

RACCOMANDAZIONI PER L'ANALISI FISH INTERFASICA SU SEZIONI ISTOLOGICHE IN AMBITO ONCOLOGICO

Introduzione

L'ibridazione *in situ* fluorescente (FISH) su sezioni istologiche per la rilevazione di specifiche anomalie cromosomiche è una analisi di citogenetica molecolare che ha acquisito in questi ultimi anni un'importanza crescente, soprattutto in ambito oncologico, per la sua versatilità e la sua applicabilità e riproducibilità nella routine diagnostica. Al momento la FISH interfaseica rappresenta la tecnica di elezione per la ricerca di un numero crescente di aberrazioni cromosomiche e/o alterazioni geniche con note applicazioni diagnostiche, prognostiche e terapeutiche, su tessuti processati per la diagnosi istopatologica classica, offrendo la singolare opportunità di osservare il dato genetico direttamente nel contesto morfologico.

L'analisi FISH su sezioni istologiche, poiché identifica alterazioni a carico di specifiche regioni cromosomiche e geniche, è un test genetico e come tale deve essere eseguito, valutato e refertato secondo le indicazioni delle Linee Guida dell'Istituto Superiore di Sanità sui test genetici (CNBB, ISS Linee Guida test genetici, maggio 1998, www.iss.it).

Va inoltre sottolineato che l'indagine FISH su preparato istologico è il risultato dell'integrazione tra la valutazione genetica e quella morfologica e presuppone quindi la sinergia tra figure professionali diverse: il genetista e l'anatomo-patologo. Nasce dunque l'esigenza di condividere specifiche raccomandazioni per l'esecuzione e la valutazione della FISH interfaseica su tessuto tra gli operatori dei servizi di anatomia patologica, oncologia e genetica medica.

Quando eseguire la FISH su sezioni istologiche

Le principali applicazioni della FISH interfaseica in ambito oncologico sono finalizzate alla caratterizzazione molecolare dei tumori solidi e all'identificazione di specifiche alterazioni citogenetiche in un appropriato contesto clinico:

- 1- su indicazione dell'anatomo-patologo referente per un corretto inquadramento diagnostico (*finalità diagnostica*);
- 2- su indicazione del clinico in una specifica categoria diagnostica al fine di identificare le neoplasie che sono associate ad un comportamento biologico aggressivo piuttosto che indolente (*finalità prognostica*);
- 3- su indicazione dell'oncologo in una specifica categoria diagnostica per identificare le neoplasie che possono beneficiare di una terapia generica o, più comunemente, ad una terapia bersaglio-specifica (*finalità predittiva*). Al presente, le più comuni applicazioni sono: la determinazione dell'amplificazione di *HER-2/neu* nel carcinoma della mammella e di EGFR nel carcinoma del polmone, la delezione 1p/19q nei gliomi, l'identificazione di specifiche traslocazioni associate a neoplasie ematologiche, a neoplasie delle parti molli e

ad alcuni tumori pediatrici. La crescente disponibilità di farmaci mirati verso target biologici specifici lascia supporre un incremento futuro nell'impiego routinario di questa tecnologia.

Materiale

La caratteristica peculiare della FISH è quella di identificare su sezioni istologiche anomalie genetiche nelle singole cellule inserite nel loro contesto tissutale. Una chiara definizione dei segnali fluorescenti all'interno delle cellule dipende da una corretta conservazione degli acidi nucleici. Pertanto, la reazione tecnicamente ottimale dipende non solo da una corretta esecuzione della tecnica FISH, ma anche da un adeguato trattamento del tessuto: dalla resezione chirurgica alla fissazione, processazione e successiva inclusione in paraffina del campione .

Il tessuto deve essere fissato in modo uniforme immediatamente e comunque nel minor tempo possibile. La tabella riportata di seguito riassume le principali informazioni tecniche per la fissazione dei campioni chirurgici (1,2,3).

	Fissativi compatibili con l'analisi FISH	Fissativi <u>non</u> compatibili con l'analisi FISH
Fissativi	<p>Formalina tamponata al 10% (raccomandata)</p> <p>Fissativi alcolici: etanolo, metanolo, Carnoy (aumento fluorescenza di fondo)</p>	<p>Formalina non tamponata</p> <p>Fissativi contenenti acido picrico (liquido di Bouin)</p> <p>Fissativi contenenti cloruro di mercurio (B5, Soluzioni di Hollande, Ridley, Zenker, Helly)</p> <p>Fissativi contenenti acido tannico fenoli o solfato di zinco.</p>

Fissazione ottimale	Sovrafissazione	Sottofissazione
<p>Il tessuto deve essere fissato in modo uniforme per un periodo non superiore alle 48 ore (ottimale: 6-24 ore)</p>	<p>La sezione istologica necessita di un prolungamento del tempo di digestione enzimatica</p>	<p>Si rileva un aumento della fluorescenza di fondo a causa del passaggio in alcool prima di una adeguata fissazione del tessuto</p>

Si raccomanda inoltre:

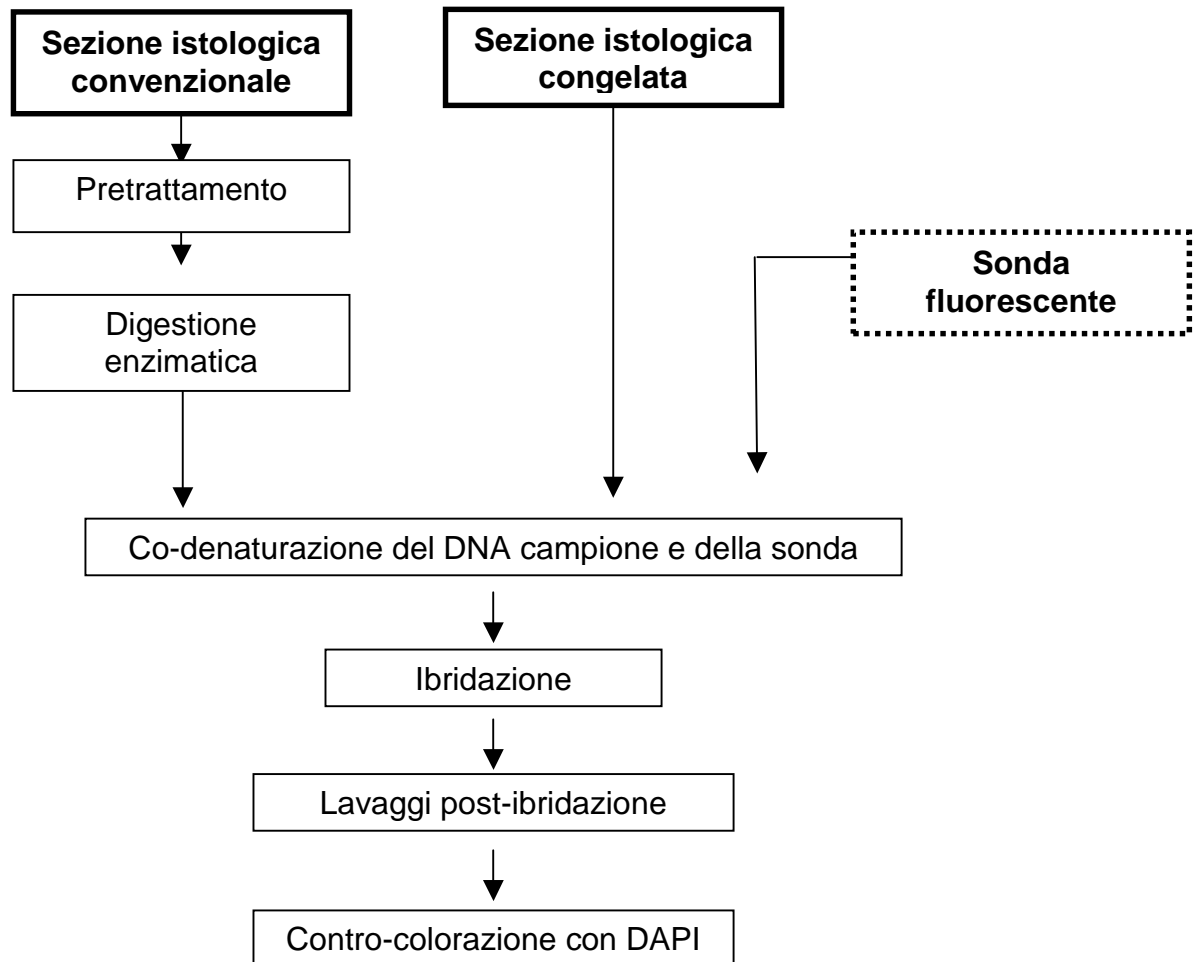
- Una scelta accurata della sezione di tessuto e dell'area tissutale da analizzare. La scelta deve essere effettuata dall'anatomo-patologo su preparato istologico colorato con ematossilina-eosina.
- L'utilizzo di sezioni istologiche dello spessore previsto normalmente per la normale diagnosi istologica (3-5 μm). In alcuni casi particolari, le caratteristiche del tessuto (presenza di cellule con nuclei di grandi o piccole dimensioni) e il tipo di valutazione richiesta (presenza o meno di monosomie che possono essere sovrastimate in caso di sezioni troppo sottili) potrebbero suggerire di modificare lo spessore della sezione da ibridare.
- La distensione della sezione istologica su vetrini elettrostatici per garantire una perfetta adesione del preparato ed evitarne il distacco durante le fasi di lavorazione.
- L'attento controllo della digestione enzimatica al fine di evitare la perdita di aree tissutali di interesse.

La FISH interfascica può essere eseguita anche su **sezioni di tessuto congelato** ed incluso in OCT (Optimal Cutting Temperature Compound – Tissue-Tek OCT Compound). Il tessuto congelato, qualora sia sufficientemente rappresentativo della neoplasia in corso di analisi, è preferibile al tessuto fissato e incluso in paraffina in quanto non necessita né di pretrattamento né di digestione enzimatica, ma solo di una fissazione rapida in liquido di Carnoy e di una successiva accurata disidratazione, rendendo più agevole e rapida la procedura FISH.

Più recentemente l'applicabilità della FISH è stata estesa agli **arrays di tessuto**. L'*array* di tessuto è una tecnologia che riposiziona in un unico blocchetto incluso in paraffina, le aree tissutali di interesse del diametro di circa 0.6 mm prelevate manualmente o mediante appositi strumenti da blocchetti convenzionali provenienti da pazienti diversi. Le sezioni istologiche che ne derivano contengono più campioni e possono essere ibridate ed analizzate su un unico vetrino, con il vantaggio di poter analizzare tessuti da più pazienti contemporaneamente con un unico esperimento FISH. Per contro, l'analisi FISH su *arrays* di tessuto pone delle problematiche di tipo tecnico, quali: a) la difficoltà di individuare condizioni di pretrattamento e digestione enzimatica comuni e ottimali per diversi campioni sulla stessa sezione istologica, b) interpretativo, per le dimensioni estremamente ridotte del campione.

Modalità di esecuzione

Il trattamento del preparato istologico per l'analisi FISH prevede le fasi di lavorazione descritte nel seguente algoritmo:



Particolarmente critiche sono le fasi di **pretrattamento e digestione enzimatica**; una digestione eccessiva, con conseguente perdita di cromatina e danneggiamento dell'architettura del campione o per contro una digestione insufficiente a rendere permeabile il tessuto all'ingresso della sonda possono compromettere definitivamente l'analisi FISH. Diversi *kit* commerciali sono ormai disponibili, per il cui utilizzo si rimanda alle istruzioni delle ditte produttrici. Tuttavia alcune variabili (il tipo di tessuto, le condizioni di fissazione, la densità cellulare) possono influire sui tempi e sulle temperature di pretrattamento e digestione; quest'ultima in particolare deve essere attentamente monitorata mediante colorazione con Ioduro di Propidio o con l'osservazione al microscopio a contrasto di fase. Gli enzimi pepsina e proteinasi K sono i più utilizzati, ma la pepsina meglio preserva la morfologia cellulare e l'integrità del nucleo e permette un più agile controllo della digestione (1).

Per la fase di ibridizzazione si consiglia l'utilizzo di **ibridizzatori automatici**, che hanno il vantaggio di velocizzare la procedura, di eliminare l'utilizzo della formammide e di controllare in modo preciso tempi e temperature, implementando sensibilmente la qualità della FISH.

Sensibilità e Specificità

Poiché la FISH interfascica su nuclei di campioni istologici è una tecnica citogenetica indiretta, la sua applicazione necessita di adeguate strategie, quali:

1. la scelta delle sonde molecolari opportune per identificare specifiche anomalie citogenetiche
2. la definizione di specifici valori soglia

La FISH su preparato istologico è un'analisi condotta cellula per cellula e 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 (4,5,6), devono essere fissati in ogni laboratorio e devono essere specifici per ciascun tipo di tessuto *target*, per le dimensioni di taglio delle sezioni istologiche, oltre che per ogni sonda molecolare utilizzata. La determinazione del valore soglia prevede l'analisi di un pannello di sezioni istologiche da campioni normali di riferimento.

La sensibilità e la specificità della FISH interfascica su preparati istologici sono ovviamente influenzate dalla corretta ed accurata definizione di specifici valori soglia.

La sensibilità della FISH su tessuto è inoltre fortemente correlata al numero di cellule e alle aree tumorali analizzate. Questo aspetto assume particolare rilevanza nella diagnosi di alterazioni citogenetiche in campioni neoplastici; la maggior parte delle neoplasie, infatti, sono eterogenee, presentando popolazioni cellulari morfologicamente e geneticamente differenti. Se il numero di cellule analizzate è ridotto, cloni cellulari piccoli o confinati in particolari aree delle sezioni istologiche potrebbero sfuggire all'analisi FISH.

Risultati citogenetici poco chiari sia per un ridotto numero di cellule analizzabili sia per una inadeguata qualità del preparato FISH possono essere controllati su un campione di nuclei nudi estratti da sezioni istologiche di circa 15-20µm provenienti dallo stesso blocchetto istologico (7,8).

Sonde molecolari

La diagnosi di alterazioni cromosomiche mediante FISH interfascica su preparato istologico è possibile grazie alla scelta di sonde molecolari appropriate per l'identificazione delle diverse classi di anomalie citogenetiche (9).

Duplicazione/Amplificazione: si identificano con FISH a due colori utilizzando una sonda specifica per la regione/gene in studio e una sonda alfoide di controllo specifica per il cromosoma corrispondente.

Per duplicazione si intende la presenza di due regioni uguali in relazione al cromosoma corrispondente.

L'amplificazione genica si definisce come un rapporto maggiore di 2 tra il numero di copie geniche rispetto al numero di cromosomi corrispondenti.

L'amplificazione genica si può manifestare a *cluster (hsr)* o come frammenti minuti (*dmin*) dispersi nel nucleo.

La visualizzazione al microscopio si effettua con filtro a doppia o tripla banda

Aneuploidie: si identificano utilizzando sonde alofidi specifiche per i singoli cromosomi.

E' possibile, ibridando contemporaneamente sonde centromeriche marcate con fluorocromi diversi, analizzare alterazioni numeriche di più cromosomi contemporaneamente

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 alofoide specifica per il centromero del cromosoma corrispondente. La simultanea visualizzazione dei due segnali va eseguita con filtro a doppia o tripla banda.

La diagnosi su tessuto di monosomie cromosomiche e di delezione/perdita allelica di specifiche regioni cromosomiche è fortemente influenzata dalla presenza di nuclei tagliati (caratteristica peculiare delle sezioni istologiche). Per questo motivo, la diagnosi di queste anomalie cromosomiche con FISH su preparati istologici ha una sensibilità ridotta e necessita di specifici valori soglia.

Riarrangiamenti cromosomici: comprendono traslocazioni ed inversioni e si identificano utilizzando FISH a due colori con sonde del tipo: 1- *break-apart o split-signal*, 2- *dual-color dual-fusion* e 3- *dual-color single fusion*.

1-Le sonde del tipo ***break-apart o split-signal*** sono 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- Le sonde ***dual-color dual-fusion*** sono costituite da due regioni molecolari (300Kb–1Mb), marcate in colori diversi corrispondenti a due geni e che contengono tutti i punti di rottura. In caso di positività si evidenzieranno due segnali di fusione, permettendo di identificare specifiche traslocazioni cromosomiche con una elevata sensibilità.

3- Le sonde **dual-color single fusion** sono costituite da due regioni molecolari 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 .

E' raccomandato, per uso diagnostico:

1. utilizzare sonde molecolari commerciali certificate CE
2. controllare l'esatta localizzazione e la qualità della sonda su piastre metafasiche di linfociti di maschi normali
3. validare in ogni laboratorio la specificità delle sonde su campioni di controllo positivi e negativi per l'anomalia citogenetica di interesse

Letture ed interpretazione dei risultati

La valutazione della FISH su sezioni istologiche 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 eventualmente per l'acquisizione di immagini da archiviare.

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
4. la buona qualità dei campioni di controllo ibridati per la definizione di un corretto valore soglia

La mancanza dei requisiti sopra esposti potrebbe fortemente influenzare la qualità della diagnosi citogenetica.

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, variando la profondità del fuoco per rilevare tutti i segnali del nucleo.

b. Scegliere in ciascuna area tumorale analizzata i nuclei integri, non sovrapposti in cui sia ben visibile l'intera membrana nucleare. Evitare le aree di necrosi e laddove i bordi nucleari risultano ambigui ed ignorare i nuclei con intensità di segnale debole.

c. Valutare i segnali fluorescenti per nucleo seguendo le indicazioni dell'ISCN (International System for Human Cytogenetic Nomenclature 2005) e tenendo conto del tipo di sonda molecolare utilizzata (10-16). I risultati vicini o coincidenti al valore cut-off devono essere interpretati con cautela: è consigliabile in questi casi eseguire il conteggio su altri nuclei, o ripetere la valutazione

d. Registrare i dati dell'analisi cellula per cellula, estendendo possibilmente l'indagine all'intera sezione ed evidenziando le diverse popolazioni cellulari osservate nelle singole aree analizzate. Questo tipo di valutazione permette di rilevare la presenza di eterogeneità intratumorale, laddove presente.

e. Analizzare il campione da parte di due operatori indipendenti è auspicabile.

La valutazione dell'analisi FISH su *arrays* di tessuto è particolarmente critica. Poiché il campione disponibile è di dimensioni ridotte, è necessario analizzare tutte le cellule neoplastiche disponibili e valutare correttamente la qualità dell'analisi FISH di ciascun campione di tessuto. Data la peculiarità di questo tipo di preparato istologico, è consigliabile utilizzare come controlli *arrays* di tessuti normali.

Refertazione

Il risultato della FISH interfascica su preparato istologico deve essere scritto in modo chiaro e comprensibile e deve contenere le seguenti informazioni:

1. identificazione dettagliata del Laboratorio e della Struttura dove è stata eseguita l'analisi
2. data di accettazione della richiesta di esame
3. identificazione del medico e/o della Struttura che ha richiesto l'analisi
4. dati anagrafici del paziente e numero identificativo del campione istologico su cui è stata eseguita l'analisi FISH
5. tipo di campione analizzato (sezione di tessuto fresco/paraffinato, preparato istologico allestito in altra sede, ecc)
6. note identificative della sonda: nome commerciale, nome del clone o il locus secondo le indicazioni dell' ISCN (International System for Human Cytogenetic Nomenclature 2005)
(10)
7. numero di aree analizzate e/o numero di nuclei analizzati
8. presenza/assenza della specifica anomalia in studio

9. quantificazione (valore percentuale di cellule con anomalie) e localizzazione dell'anomalia riscontrata (focale/diffusa).
10. data del referto
11. Indicazione dei valori soglia del laboratorio che ha eseguito l'analisi
12. firma del Dirigente Responsabile dell'indagine e firma del Direttore del Laboratorio o suo referente (Comitato Nazionale per la Biosicurezza e le Biotecnologie -ISS- 1998; Linee Guida per Test Genetici; Linee Guida Diagnosi Citogenetica- SIGU 2007) (16).

Nel referto va sottolineato che il risultato ottenuto con FISH interfascica si riferisce esclusivamente alle regioni riconosciute dalle sonde analizzate e deve essere interpretato e valutato nell'ambito del contesto clinico-patologico del paziente.

Tempi di refertazione

Il tempo necessario per l'esecuzione dell'analisi deve essere il più breve possibile e deve tenere conto dell'indicazione alla diagnosi e della sua eventuale urgenza. Il laboratorio deve dotarsi di un protocollo scritto nel quale sia indicato il tempo necessario alla refertazione. La modalità di comunicazione del referto può assumere particolare significato nei casi in cui la tempestività sia cruciale nella gestione clinica del paziente.

Archiviazione

E' auspicabile conservare almeno 2 immagini fotografiche/digitalizzate di analisi FISH per ogni caso refertato. E' necessario archiviare anche la copia non elaborata di ciascuna immagine per consentire la verifica del dato originale (16).

Per le caratteristiche della FISH su sezioni istologiche (segnali fluorescenti localizzati in modo tridimensionale lungo lo spessore della sezione istologica) e per l'elevata probabilità di riscontrare eterogeneità citogenetica nelle neoplasie, le immagini non sempre riflettono la visione reale del campione osservato al microscopio. Per questo motivo è consigliabile, unitamente alla conservazione delle immagini, l'archiviazione per ciascun campione di una scheda che riporti in dettaglio le osservazioni annotate durante l'analisi al microscopio.

I vetrini dei preparati utilizzati per le indagini FISH possono essere conservati al buio a -20°C/-80°C; in tali condizioni i segnali fluorescenti sono generalmente visibili per circa 1 anno.

Considerazioni generali

Si sottolinea l'importanza che il Laboratorio che esegue questo tipo di diagnosi citogenetica abbia una specifica esperienza di tecnica FISH applicata alle sezioni istologiche. E' consigliabile seguire strettamente i protocolli forniti dalle ditte produttrici per quanto attiene alle sonde commerciali, oppure protocolli standardizzati.

Per l'analisi, la valutazione dei risultati e per la refertazione si invita ad attenersi alle raccomandazioni/linee guida delle Società Scientifiche di riferimento. Le indicazioni riportate nei protocolli delle ditte produttrici delle sonde non tengono conto infatti delle specifiche competenze necessarie per la valutazione ed interpretazione del dato citogenetico nei tumori.

La diagnosi di anomalie citogenetiche su preparati istologici può essere eseguita anche con metodi alternativi alla FISH, quali la CISH (Ibridazione in situ cromogenica) e la SISH (Ibridazione in situ con rivelazione argentica). Anche se attualmente hanno acquisito caratteristiche simili alla FISH (analisi a due colori), la sensibilità e la specificità di queste tecniche di ibridazione non sono sovrapponibili a quelle della FISH, in quanto i cromogeni utilizzati mancano della versatilità spettrale, della sensibilità e della risoluzione spaziale che è tipica dei fluorocromi utilizzati per l'analisi FISH.

In considerazione della crescente importanza del dato citogenetico/molecolare nell'inquadramento diagnostico, prognostico e terapeutico del paziente oncologico, si auspica che in futuro le Società Scientifiche di riferimento contribuiscano con uno sforzo comune, alla definizione di linee guida chiare per la corretta analisi ed interpretazione delle anomalie citogenetiche nei tumori.

Bibliografia

1. Brenda Summersgil, Jeremy Clark, Janet Shipley: Fluorescence and chromogenic in situ hybridization to detect genetic aberrations in formalin-fixed paraffin embedded material, including tissue microarrays. *Nature Protocols* 3,2 : 220-234, 2008
2. Petersen BL, Sørensen MC, Pedersen S, Rasmussen M. Fluorescence in situ hybridization on formalin-fixed and paraffin-embedded tissue: optimizing the method. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2004 Sep;12(3):259-65.
3. Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol*. 2002 Dec;161(6):1961-71. Review.
4. Tibiletti MG. Interphase FISH as a new tool in tumor pathology. *Cytogenet Genome Res*. 2007;118(2-4):229-36.
5. Tibiletti MG. Specificity of interphase fluorescence in situ hybridization for detection of chromosome aberrations in tumor pathology. *Cancer Genet Cytogenet*. 2004 Dec;155(2):143-8
6. [Perry A. Fluorescence In Situ Hybridization](#). *Molecular Genetic Testing in Surgical Pathology* Ed. by John D. Pfeifer. Lippincott Williams & Wilkins 2006
7. Schurter MJ, LeBrun DP, Harrison KJ. Improved technique for fluorescence in situ hybridisation analysis of isolated nuclei from archival, B5 or formalin fixed, paraffin wax embedded tissue. *Mol Pathol*. 2002 Apr;55(2):121-4.

8. Paternoster S.F., Brockman SR, Mc Clure RF, Remstein ED, Kurtin PJ, Dewald GW, A new methods to extract nuclei from paraffin-embedded tissue to study lymphomas using interphase fluorescence in situ hybridization. *Am J Pathol* 2002;160(6):1967-1972.
9. Varella-Garcia M. Molecular cytogenetics in solid tumors: Laboratorial tool for Diagnosis, Prognosis, and therapy. *The Oncologist* 2003; 8, 45-58.
10. ISCN. In: Shaffer LG, Tommerup N (eds). *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*, Basel: S Karger, 2005.
11. European Cytogeneticists Association (ECA). Permanent Working Group for Cytogenetics and Society. *Cytogenetics Guidelines and Quality Assurance. Newsletter No. 17 January 2006.*
12. Association for Clinical Cytogenetics (ACC). *Professional Guidelines for Clinical Cytogenetics. Haemato-Oncology Best Practice Guidelines. March 2007.*
13. Association for Clinical Cytogenetics (ACC). *Professional Guidelines for Clinical Cytogenetics. General Best practice. March 2007*
14. Association for Clinical Cytogenetics (ACC). *Professional Guidelines for Clinical Cytogenetics. Professional Standards Working Party of the Association of Clinical Cytogeneticists. 2001.*
15. Association for Clinical Cytogenetics (ACC). *FISH Scoring in Oncology, December 2003* (<http://.cytogenetics.org.uk>)
16. LINEE GUIDA PER LA DIAGNOSI CITOGENETICA-CONSENSUS 2007. ANALYSIS n.2/3.2007 Documenti Scientifici SDS-Snabi 1/2007