

# CITOGENETICA DELLE NEOPLASIE ONCOEMATOLOGICHE

## 1.0 INTRODUZIONE

## 2.0 CITOGENETICA CONVENZIONALE

### 2.1 ASPETTI TECNICI

### 2.2 CAMPIONI BIOLOGICI e TECNICHE DI COLTURA

### 2.3 ANALISI CROMOSOMICA

## 3.0 CITOGENETICA MOLECOLARE

### 3.1 IBRIDAZIONE IN SITU FLUORESCENTE (FISH)

### 3.2 ASPETTI TECNICI

### 3.3 ANALISI FISH

### 3.4 SENSIBILITA' E SPECIFICITA'

## 4.0 CONTROLLO DEI PROCESSI

## 5.0 REFERTAZIONE

## 6.0 BIBLIOGRAFIA

### NOTA:

Il documento è il risultato di un lavoro di analisi e discussione di un gruppo di genetisti che opera in ambito diagnostico sulle neoplasie oncoematologiche appartenenti alla SIGU e rientra nei progetti del GDL Genetica Oncologica.

Le persone che hanno collaborato coordinate da MG Tibiletti sono:

Anna Leszl Ospedale di Padova

Ursula Giussani Ospedali Riuniti di Bergamo

Maria Angela Mura Ospedale Niguarda, Milano

Laura Casorzo Ospedale di Candiolo, Torino

Dorotea Gargano Ospedale Careggi, Firenze

Sabine Stioui, Ospedale di Legnano, Milano

Monica Tadorelli Ospedale S. Giovanni Bellinzona

Barbara Bernasconi Università dell'Insubria, Varese

## 1.0 INTRODUZIONE

A partire dalla scoperta del cromosoma Philadelphia, la citogenetica ha acquisito un'importanza crescente nella diagnosi, prognosi e monitoraggio della malattia minima residua in ambito onco-ematologico. Il suo ruolo essenziale è stato ratificato dalla World Health Organization [WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue 3th (2001) and 4th (2008) Editions] con la definizione di precise entità nosologiche proprio sulla base di specifici riarrangiamenti citogenetici e/o molecolari ad esse associati.

Il dato citogenetico/molecolare rappresenta il criterio di elezione per la diagnosi di un numero crescente di neoplasie mieloidi, linfoidi e a fenotipo misto. Ben noto è il valore informativo di molte anomalie cromosomiche nella prognosi e nella pianificazione terapeutica dei pazienti.

Il successo dell'Imatinib nel trattamento della leucemia mieloide cronica, e più in generale degli inibitori delle tirosina-chinasi in un ampio spettro di patologie oncologiche, ha iniziato una nuova era in cui strategie terapeutiche indirizzate specificamente contro un determinato bersaglio molecolare (*target therapy*), rendono indispensabile l'analisi citogenetica e molecolare per l'identificazione di sottogruppi di pazienti sensibili a particolari farmaci.

L'analisi citogenetica classica, pur in presenza di criticità metodologiche rimane ancora oggi la tecnica di elezione per la definizione di tutte le anomalie cromosomiche delle cellule neoplastiche in attiva proliferazione. Tra le tecniche di citogenetica molecolare l'Ibridazione in situ fluorescente (FISH) è oggi riconosciuta come rilevante nella pratica diagnostica per la sua capacità di identificare specifiche anomalie citogenetiche con elevata sensibilità anche in cellule non proliferanti.

L'analisi citogenetica delle neoplasie oncoematologiche deve essere eseguita sul tessuto d'elezione e deve utilizzare tutte le strategie tecniche disponibili per ottenere metafasi e nuclei interfasiche delle cellule neoplastiche specifiche.

Una analisi completa del cariotipo e dei possibili riarrangiamenti molecolari presenti, deve essere eseguita al momento dell'esordio della patologia per definire il profilo citogenetico basale del paziente e, in seguito, ad intervalli regolari per il monitoraggio dell'evoluzione della malattia e della risposta alla terapia.

In tutte le fasi, in particolare in quella iniziale quando non è ancora disponibile una diagnosi definitiva, una stretta collaborazione tra citogenetista e diverse figure professionali, quali l'ematologo, il patologo, il citofluorimetrista, l'oncologo è fondamentale per l'adeguatezza delle procedure e delle strategie analitiche da individuare.

## 2.0 CITOGENETICA CONVENZIONALE

### 2.1 ASPETTI TECNICI

La sensibilità dell'analisi citogenetica nelle neoplasie oncoematologiche è fortemente influenzata da alcune peculiarità del tessuto neoplastico quali:

- il tipo di campione biologico analizzato
- la coesistenza nello stesso campione di cellule normali e cellule tumorali
- la presenza di linee cellulari geneticamente differenti in conseguenza dell'eterogeneità intratumorale
- la possibilità che alcune anomalie siano confinate in particolari tipi di cellule (es. plasmacellule nel mieloma multiplo).

Si raccomanda pertanto l'utilizzo di specifiche strategie analitiche e pre-analitiche per ottenere analisi citogenetiche rappresentative dello stato della malattia.

In particolare sono disponibili varie metodologie per favorire ed implementare la crescita delle cellule neoplastiche destinate all'analisi citogenetica.

E' inoltre possibile utilizzare tecniche di immuno-separazione per selezionare la tipologia di cellule da analizzare, come nel caso delle cellule CD138 positive per la caratterizzazione di anomalie citogenetiche nel Mieloma Multiplo (MM).

### 2.2 CAMPIONI BIOLOGICI E TECNICHE DI COLTURA

I campioni biologici utilizzati per le analisi di citogenetica oncoematologica sono: il sangue midollare (SM), il sangue periferico (SP) e più raramente campioni di tessuto solido. L'analisi citogenetica prevede l'invio dei campioni biologici sterili "a fresco" e trattati con anticoagulanti appropriati (eparina sodica o litio eparina).

Il SM è il tessuto di elezione nello studio delle neoplasie oncoematologiche. L'analisi citogenetica su SP è utile quando in circolo sono presenti cellule blastiche. In caso di invasione neoplastica è possibile utilizzare campioni di tessuto quali i linfonodi, la milza, altri organi, oppure le cellule dei versamenti sierosi.

Particolare attenzione richiede la caratterizzazione citogenetica dei linfomi maligni: in questi casi l'analisi citogenetica su colture di SM è generalmente meno informativa rispetto all'analisi eseguita su campioni di tessuto solido (linfonodi in caso di linfomi nodali, organi sede di malattia in caso di linfomi extranodali).

Il successo dell'analisi cromosomica nelle neoplasie ematologiche è strettamente correlata all'indice di proliferazione delle cellule neoplastiche della malattia in studio.

Le tecniche di colture cellulari di SM e SP sono definite in base all'indicazione clinica e al materiale biologico disponibile per l'analisi. Per ciascun campione devono essere allestite almeno due colture con tempi differenti. Le colture di SM e SP vengono allestite con terreno RPMI 1640 addizionato con siero, o preferibilmente con terreni, disponibili in commercio, arricchiti con fattori di crescita specifici per malattie oncoematologiche (colture non stimulate). Per favorire la crescita

preferenziale delle cellule neoplastiche le colture possono essere addizionate anche di specifici stimolatori (Colture stimolate). Gli stimolatori più frequentemente utilizzati sono:

- TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate) specifico per le cellule neoplastiche
- PHA (Phytohaemagglutinin) specifica per le cellule T
- Oligonucleotidi DSP30 (Dicker et al., 2006)

Ogni laboratorio deve ottimizzare la propria capacità di identificare anomalie citogenetiche nelle neoplasie oncoematologiche mediante l'adozione delle strategie di coltura più opportune ed efficaci.

La Tabella 1 propone uno schema di allestimento di colture e riporta il materiale biologico ottimale e i tempi di coltura preferenziali in relazione al tipo di patologia.

**Tabella 1: Schema allestimento colture cellulari per l'analisi delle neoplasie ematologiche**

Sospetto clinico	Materiale biologico	Tipo di coltura	Tempo di coltura in ore <sup>o</sup>
B-LLC	SM SP	S e NS	24/48/72 <b>72</b>
T-LLC	SM SP	S e NS	24/48/72 <b>72</b>
Mieloma Multiplo (MM) Gammopatie monoclonali	SM	NS	24/48/72/ <b>96</b>
Neoplasie mieloproliferative (MPN): LMC, PV, TE, mielofibrosi idiopatica, istiocitosi	SM	NS	<b>24/48</b>
	SP		
Sindromi Mielodisplastiche (MDS): AR e AREB	SM	NS	diretto/ <b>24/48</b>
	SP		
Leucemie acute: LLA, LMA	SM	NS	<b>24/48</b>
	SP	NS	<b>48</b>
Citopenie: anemie, neutropenie, piastrinopenie, pancitopenie	SM	NS	<b>24/48</b>
Linfomi B	SM	NS	<b>24/48</b>
Linfomi T	SM	NS	<b>24/48</b>
Linfomi B e T	Campione di tessuto solido	NS	<b>24/48</b>

<sup>o</sup> in grassetto il tempo di coltura a cui dare priorità in caso di materiale scarso

B-LLC leucemia linfocitica cronica a cellule B

T-LLC leucemia linfocitica cronica a cellule T

Neoplasie mieloproloferative (MPN)

LMC leucemia mieloide cronica

PV policitemia vera

TE trombocitemia essenziale

Sindromi mielodisplastiche (MDS)

AR anemia refrattaria

AREB anemia refrattaria con eccesso di blasti

Leucemie acute

LLA leucemia linfatica acuta

LMA leucemia mieloide acuta

in Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissue, WHO 2008

SM= sangue midollare; SP= sangue periferico;

S= coltura stimolata; NS= coltura non stimolata

## 2.3 ANALISI CROMOSOMICA

L'analisi cromosomica convenzionale deve essere eseguita utilizzando tecniche di bandeggio differenziale. L'ISCN 2009 (An International System for Human Cytogenetic Nomenclature 2009) definisce 5 livelli di bandeggio, che possono essere usati come parametri di riferimento per definire il grado di risoluzione dei cromosomi. Il numero di metafasi da analizzare per la definizione del cariotipo tumorale varia in modo proporzionale alla complessità delle anomalie riscontrate, alla qualità delle metafasi e alla risoluzione del bandeggio. E' raccomandata l'analisi di almeno 20 metafasi.

Nei casi con basso indice mitotico anche l'analisi di poche mitosi può fornire un risultato significativo, soprattutto qualora si evidenzia un'anomalia caratteristica di una determinata emopatia o che riveste un preciso significato diagnostico e prognostico (es. cromosoma Ph nella LMC).

Se il livello di risoluzione della tecnica di bandeggio utilizzata non è ottimale, è raccomandata un'analisi FISH mirata per confermare o per identificare anomalie con valore diagnostico e prognostico noto.

La definizione delle anomalie clonali da riportare nel cariotipo tumorale deve essere in accordo con l'ISCN 2009.

Il riscontro di una anomalia in una singola cellula suggerisce la necessità di estendere l'analisi citogenetica a un maggior numero di metafasi e/o di eseguire un'analisi FISH utilizzando le sonde molecolari più opportune.

L'osservazione di una anomalia citogenetica in una singola cellula non è considerata clonale, tuttavia deve essere segnalata quando questa è patognomonica della neoplasia in studio.

Se una anomalia cromosomica, è presente in tutte le cellule analizzate è opportuno escludere l'origine costituzionale dell'anomalia identificata. Particolare attenzione va riposta in quelle analisi in cui l'anomalia riscontrata possa essere non acquisita, ma di origine costituzionale (es. trisomia 8 a mosaico); nel qual caso si rende necessario un controllo del cariotipo costituzionale su linfociti stimolati o su cellule di altro tessuto non interessato dalla patologia.

Nell'ambito di controlli di qualità interni è raccomandato un confronto tra il cariotipo tumorale e i diversi parametri biologici della neoplasia in esame (dati ematochimici, immunofenotipo, diagnosi istopatologica su biopsia osteomidollare, indagini molecolari).

### **3.0 CITOGENETICA MOLECOLARE**

Tra le tecniche di citogenetica molecolare l'ibridazione in situ fluorescente (FISH) è l'approccio maggiormente utilizzato in campo oncoematologico. La FISH utilizza sonde molecolari a sequenza nota marcate con differenti fluorocromi e permette l'identificazione di specifiche regioni con una risoluzione di 50 Kb - 2 Mb (Speicher et al., 2005). su metafasi e nuclei interfasiche, o di interi cromosomi (painting) su metafasi.

Data l'importanza che specifiche anomalie cromosomiche, sia strutturali che numeriche, hanno acquisito nella diagnosi, nella prognosi e nel monitoraggio in campo oncoematologico la FISH è diventata parte integrante nel percorso di diagnosi e cura di queste patologie in associazione alla citogenetica classica e alla biologia molecolare (PCR, RT-PCR).

Oggi sono disponibili nuove tecnologie di citogenetica molecolare ad alta risoluzione quali FISH multicolori (SKY FISH, M-FISH, M-banding, COBRA ecc) e array-CGH (con piattaforme, BAC, oligonucleotidi o SNP) che possono essere di supporto per una migliore caratterizzazione citogenetica delle neoplasie, ma attualmente non ancora validate per l'uso in ambito diagnostico (Speicher et al, 2005).

#### **3.1 IBRIDAZIONE IN SITU FLUORESCENTE (FISH)**

La FISH, poiché identifica specifiche sequenze bersaglio, è utilizzata come tecnica complementare alla citogenetica convenzionale e può essere eseguita sia su piastre metafasiche che su nuclei interfasiche. Applicata alle metafasi, quindi a cellule in attiva replicazione, aumenta la capacità di risoluzione dell'analisi citogenetica. La FISH metafasica è raccomandata per la definizione di specifiche alterazioni cromosomiche non identificabili con le tecniche di bandeggio (es. t(IGH/FGFR3) nel MM) e per

l'identificazione di specifiche alterazioni citogenetiche con significato diagnostico e prognostico in casi in cui la qualità delle metafasi non è adeguata per l'analisi cromosomica convenzionale.

La FISH sui nuclei interfascici, pur fornendo un'informazione limitata alle specifiche anomalie ricercate, è particolarmente utile per la diagnosi di aberrazioni citogenetiche in cellule non in attiva proliferazione e in casi con basso indice mitotico.

La FISH interfascica, permette di analizzare un alto numero di cellule e rappresenta la tecnica di elezione per l'identificazione dell'eterogeneità citogenetica intratumorale e per il monitoraggio della malattia residua minima e post-trapianto.

La FISH interfascica è una tecnica versatile e può essere eseguita su nuclei ottenuti da:

- preparati citogenetici convenzionali dopo coltura di SM e SP o tessuto solido
- cellule selezionate con tecniche di immuno-separazione (es. cellule CD138+)
- strisci o citocentrifugati di midollo, sangue periferico o cellule disgregate da massa tumorale previa adeguata fissazione
- apposizioni di cellule da tessuto fresco o congelato previa adeguata fissazione
- sezioni istologiche.

L'esecuzione della FISH su sezioni istologiche è particolarmente critica e si rimanda al documento "*Raccomandazioni per l'analisi FISH interfascica su sezioni istologiche in ambito oncologico*" (Sigu.net).

Nel caso di neoplasie ematologiche, in cui il clone neoplastico può essere poco rappresentato, per aumentare la sensibilità dell'analisi FISH interfascica, si raccomanda che ogni laboratorio in base alle proprie risorse e alla propria organizzazione ponga in essere delle procedure di selezione (es. tecniche di immuno-separazione) o concentrazione (es. separazione su gradiente) delle cellule rappresentative della malattia in esame.

### 3.2 ASPETTI TECNICI

La diagnosi di alterazioni cromosomiche mediante FISH su cellule in metafase e su nuclei in interfase è possibile grazie alla disponibilità di sonde molecolari commerciali appropriate per l'identificazione di specifiche classi di anomalie citogenetiche, che sono rappresentate principalmente da:

Duplicazione/Amplificazione: si identifica su metafasi e su nuclei interfascici con FISH a due colori utilizzando una sonda specifica per la regione/gene in studio (duplicata o amplificata) e una sonda di controllo specifica per il centromero del cromosoma corrispondente (alfoide) o per una regione cromosomica non coinvolta nella duplicazione/amplificazione

Aneuploidie: si identificano utilizzando sonde alfoidi specifiche per singoli cromosomi.

E' possibile, ibridando contemporaneamente sonde centromeriche marcate con fluorocromi diversi, analizzare alterazioni numeriche di più cromosomi contemporaneamente sia su metafasi che su nuclei.

Delezione o perdita allelica: si identifica con analisi FISH a due colori utilizzando una sonda specifica per la regione da studiare e, come controllo, una sonda che mappa in una regione sullo stesso cromosoma non coinvolta nella delezione o una sonda alfoide specifica per il centromero del cromosoma corrispondente.

Riarrangiamenti cromosomici noti: comprendono traslocazioni ed inversioni che possono essere identificate sia su nuclei che su metafasi utilizzando specifiche sonde a due colori. In particolare sono oggi disponibili le seguenti sonde utili per l'identificazione di un riarrangiamento cromosomico:

1. *break-apart o split-signal* costituite da due regioni molecolari (250-600 kb) marcate in colori diversi che mappano rispettivamente al 3' e al 5' della regione genica che contiene tutti i punti di rottura. Questa tipologia di sonda evidenzia il riarrangiamento di uno specifico gene, ma non definisce la regione *partner* coinvolta nell'anomalia; è particolarmente utile per identificare riarrangiamenti in cui il gene *partner* è variabile e/o non noto.
2. *dual-color dual-fusion:* sono costituite da due regioni molecolari (300Kb-1Mb), marcate in colori diversi corrispondenti ai due geni coinvolti nel riarrangiamento e che contengono tutti i punti di rottura. In caso di positività si evidenzieranno due segnali di fusione in aggiunta a due segnali normali, permettendo di identificare specifiche traslocazioni cromosomiche con una elevata sensibilità.
3. *dual-color single fusion:* sono costituite da due regioni molecolari con differente localizzazione cromosomica marcate in colori diversi che non contengono tutti i punti di rottura. Questo tipo di sonda permette di identificare specifiche traslocazioni cromosomiche, ma non ha una elevata sensibilità.

L'identificazione di riarrangiamenti cromosomici non noti e/o criptici e/o complessi su piastre metafasiche è possibile utilizzando sonde a sequenza unica cromosoma specifiche (sonde painting) o sonde subtelomeriche. Per quanto riguarda le sonde painting, le anomalie di piccole dimensioni possono risultare difficilmente rilevabili in quanto non sempre queste sonde si distribuiscono uniformemente lungo il cromosoma. Va inoltre tenuto presente che il potere di risoluzione è dipendente come per la citogenetica classica, dalla risoluzione delle metafasi (lunghezza dei cromosomi).

E' auspicabile che ogni laboratorio definisca i propri pannelli di sonde per ciascuna patologia, alla diagnosi e durante il monitoraggio della malattia, con protocolli

diagnostici condivisi con i Clinici e aggiornati alle più recenti conoscenze della letteratura.

### 3.3 ANALISI FISH

La valutazione della FISH deve essere effettuata da operatori esperti utilizzando un microscopio a fluorescenza dotato di appositi filtri, specifici per i fluorocromi impiegati. La lettura della FISH a due o più colori deve essere eseguita con filtri a doppia e/o a tripla banda.

L'utilizzo di strumenti automatizzati di conteggio e/o acquisizione delle immagini non può sostituire in alcun modo l'osservazione e l'analisi effettuata dall'operatore. Tali sistemi possono essere utilizzati come ausilio al conteggio e per l'acquisizione di immagini da archiviare. E' consigliabile archiviare le immagini originali.

Prima di procedere all'analisi del preparato è utile effettuare un controllo della **qualità complessiva** dell'ibridazione ottenuta valutando:

1. l'efficienza di ibridazione (i segnali devono essere presenti in almeno il 90% delle cellule)
2. la qualità dei segnali (i segnali devono essere uniformi, chiari e non frammentati)
3. la presenza di background e/o di elevata autofluorescenza

Solo se la qualità dell'ibridazione è adeguata è possibile procedere **alla valutazione del campione** come segue:

- a. Utilizzare un obiettivo a medio ingrandimento per selezionare le aree di interesse, passare poi all'ingrandimento 63X o 100X ad immersione e verificare che l'area scelta abbia un'efficienza ed una qualità di ibridazione soddisfacenti; quindi procedere alla valutazione dei segnali fluorescenti nei singoli nuclei o sulle metafasi
- b. Scegliere metafasi complete o nuclei integri non sovrapposti in cui sia ben visibile l'intera membrana nucleare.

La valutazione dei segnali fluorescenti per nucleo o per metafase deve essere eseguita seguendo le indicazioni del produttore per ciascuna sonda (nel caso di sonde commerciali) e le indicazioni dell'ISCN 2009.

- c. Registrare i dati dell'analisi cellula per cellula. Questo tipo di valutazione permette di rilevare la presenza di eterogeneità clonale.

E' auspicabile l'osservazione del campione da parte di due operatori indipendenti

La FISH su nuclei interfasicci, non permettendo la visualizzazione diretta della sonda sui cromosomi, necessita di particolare attenzione nella lettura e interpretazione dei risultati e deve quindi essere eseguita da personale qualificato e adeguatamente istruito in questo settore.

### 3.4 SENSIBILITÀ E SPECIFICITÀ

E' consigliabile per uso diagnostico utilizzare sonde molecolari commerciali certificate CE e IVD per le quali sono disponibili i dati relativi ai test di validazione da parte della ditta produttrice.

In ogni caso è buona norma, per ciascun laboratorio e sui propri preparati:

1. controllare l'esatta localizzazione e la qualità della sonda su piastre metafasiche di campioni di linfociti da soggetti normali
2. validare la specificità delle sonde su campioni di controllo positivi e negativi per l'anomalia citogenetica di interesse
3. determinare la sensibilità analitica della sonda per ciascun tipo di preparato e/o tessuto target sulla base di un numero adeguato di controlli normali di riferimento.

Poiché la FISH interfascica è un'analisi citogenetica indiretta, la sua applicazione in campo oncoematologico, necessita di adeguati controlli. La presenza di una determinata anomalia citogenetica va accertata valutando la frequenza di uno specifico pattern di segnali fluorescenti nelle singole cellule del campione rispetto a specifici valori soglia. I valori soglia, come segnalato dalla letteratura sono definiti per ogni laboratorio e devono essere specifici per tessuto e per tipo di sonda molecolare utilizzati. La determinazione dei valori soglia prevede l'analisi di un pannello di campioni di cellule normali di riferimento e suppone che i dati seguano il modello della distribuzione gaussiana. Questo modello permette di determinare i limiti di normalità (cut-off) con una significatività del 95% (media + 2deviazione standard) o del 99.7% (media + 3deviazione standard).

Il numero di nuclei da analizzare per raggiungere una buona sensibilità dell'analisi FISH interfascica dipende dal grado di confidenza richiesto, dal livello di eterogeneità che deve essere escluso e dalla sensibilità analitica della sonda. Le sonde utilizzate in oncoematologia devono avere sensibilità e specificità analitiche elevate, soprattutto se utilizzate per la valutazione della malattia residua minima. I valori di sensibilità e specificità analitiche per le sonde CE e IVD sono sempre riportate dalle ditte produttrici.

### 4.0 CONTROLLO DEI PROCESSI

L'attività diagnostica di citogenetica oncoematologica si colloca in un contesto di laboratorio di Genetica Medica e ha come riferimento i disciplinari della SIGU (Sigu.net).

Per garantire il mantenimento di un elevato standard qualitativo il laboratorio deve tenere i suoi processi sotto controllo, con un'attenzione particolare alle attività critiche.

L'uniformità del comportamento del personale è garantito dall'applicazione di procedure e istruzioni operative scritte, validate dal Direttore del Laboratorio e revisionate annualmente.

Il monitoraggio dell'andamento del Laboratorio avviene attraverso la definizione di un pannello di indicatori di efficienza ed efficacia, che devono coprire le tre fasi principali del processo, fase preanalitica, fase analitica, fase postanalitica.

Ogni Laboratorio sceglie gli indicatori in base alle proprie criticità.

Di seguito vengono riportati gli indicatori della fase analitica proposti dai disciplinari SIGU per i laboratori di Genetica Medica (Tabella 2).

I risultati del monitoraggio del sistema di gestione devono essere riesaminati periodicamente nell'ottica del miglioramento continuo.

Tabella 2

Area	Contenuto del Requisito	Modalità di verifica indicatore di conformità
Tempi di refertazione conformi alle linee guida della SIGU	Il laboratorio ha determinato dei valori limite per tenere sotto controllo il rispetto dei tempi di refertazione	Ritardo di refertazione inferiore od uguale al 10%
Conformità referto rispetto linee guida della SIGU	I referti delle analisi di citogenetica devono riportare tutte le informazioni previste dalle linee guida SIGU, edizione aggiornata	Conformi 100%
Conformità formula cariotipo rispetto ISCN 2009	La formula del cariotipo deve essere conforme rispetto agli standard definiti da ISCN, edizione aggiornata	Conformi 100%
Fallimenti cariotipi/anno	Il laboratorio ha determinato dei valori limite per tenere sotto controllo i fallimenti avvenuti nel corso dell'anno su campioni idonei	Inferiore od uguale al 10%
Fallimenti FISH	Il laboratorio ha determinato i valori limite per tenere sotto controllo i fallimenti delle analisi FISH.	Inferiore od uguale al 5%
Riallestimento FISH	Il laboratorio ha determinato dei valori limite per tenere sotto controllo il riallestimento FISH	1 - A seguito mancata ibridazione inferiore ed uguale al 10% 2 - A seguito di cross

		ibridazione inferiore od uguale al 10% 3 - Preparato non idoneo
Analisi inferiori allo standard SIGU	Il laboratorio ha determinato dei valori limite per tenere sotto controllo le analisi inferiori allo standard nel corso dell'anno su campioni idonei	Inferiore od uguale al 20%

## 5.0 REFERTAZIONE

### Tempi di refertazione

In determinate situazioni cliniche, la presenza o l'assenza di una specifica anomalia cromosomica può essere determinante per stabilire una diagnosi o avere una importanza rilevante nella scelta terapeutica. E' pertanto fortemente consigliato un tempo di refertazione adeguato alla patologia.

Per sospetti diagnostici quali LMC, LMA o LLA è consigliato un risultato anche preliminare entro 7 giorni ed una refertazione definitiva entro 14 giorni. Deve essere chiaramente identificato sul referto preliminare che l'indagine è ancora in corso e che il referto definitivo andrà a sostituire quello preliminare.

Per gli altri disordini ematologici il referto deve essere completato entro 21 giorni.

### Referto

Il referto deve essere scritto dividendo chiaramente i dati anagrafici dai dati analitici e deve contenere le seguenti informazioni:

#### Dati relativi alla struttura

- identificazione dettagliata della Struttura (segnalare le eventuali certificazioni/accreditamenti specificando la normativa seguita)

#### Dati relativi al paziente e campione

- data del prelievo;
- data di ricezione del campione;
- data della conclusione dell'indagine;
- identificazione del medico/reparto/struttura richiedente;
- cognome e nome del paziente;
- data di nascita del paziente;
- codice identificativo del campione/paziente;
- indicazione all'indagine;

#### Dati relativi all'indagine citogenetica convenzionale

- tessuto analizzato;

- tecnica/e utilizzate (colture a 24/48/72 ore o altro, specificare eventuale agente stimolante utilizzato);
- tecnica/e di bandeggio;
- risoluzione del bandeggio;
- numero di cellule analizzate;

Dati relativi all'indagine citogenetica molecolare (se richiesta)

- sonda/e utilizzate\*;
- tessuto analizzato (SP, MO, plasmacellule o altro);
- tecnica/e utilizzate (colture a 24/48/72 ore o altro, specificare eventuale agente stimolante utilizzato) se diverse da quelle utilizzate per analisi citogenetica convenzionale;
- numero di nuclei e/o metafasi analizzate per sonda

Dati relativi al risultato

- cariotipo e risultati FISH definiti secondo ISCN edizione aggiornata
- commento chiaro delle aberrazioni citogenetiche riscontrate
- eventuale commento sull'incompletezza dell'analisi
- commento sulla consistenza del risultato rispetto al quesito diagnostico

Dati relativi alla firma

- firma del Dirigente responsabile dell'indagine

\*nei referti relativi ad una indagine FISH occorre specificare chiaramente il tipo di sonda utilizzata (nome commerciale/clone/locus/gene).

#### Archiviazione

Tutti i dati devono essere archiviati e conservati secondo la normativa vigente e seguire le procedure specifiche di ogni struttura. Per garantire una maggior sicurezza dei dati è opportuno che siano presenti su un Server localizzato fisicamente in un posto diverso dal proprio laboratorio, e dedicato ai dati genetici. Occorre eseguire un back-up incrementale quotidiano.

Per le indagini FISH conservare almeno 2 immagini non elaborate per ogni diverso caso.

Una copia del referto deve essere archiviata in laboratorio secondo le modalità proprie di ogni struttura (copia cartacea, copia informatica) per il tempo indicato dalle normative vigenti.

#### Campioni/vetrini

Tutti i campioni/vetrini devono essere conservati o eliminati secondo la normativa vigente e secondo le procedure specifiche di ogni struttura.

## 6.0 BIBLIOGRAFIA

### Linee guida di riferimento

Cytogenetics Guidelines and Quality Assurance

E.C.A. Permanent Working Group for Cytogenetics and Society

F. Dagna Bricarelli, Ros J. Hastings, Ulf Kristoffersson, Simona Cavani

Association for Clinical Cytogenetics

Professional guidelines for clinical cytogenetics: haemato-oncology best practice guidelines (2007)

Cytogenetics Guidelines and qualità assurance (ECA PWG)

Guide de Bonnes pratiques En Cytogenetique Association des Cytogeneticiens de langue Francais, GFCH e GFCO

Linee Guida per la Diagnosi Citogenetica Consensus 2007

<http://www.SIGU.net>

### Atlanti e cataloghi online

Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology

<http://atlasgeneticsoncology.org/>

NCBI - Cancer Chromosome

<http://ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=cancerchromosomes>

Mitelman database of Chromosome aberrations in Cancer

<http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>

### Per oligo

Dicker F, Schnittger S, Haferlach T, et al: Immunostimulatory oligonucleotide-induced metaphase cytogenetics detect chromosomal aberrations in 80% of CLL patients: A study of 132 CLL cases with correlation to FISH, IgVH status, and CD38 expression. *Blood* 108:3152-60, 2006

Struski S, Gervais C, Helias C, et al: Stimulation of B-cell lymphoproliferations with CpG-oligonucleotide DSP30 plus IL-2 is more effective than with TPA to detect clonal abnormalities. *Leukemia* 23:617-9, 2009

Wren C, Moriarty H, Marsden K, et al: Cytogenetic investigations of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 198:155-61

### **Per FISH**

Fluorescence *In situ* hybridization (FISH) Methods for Medical Genetics; approved guidelines. American College of medical genetics NCCLS (2003) [www.nccls.org](http://www.nccls.org)

FISH scoring in oncology - the professional standards Committee of the Association of Clinical Cytogeneticists (2003) [www.cytogenetics.org.uk](http://www.cytogenetics.org.uk)

Hemato-oncology best practice guidelines (2007) v1.01 . Association for clinical Cytogenetics - professional guidelines for clinical cytogenetics.

Perry A. Fluorescence In Situ Hybridization. *Molecular Genetic Testing in Surgical Pathology* Ed. by John D. Pfeifer. Lippincott Williams & Wilkins 2006

Wiktor AE, Van Dyke DL, Stupca PJ, et al: Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice. *Genet Med* 8:16-23, 2006

Tibiletti MG: Specificity of interphase fluorescence in situ hybridization for detection of chromosome aberrations in tumor pathology. *Cancer Genet Cytogenet* 155:143-8, 2004

### **Testi di riferimento**

Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L., Jaffe E.S., Pileri S.A., Stein H., Thiele J., Vardiman J.W. (Eds.): WHO classification of Tumor of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC: Lyon 2008.

ISCN (2009): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. In: Shaffer LG, Slovak ML, Campbell LJ (eds). Karger, S. edn, Vol.: Basel, 2009.