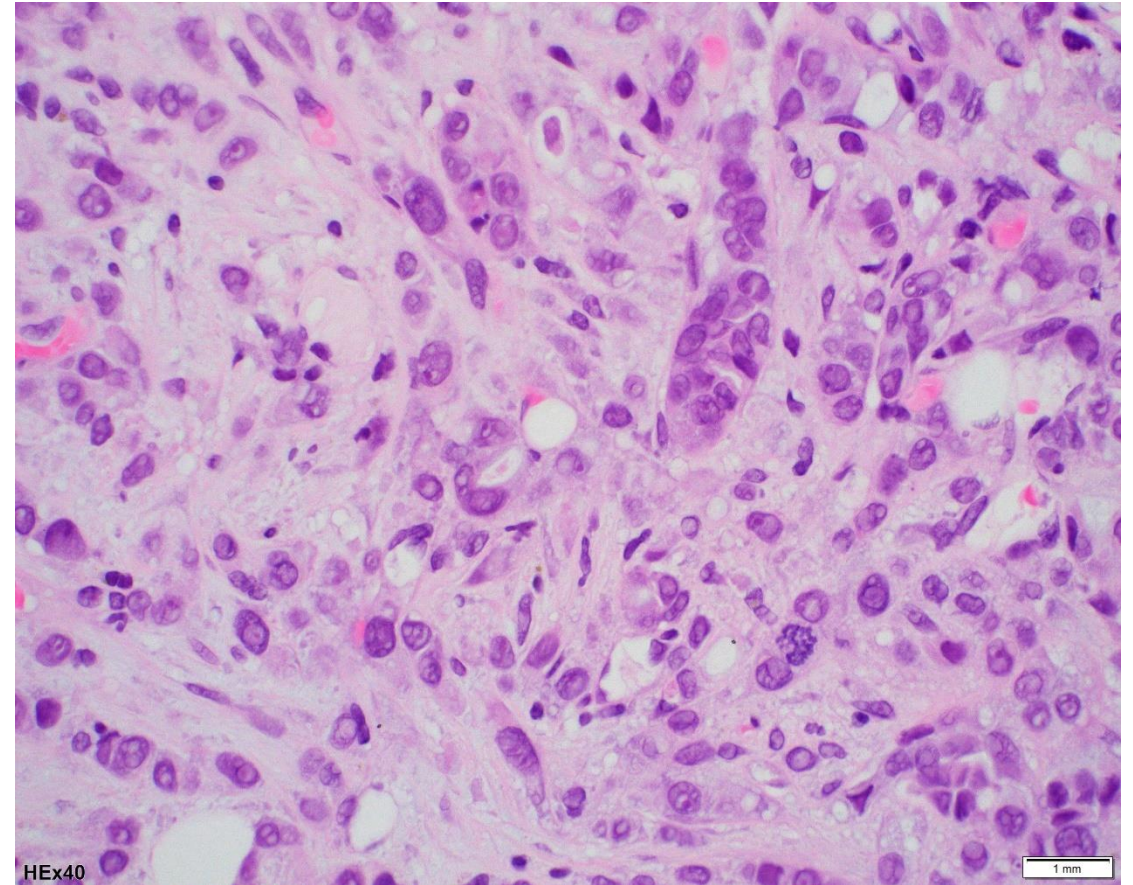
Patientin, geb. 1964



Patientin, geb. 1964

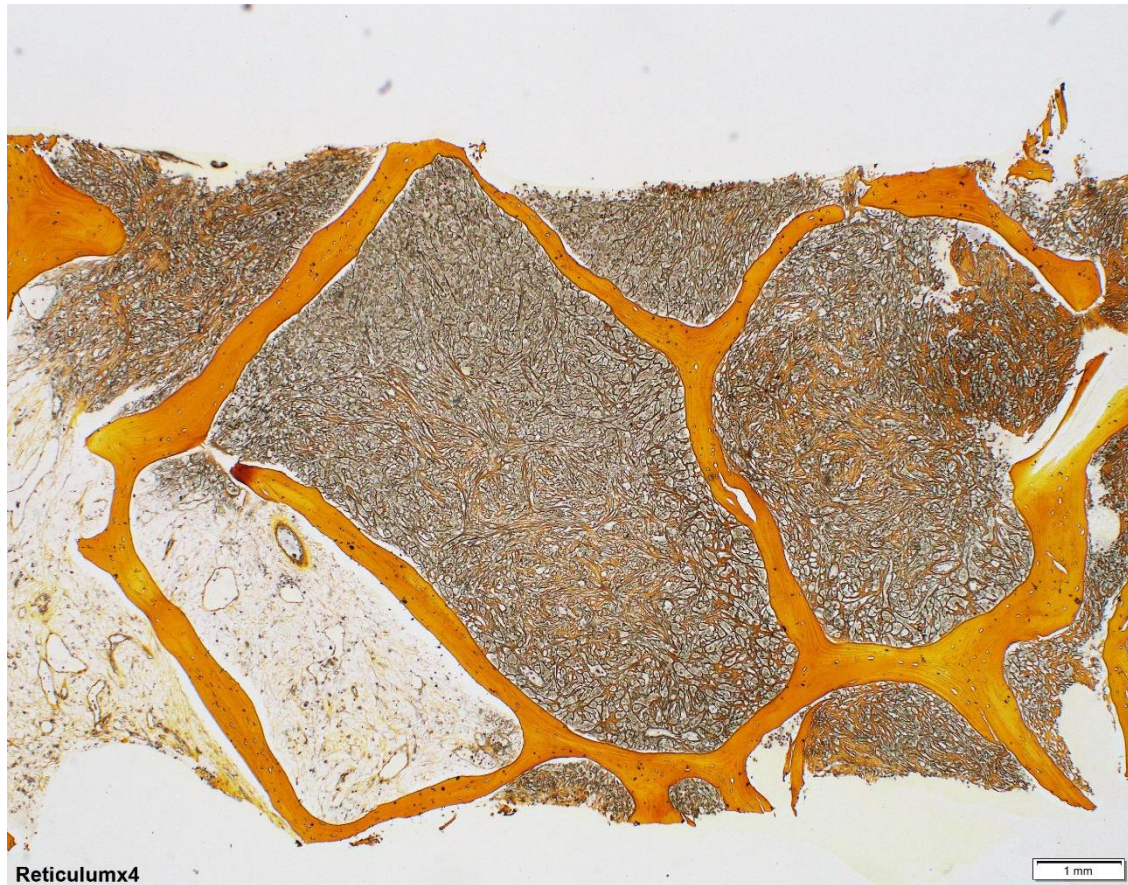


Knochenmarkfremde Zellformen, zahlreiche Mitosen

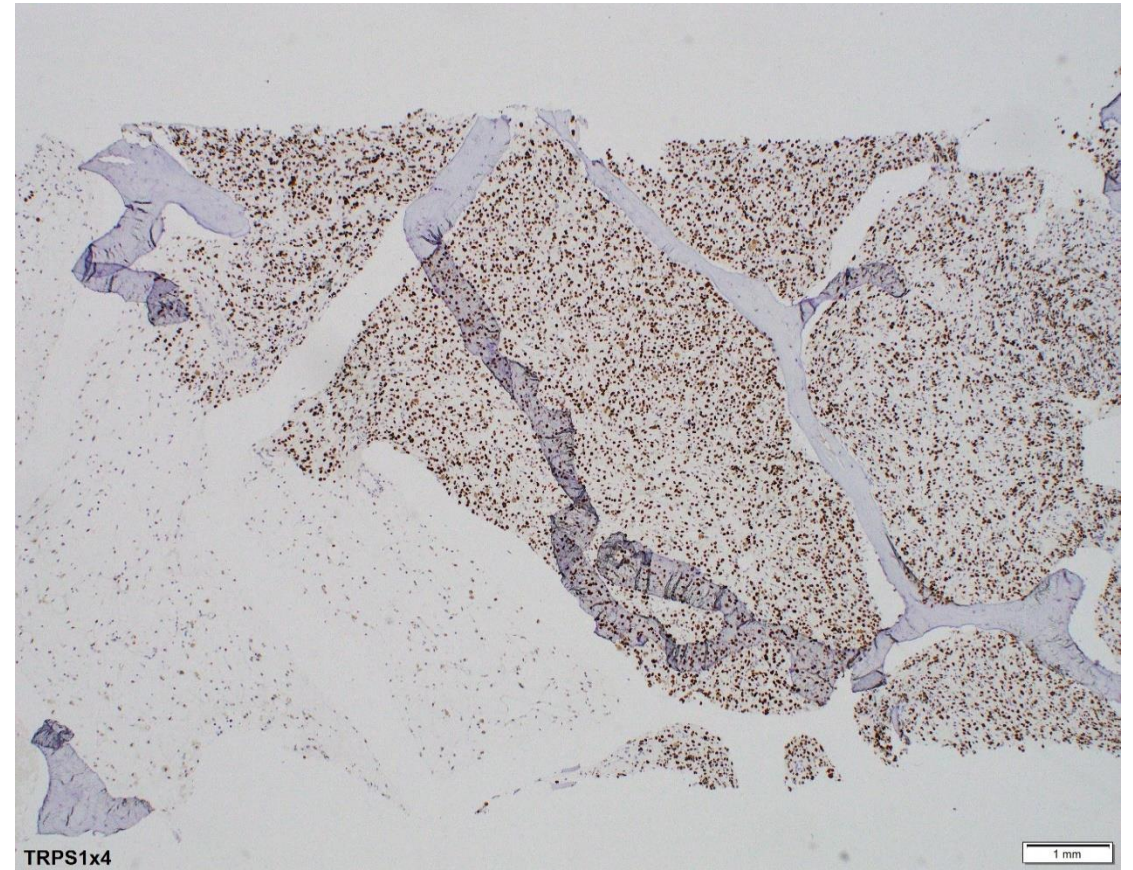


Kernpleomorphie, Zellverband

Patientin, geb. 1964

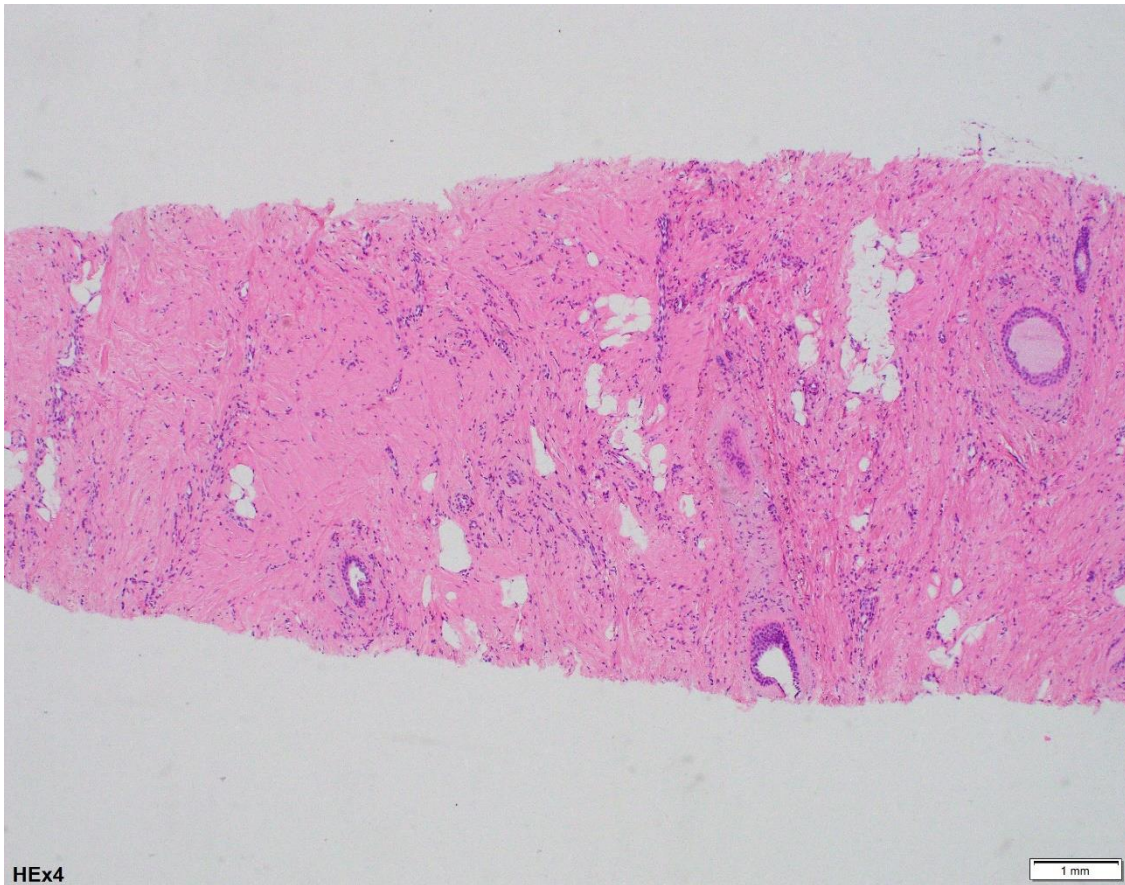


Fibrose (Retikulin- und Kollagenfaserfibrose)

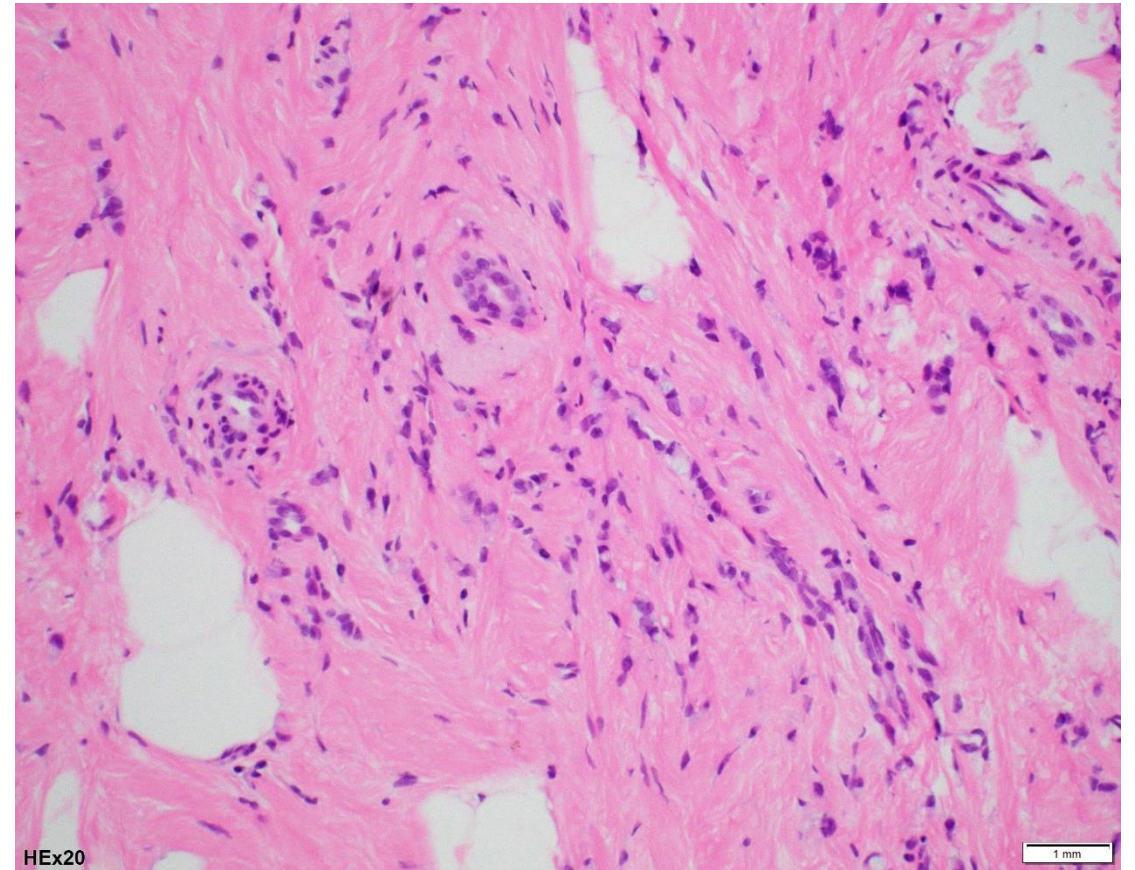


Immunhistochemie TRPS1 +, GATA3 +

Patientin, geb. 1964

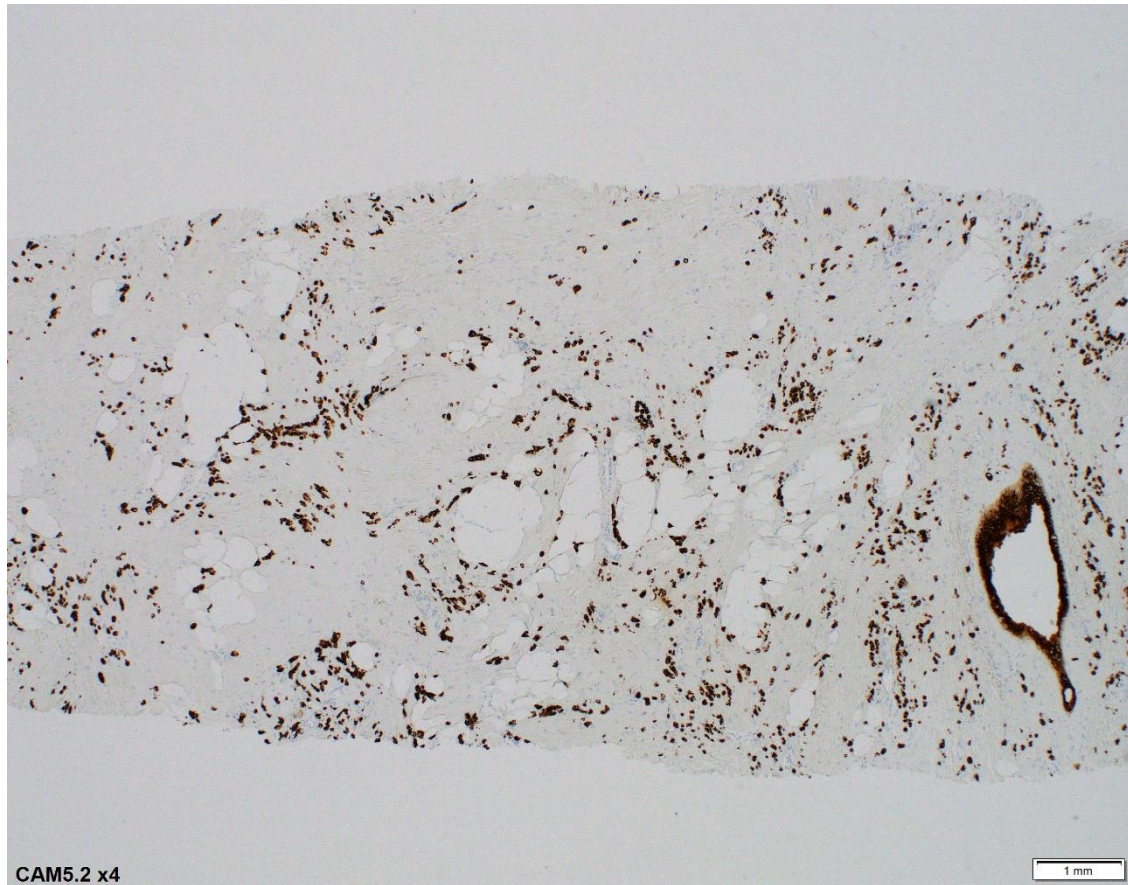


Primum: Mammastanze, diskohäsive Infiltration

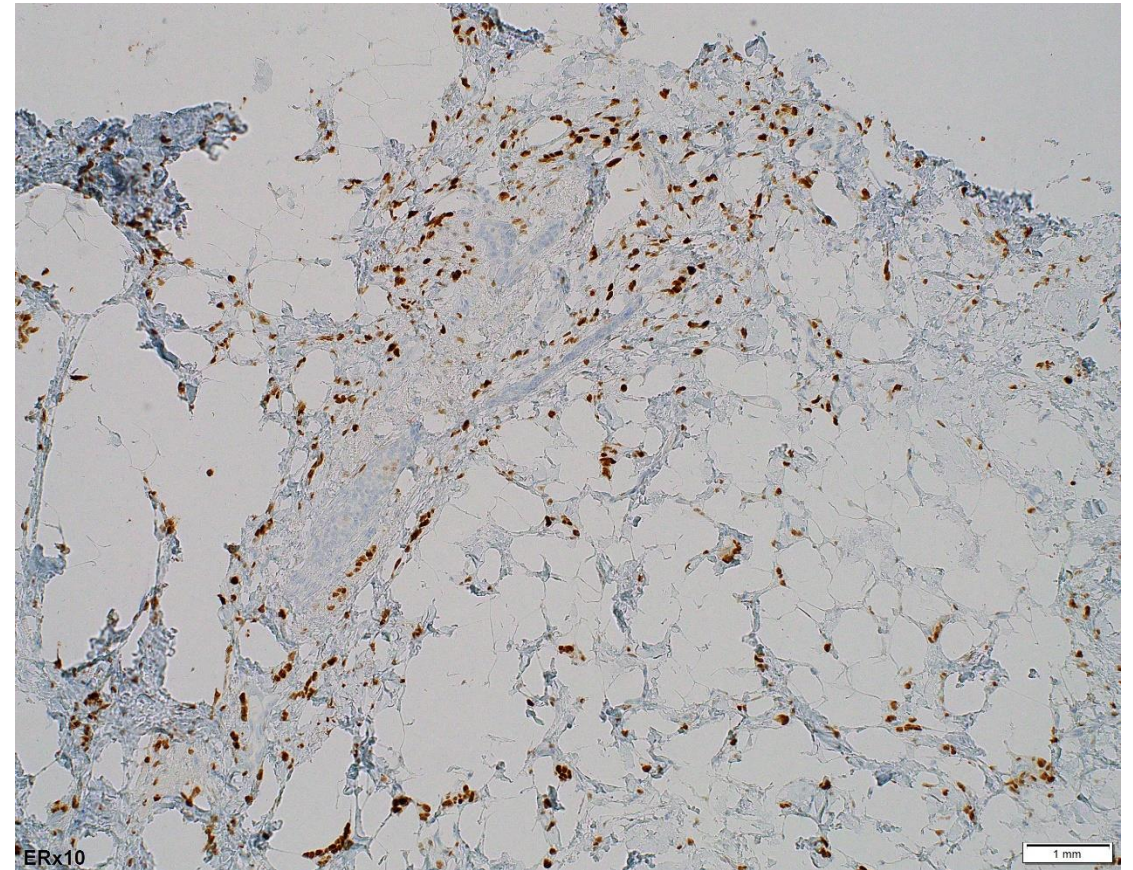


isolierte und linearförmige Lagerung, kleine Zellen

Patientin, geb. 1964



Immunhistochemie Keratinmarker (epitheliale Differenzierung)



Immunhistochemie Östrogenrezeptoren

KNOCHENMARKKARZINOSE

Histologie

- Infiltration durch Knochenmarksfremde Zellen bzw. Karzinomzellen eines lobulär differenzierten Mammakarzinoms

Knochenmarkkarzinose durch vorbekanntes lobuläres Mammakarzinom, hier in der pleomorphen Variante (ILC Grad 3).

Keine Hämatopoese dargestellt.

- Immunhistochemie: Expression von Keratinen, TRPS1 +, GATA 3 +, E-cadherin -, Östrogenrezeptoren +/-

Liquid Biopsy

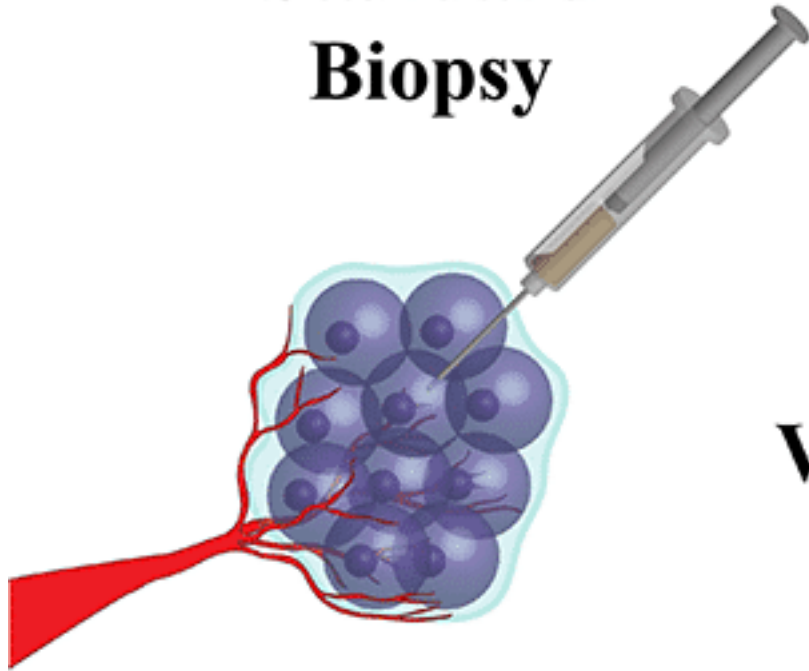
Laura Lamplmayr, Barbara Zellhofer

Was ist Liquid Biopsy?

- nicht invasive Methode zur Analyse von Tumor-DNA direkt im Blut
- Als zirkulierende Tumor-DNA (circulating tumor DNA, ctDNA) bezeichnet man zellfreie DNA-Fragmente, welche von malignen Tumoren oder zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) stammen und in Körperflüssigkeiten (Blut) nachweisbar sind
- Spezielle Abnahmeröhrchen: stabilisieren kernhaltige Zellen und verhindern die Freisetzung von genomischer DNA

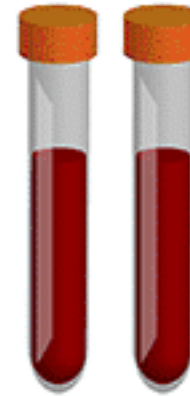


Standard Biopsy



VS.

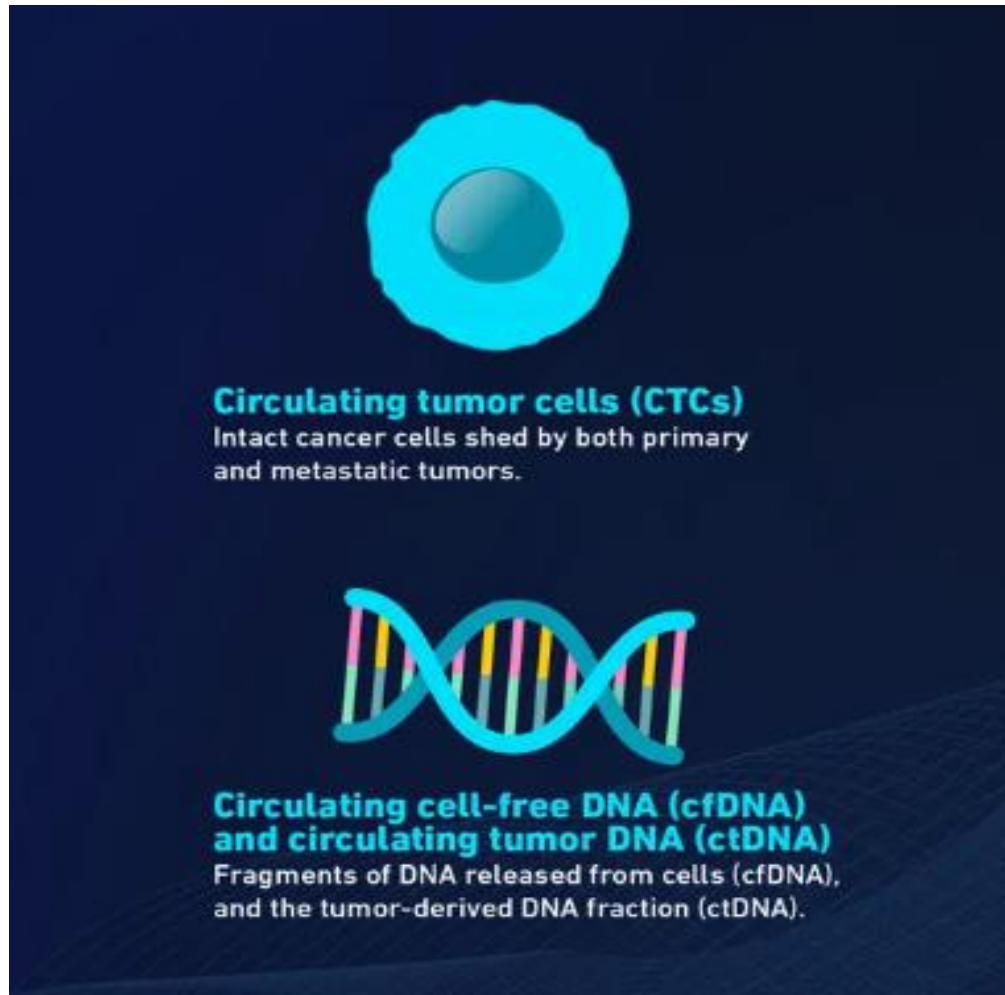
Liquid Biopsy



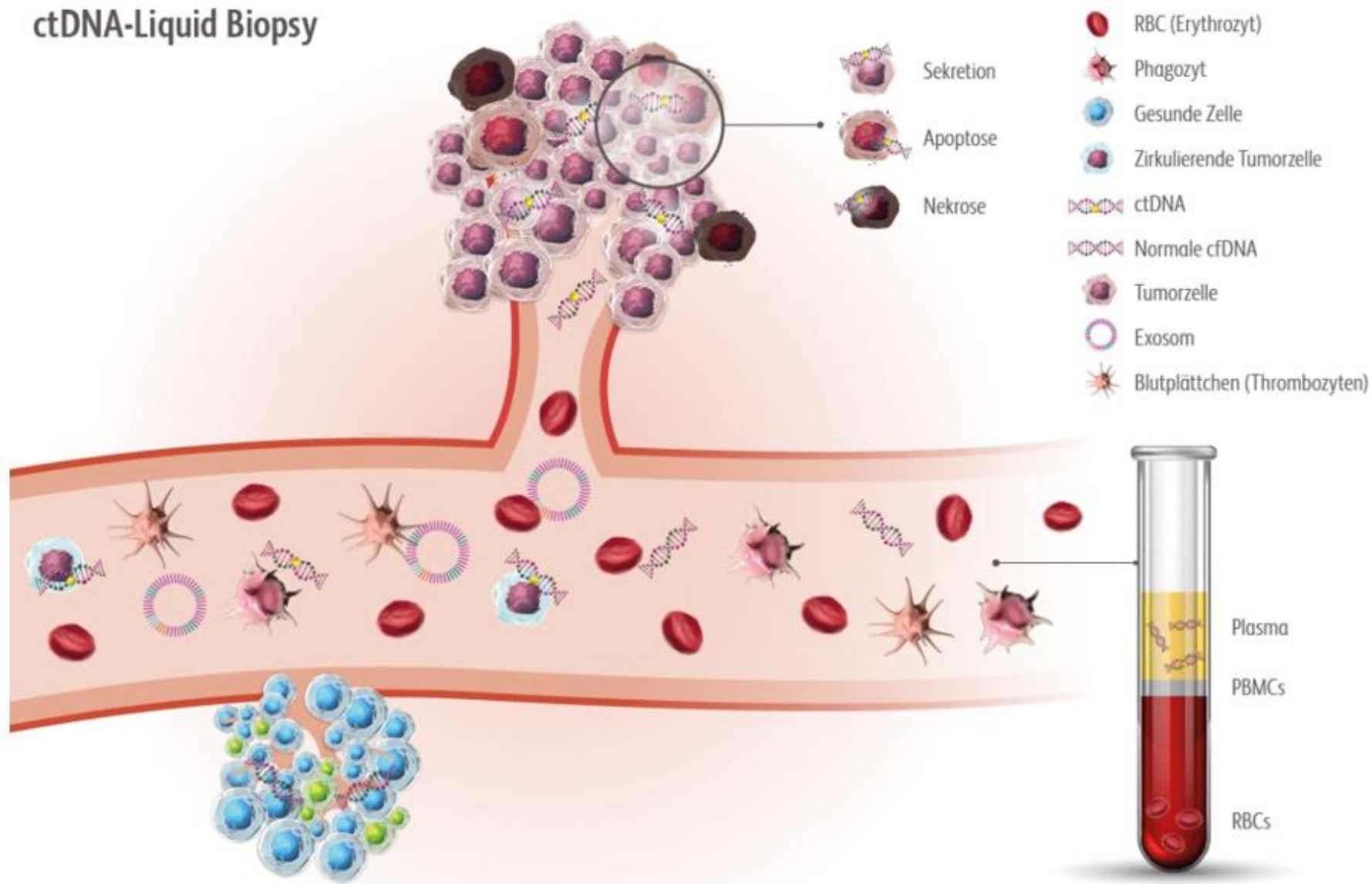
Time-Intensive Procedure
Localized Sampling of Tissue
Not Easily Obtained
Some Pain/Risk
Invasive

Quick
Comprehensive Tissue Profile
Easily Obtained
Minimal Pain/Risk
Minimally Invasive

Was kann mit Liquid Biopsy detektiert werden?



ctDNA-Liquid Biopsy



- Die ctDNA Fragmente gelangen entweder durch Apoptose oder Nekrose (Absterbemechanismen) oder durch aktive Sekretion und Migration aus der Läsion in den Blutkreislauf
- Bei normalen physiologischen Bedingungen werden Ablagerungen durch Phagozyten beseitigt
- Tumorzellen sind jedoch groß und teilen sich schnell so dass die Phagozytose nicht effizient ist
- -> Ansammlung von Zellrückständen und Freisetzung in den Blutkreislauf

Archer Liquid Plex Solid Tumor

- NGS-Panel
- Zur Untersuchung von Liquid Biopsy Proben
- Nachweis somatischer Hotspotmutationen von 28 Genen bei soliden Tumoren (Mamma, Kolon,...)
- Sensitivität 0,5%
- Zweck der Untersuchung: Bestimmung von genetischen Varianten die diagnostisch, prognostisch oder prädiktiv als Biomarker eingesetzt werden können

Klinische Anwendungen der Liquid Biopsy

- Diagnosestellung:
 - erste Charakterisierung des Tumors
- Therapiewahl:
 - Identifikation zielgerichteter Therapieoptionen
- Monitoring:
 - Verlaufskontrolle während und nach Behandlung
- Resistenzmechanismen:
 - Früherkennung von Therapieversagen

Untersuchte Gene in unserem Panel

AKT1, ALK, AR, BRAF, CDK6, CTNNB1, EGFR, ERBB2, ERBB3, ESR1, FGFR1, FGFR2, FGFR3, HRAS, IDH1, IDH2, KIT, KRAS, MAP2K1, MET, NRAS, NTRK1, NTRK2, NTRK3, PDGFRA, PIK3CA, RET, ROS1, TP53

Hotspot-Gene für Mamma: ESR1, ERBB2, PIK3CA

Hotspot-Gene für Kolon, Pankreas: KRAS, NRAS, BRAF

Hotspot-Gen für Lunge: EGFR

Die Liquid Biopsy wird derzeit vor allem bei Brustkrebspatient:innen mit hormonsensiblen, HER2-negativem, fortgeschrittenem Brustkrebs eingesetzt, um genetische Mutationen zu identifizieren

Bei HER2-negativem Brustkrebs fehlen spezifische Rezeptoren, die sonst für zielgerichtete Therapien verwendet werden. Das bedeutet, dass eine angepasste und effektivere Therapie lange Zeit nicht möglich war. Hier kommt die Liquid Biopsy ins Spiel: Durch die Analyse von zirkulierender Tumor-DNA im Blut können spezifische genetische Mutationen identifiziert werden, die in den Tumorzellen vorhanden sind. Diese Informationen ermöglichen es, auch beim HER2-negativen Brustkrebs zielgerichtete Therapien anzuwenden.

PIK3CA-Mutation

- Fördert Wachstum und Metastasierung der Krebszellen
- Zielgerichtete Therapie: Alpelisib

ESR1-Mutation

- Fördert Wachstum der Krebszellen und verursacht Therapieresistenz
- Zielgerichtete Therapie: Elacestrant

Absender (bitte genaue Anschrift)	Material (Express Versand ungekühlt bei Frischmaterial)
 KH der Barmherzigen Schwestern Linz Betriebs GmbH Interne 1 632212 Leiter: Prim. Doz. Dr. Holger Rumpold Stempel / Arzt: <u>H. Rumpold</u>	☐ Paraffinschnitte auf Objektträgern (entparaffiniert!) für FISH ☐ Paraffin Röllchen (2 Röhrchen jeweils 5 Schnitte mit 10µM) Molekulargenetik ☐ Natives Material (unfixiert) ☐ Peripheres Blut (10 ml EDTA) ☒ Peripheres Blut (30 mL in cfDNA Spezialröhrchen!) <u>3x20</u> <u>mo</u> Histo Nr.: Datum der Probenentnahme: <u>26.06.2025</u>
Klinische Angaben / Diagnose	
<u>Mammakarzinom met.</u>	
☐ Erstdiagnose ☒ Verlauf ☐ Rezidiv ☐ Therapie Stadium.....	
(Anteil pathologischer Zellen: %) !! unbedingt erforderlich !!	

Über weitere Gene in den jeweiligen Panels informieren wir Sie gerne bzw. finden Sie diese auf unserer Homepage

Für folgende Untersuchungen (außer MSI und MLH1- Methylierung) ist eine Einverständniserklärung mitzusenden (Homepage):

Mutationsanalyse an Gewebe

Gastrointestinale Tumore

- ☐ 48 Gene inkl. KRAS, NRAS, BRAF, KIT, PDGFRA, u.a.
- ☐ MSI (Vergleichsgewebe plus Tumor!)
- ☐ MLH1-Methylierung

Mammakarzinom

- ☒ 500 Gene inkl. BRCA, PIK3CA, Fusionsgene u.a.
- ☐ ERBB2/HER2neu FISH

Pankreaskarzinom

- ☐ 500 Gene inkl. BRCA, HRD Score

Ovariakarzinom

- ☐ 500 Gene inkl. BRCA, HRD Score

Diverse Tumore, Mutationssuche

- ☐ TSO500 (500 Gene inkl. Translokationen, Amplifikationen, MSI, TMB)
- ☐ optional inkl. HRD Score (genomische Instabilität, GIS)

Endometriumkarzinom

- ☐ 500 Gene inkl. BRCA, PIK3CA, Fusionsgene, MSI u.a.
- ☐ MLH1-Methylierung
- ☐ POLE

Lungenkarzinome

- ☐ 500 Gene inkl. EGFR, BRAF, ERBB2, MET, ALK, ROS u.a.
- ☐ FISH (☐ ALK / ☐ ROS / ☐ MET)
- ☐ EGFR T790 Resistenz

Melanom

- ☐ 48 Gene inkl. BRAF, NRAS, KIT u.a.

Prostatakarzinom

- ☐ 500 Gene inkl. BRCA, HRD-Gene, MSI u.a.

Mutationsanalyse an cfDNA (Material peripheres Blut in Spezialröhrchen!)

Solide Tumore

- ☒ 28 Gene (Hotspots) inkl. ALK, BRAF, EGFR, ERBB2, ESR1, FGFR1/2/3, KIT, KRAS, MET, NRAS, PIK3CA, RET, TP53, ...

Erbliche Tumore (Material: peripheres Blut) – ! Einverständniserklärung ist unbedingt erforderlich !

- ☐ Hereditäre Tumorerkrankung Next Generation Sequencing, MLPA, SangerSeq
 - ☐ BRCA1/2 solitär
 - ☐ HBOC (erweitertes Panel inkl. BRCA1/2)
 - ☐ Lynch-Syndrom
- ☐ MEN1/2
- ☐ andere Gene/Entitäten.....

Untersuchungsergebnis LiquidPlex Solid Tumor Panel für Mutationen in zirkulierender Tumor DNA solider Tumore

Die Analyse ist nicht im Akkreditierungsumfang.

An der vorliegenden Liquid Biopsy Probe wurden folgende pathogene Varianten detektiert:

Gen....Transkript....Variante.....Aminosäurenänderung....% MAF
PIK3CA..NM_006218.4....c.1624G>A.....p. (Glu542Lys).....11,0
TP53....NM_000546.6....c.733G>A.....p. (Gly245Ser).....14,1

Die vorliegende aktivierende pathogene PIK3CA-Variante E542K war eine der untersuchten Mutationen in der Zulassungsstudie des PIK3CA-Inhibitors Alpelisib im Hormon-Rezeptor positiven, HER-2 negativen fortgeschrittenen Mammakarzinom (PMID: 31091374).

Die pathogene Hotspot-Variante im TP53-Gen G245S führt nicht nur zum Verlust des transaktivierenden Potenzials von TP53, sondern fungiert auch als gain-of-function, welche die Tumorentstehung zusätzlich begünstigt (PMID: 30508182).

CAVE: Eine genetische Analyse mittels Liquid Biopsy ist in Sachen Umfang und Aussagekraft nicht mit einer genetischen Analyse des soliden Tumors vergleichbar. Daher ist eine Diagnostik am Gewebe des soliden Tumors, wenn möglich, empfehlenswert.

Anmerkung:

Varianten unklarer Signifikanz ohne aktuell beschriebenem Zusammenhang mit Mammakarzinom werden nicht berichtet.

*****ZUSAMMENFASSUNG*****

In der Liquid Biopsy wurde die pathogene PIK3CA-Variante E542K nachgewiesen, welche eine der untersuchten Mutationen in der Zulassungsstudie des PIK3CA-Inhibitors Alpelisib im Hormon-Rezeptor positiven, HER-2 negativen fortgeschrittenen Mammakarzinom war.

Zusätzlich zeigte sich eine pathogene TP53-Variante.

Untersuchungsergebnis LiquidPlex Solid Tumor Panel für Mutationen in zirkulierender Tumor DNA solider Tumore

Die Analyse ist nicht im Akkreditierungsumfang.

An der vorliegenden Liquid Biopsy Probe wurden folgende pathogene Varianten detektiert:

Gen.....Transkript.....Variante.....Aminosäurenänderung....% MAF
ESR1...NM_000125.4....c.1610A>C.....p.(Tyr537Ser).....1,7
TP53...NM_000546.6....c.637C>T.....p.(Arg213Ter).....50,5

Die detektierte ESR1 Variante Y537S liegt innerhalb des in der Phase III EMERALD Studie angegebenen Mutations-Bereichs. In dieser Studie konnte ein signifikant längeres progressionsfreies Überleben von Patienten mit ER-positiv/HER2-negativen fortgeschrittenem Mammakarzinom mit Elacestrant gezeigt werden (PMID: 35584336).

Die nachgewiesene TP53-Variante ist nicht in der Populationsdatenbank GnomAD beschrieben (keine Populationsfrequenz) und führt zu einem vorzeitigen Stop-Codon (Nullvariante).

CAVE: Eine genetische Analyse mittels Liquid Biopsy ist in Sachen Umfang und Aussagekraft nicht mit einer genetischen Analyse des soliden Tumors vergleichbar. Daher ist eine Diagnostik am Gewebe des soliden Tumors, wenn möglich, empfehlenswert.

Anmerkung:

Varianten unklarer Signifikanz ohne aktuell beschriebenem Zusammenhang mit Mammakarzinom werden nicht berichtet.

*****ZUSAMMENFASSUNG*****

In der Liquid Biopsy konnte eine ESR1-Variante (Y537S) nachgewiesen werden. Diese liegt innerhalb des in der Phase III EMERALD Studie angegebenen Mutations-Bereichs. In dieser Studie konnte ein signifikant längeres progressionsfreies Überleben von Patienten mit ER-positiv/HER2-negativen fortgeschrittenem Mammakarzinom mit Elacestrant gezeigt werden (PMID: 35584336).

Zusätzlich zeigte sich eine pathogene TP53-Variante.

Klinik

Claudia Hos

BHS Linz

Interne I, Hämato-Onkologie

Mammakarzinom

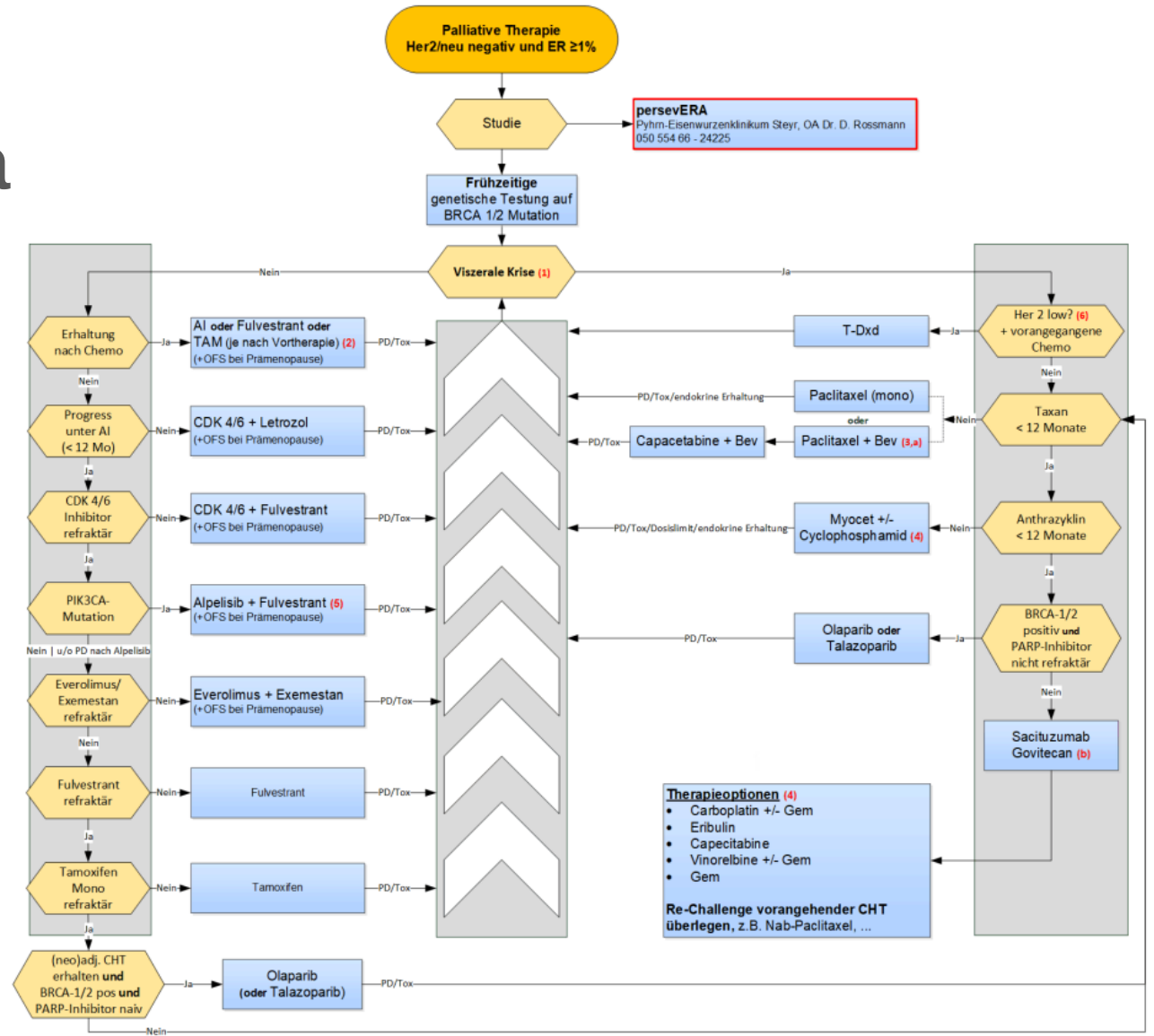
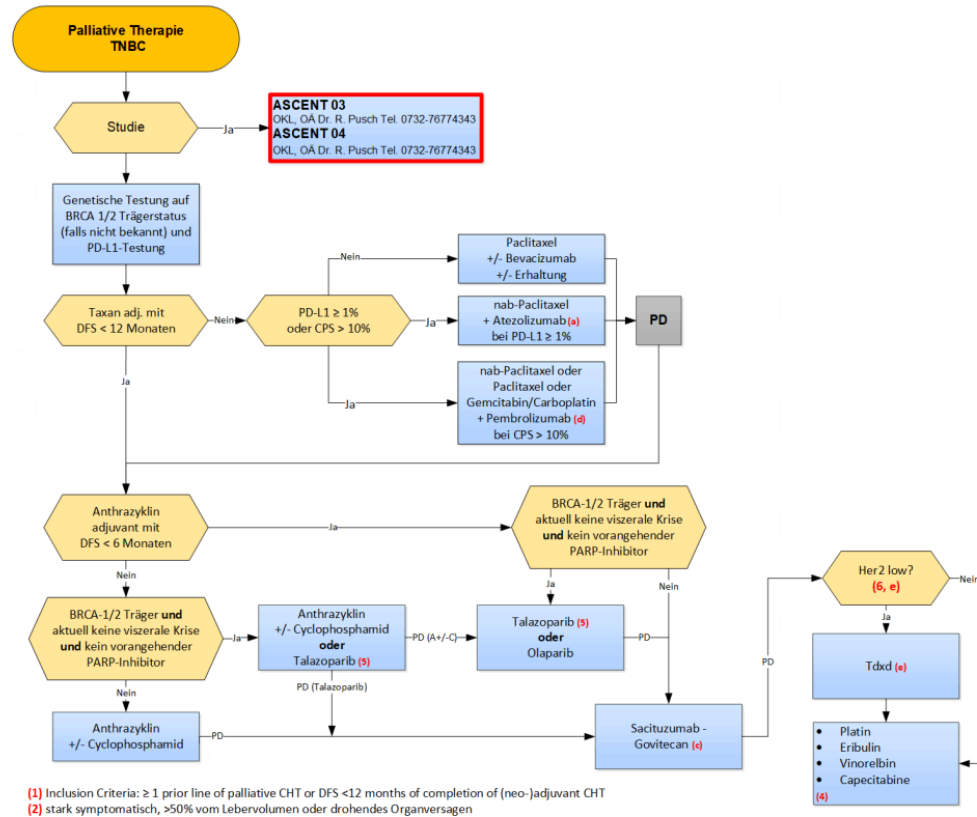
- Häufigste Krebserkrankung bei Frauen
- Ca. 150 Neuerkrankungen pro 100.000 Frauen
- Statistisch erkrankt jede 8. Frau im Laufe ihres Lebens
- Auch Männer können betroffen sein!
- Therapie bei kurativen Ansätzen
 - Operation
 - Antihormonelle Therapie, Antikörper (Her2), Chemotherapie
 - Radiotherapie
 - Gute Prognose!

Prävention

– Lebensstil

- Körperliche Bewegung, normales KG, Begrenzung von Alkohol rotem und verarbeitetem Fleisch, ballaststoffreiche Ernährung, etc.
- Monatliche Selbstuntersuchung
- 1x jährlich Tastuntersuchung durch Ärztin/Arzt bei gynäkologischem Routinebesuch
- Frauen zwischen 50-69 Jahre: Mammographie-Screening-2 jährlich
- Frauen zwischen 40-49 Jahre: ggf. Mammographien, Ultraschalluntersuchungen nach individuellem Abwägen
- **Memo: frühere Screening bei familiärer Belastung!**

Therapie met. Mamma-Ca



Verlauf

- Im KM neue Situation hinsichtlich Rezeptoren:
 - Östrogenrezeptor und Progesteronrezeptor **negativ**
- Therapieumstellung auf Paclitaxel/Bevacizumab (dosisreduziert)
 - Tc – steigende Tendenz
 - ANC – normalisiert (sogar unter Chemo ohne GCSF!)
 - Hb – EK Gabe ca alle 6 Wochen + Erythropoetin Gabe
 - Im PET-CT schließlich leichte Befundverbesserung
- Moderate Lebensqualität trotz Erkrankung, ECOG 1