



RACCOMANDAZIONI PER L'ANALISI CITOGENETICA CLASSICA E MOLECOLARE NELLE MALATTIE ONCOEMATOLOGICHE: NEOPLASIE MIELOIDI E LEUCEMIE ACUTE

Gruppo di Studio "Leucemie Acute e Mielodisplasie"

Formatori: Ernesta Audisio, Daniela Cilloni

Componenti Gruppo di Studio che hanno approvato il documento:

Aydin Semra, Bruno Benedetto, Beggiato Eloise, Brustia Diego, Busca Alessandro, Casorzo Laura, Cerrano Marco, Cignetti Alessandro, Corcione Silvia, D'Ardia Stefano, De Gobbi Marco, De Rosa Francesco, Fava Carmen, Ferrero Dario, Freilone Roberto, Giai Valentina, Godio Laura, Lunghi Monia, Mattei Daniele, Messa Emanuela, Mordini Nicola, Nicolino Barbara, Pagliaro Maria, Patriarca Andrea, Pini Massimo, Rapezzi Davide, Stacchini Alessandra, Ulisciani Stefano

INTRODUZIONE

Il ruolo essenziale della Citogenetica nelle patologie oncoematologiche è stato definitivamente ratificato dalla World Health Organization [WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue 3th (2001), 4th (2008) and Revised 4 th Edition (2017)] con la definizione di precise entità nosologiche sulla base di specifici riarrangiamenti citogenetici e/o molecolari ad esse associati. La definizione delle anomalie cromosomiche e molecolari in ambito oncoematologico ha acquisito un'importanza crescente nella diagnosi, prognosi e monitoraggio della malattia minima residua. Di più recente acquisizione è il valore informativo del dato citogenetico/molecolare nella pianificazione terapeutica attraverso l'identificazione di sottogruppi di pazienti sensibili a particolari farmaci mirati. Nella Tab. 1 sono riassunti i test citogenetici/molecolari raccomandati nella diagnosi e prognosi delle neoplasie mieloidi e leucemie acute [Rack KA et al. 2019].

L'analisi citogenetica classica, pur in presenza di criticità metodologiche e nonostante lo sviluppo di tecnologie molecolari più avanzate capaci di rilevare simultaneamente variazioni del numero di copie, aberrazioni strutturali e mutazioni, rimane ancora oggi la tecnica di elezione per la definizione dell'assetto cromosomico nella sua interezza. 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 e/o molecolari con elevata sensibilità anche in cellule non proliferanti.

Proprio per la rilevanza del dato citogenetico e molecolare nella gestione del paziente oncoematologico, è fondamentale che i laboratori di Citogenetica siano dotati degli strumenti e del personale idonei sulla base di criteri *stabiliti* [SIGU Standard SIGUCERT/2013, Hastings RJ et al. 2013] e che la loro attività sia regolata dalla scelta delle metodologie più appropriate e degli algoritmi di lavoro più efficienti ed efficaci in conformità con le linee guida e raccomandazioni nazionali ed europee. Con l'obiettivo di delineare un percorso atto a uniformare l'attività dei laboratori di Citogenetica del Piemonte e Valle d'Aosta sulla base di comprovati standard qualitativi, il Gruppo di Studio "Leucemie Acute e Mielodisplasie" della Rete Oncologica del Piemonte e Valle d'Aosta propone il presente documento di raccomandazioni per l'analisi citogenetica classica e molecolare nelle malattie oncoematologiche e, in particolare, nelle neoplasie mieloidi e leucemie acute. Il documento viene redatto in conformità con le indicazioni delle linee guida della European LeukemiaNet (ELN), della European Cytogenetics Association (ECA) e della Società Italiana di Genetica Umana (SIGU).

Tab. 1 Test citogenetici/molecolari raccomandati nelle neoplasie mieloidi e leucemie acute [Rack KA et al. 2019]

Patologia	Test	Metodologia	Linee Guida
Leucemia mieloide cronica	Cariotipo	Analisi cromosomica FISH/Analisi molecolare	<i>Baccarani et al. 2013, 2015</i>
	<i>BCR-ABL1</i>		
	Mutazioni di <i>ABL1</i> (resistenza alla terapia)	Analisi molecolare	
Neoplasia Mieloproliferativa	Mutazioni di <i>JAK2, CALR, MPL</i>	Analisi molecolare	<i>WHO, 2017</i>
	Cariotipo	Analisi cromosomica (opzionale)	
Neoplasie mieloidi/linfoide con eosinofilia e anomalie di <i>PDGFRA, PDGFRB, FGFR1</i> o con riarrangiamento <i>PMC-JAK2</i>	Riarrangiamento dei geni <i>PDGFRA, PDGFRB, FGFR, PMC-JAK2</i>	FISH/Analisi molecolare	<i>Butt et al. 2017</i>
	Cariotipo	Analisi cromosomica	
Mielodisplasia	Cariotipo	Analisi cromosomica	<i>Malcovati et al. 2013</i>
	<i>-5/5q-, -7/7q-, MECOM (+8,20q-, delTP53)</i>	FISH/Analisi molecolare	
Leucemia Mieloide Acuta	Cariotipo	Analisi cromosomica	<i>Dohner et al. 2017</i>
	Geni di fusione ricorrenti <i>PML-RARA, CBFM-MYH11, RUNX1-RUNX1T1</i> . Riarrangiamento dei geni <i>KMT2A</i> e <i>MECOM</i>	FISH/Analisi molecolare	
	Mutazione dei geni <i>NPM1, CEBPA, RUNX1, FLT3, TP53, ASXL1</i>	Analisi molecolare	
Leucemia Linfoblastica Acuta	Geni di fusione ricorrenti (priorità correlata all'età del paziente). Cfr. Tab. 4	FISH/Analisi molecolare	<i>Hoelzer et al. 2016</i>
	Iper-diploidia	Analisi cromosomica o FISH o SNP-Array	
	Cariotipo	Analisi cromosomica	

RACCOMANDAZIONI GENERALI

ANALISI CITOGENETICA CLASSICA

I. Campione Biologico

La sensibilità dell'analisi citogenetica nelle neoplasie oncoematologiche risulta fortemente influenzata da:

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

Il sangue midollare (SM) è il tessuto di elezione nello studio delle neoplasie mieloidi e delle leucemie acute. L'analisi su sangue periferico (SP) è comunque perseguibile in casi selezionati, se in circolo è presente un significativo numero di blasti.

L'analisi cromosomica richiede campioni biologici (0,5-1 ml) "a fresco", sterili, trattati con anticoagulanti appropriati (Eparina sodica, Litio-eparina, Sodio-citrato), privi di conservanti e stabilizzanti, inviati possibilmente entro 12h o al massimo entro 24h dal prelievo [Hastings RJ et al. 2013; Rack KA et al. 2019].

I - Tecniche di Coltura

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

Sono tuttavia disponibili terreni di coltura condizionati o fattori di crescita specifici, atti a implementare il numero di metafasi e la loro qualità. Le tecniche di coltura cellulare di SM e SP sono definite in base all'indicazione clinica e al materiale biologico disponibile per l'analisi (Tab. 2). Per ciascun campione, se il materiale è sufficiente, devono essere allestite almeno due colture a tempi differenti.

La concentrazione ottimale di cellule in coltura è di $1-2 \times 10^6$ cellule/ml di terreno.

Uno/due giorni di coltura sono i tempi standard nelle neoplasie mieloidi, tuttavia in caso di sospetta leucemia mieloide acuta (LMA) con t(8;21) o t(15;17), sono preferibili colture a 48h in quanto è stato osservato che in colture a breve termine le cellule con tali aberrazioni cromosomiche possono meno facilmente essere rilevate [Hastings RJ et al. 2013; Rack KA et al. 2019] .

Tab. 2: Schema allestimento colture cellulari per l'analisi delle neoplasie mieloidi e delle leucemie acute mieloidi (LAM) e linfoidi (LAL)

Sospetto clinico	Materiale biologico	Tempi di coltura
Neoplasie mieloproliferative (MPN): LMC, Policitemia Vera, Trombocitemia Essenziale, Mielofibrosi	SM	24/48h
	SP	
Sindromi Mielodisplastiche (MDS): AREB	SM	24/48h
	SP	
Leucemie Mieloidi Acute. Leucemie Linfoblastiche Acute	SM	Diretta*/24/48h**
	SP	
Citopenie: anemie, neutropenie, piastrinopenie, pancitopenie	SM	24/48

* se blasti circolanti (>10%) ** in caso di sospetta di LMA con t(8;21) o t(15;17).

II - Analisi Cromosomica

Un'analisi completa del cariotipo 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 [Tab. 1].

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, alla risoluzione del bandeggio e al momento in cui l'esame viene eseguito.

Malattia all'esordio

In generale è raccomandata l'analisi di almeno 20 metafasi, in particolare quando non risultino evidenti aberrazioni cromosomiche.

Dieci metafasi devono essere completamente analizzate con ricostruzione del cariotipo e altre dieci contate e controllate per la presenza di anomalie strutturali.

Se è presente un cariotipo normale in meno di 20 metafasi, nel referto deve essere segnalato il limite dell'indagine eseguita che non può escludere con accuratezza la presenza di una anomalia cromosomica clonale [Hook EB. 1977].

Se è presente una aberrazione cromosomica clonale devono essere analizzate almeno 10 metafasi.

Follow-up

In caso di cariotipo anomalo alla diagnosi e cariotipo normale al *follow up*, un minimo di 20 metafasi deve essere analizzato o controllato. Un minimo di 10 metafasi è sufficiente se il clone anomalo risulta ancora presente.

Qualora le notizie cliniche indicassero una ripresa di malattia o una refrattarietà alla terapia o un sospetto di seconda neoplasia ematologica, il campione dovrebbe essere processato e analizzato seguendo le indicazioni previste per malattia all'esordio [Hastings RJ et al. 2013; Rack KA et al. 2019].

L'indagine cromosomica deve essere eseguita utilizzando tecniche di bandeggio.

La definizione delle anomalie clonali da riportare nel cariotipo tumorale e i criteri di clonalità devono essere in accordo con il documento "International System for Human Cytogenetic Nomenclature-2016" [ISCN-2016].

Sono definite clonali le anomalie strutturali e le trisomie/polisomie presenti in almeno due metafasi e le monosomie in almeno tre metafasi [ISCN-2016].

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 o ricorrente nella neoplasia in studio.

Nel caso di anomalia sospetta per una possibile origine costituzionale, si può estendere l'indagine ad ulteriori metafasi in modo da evidenziare la linea cellulare normale, se presente, o si può richiedere un controllo del cariotipo costituzionale su linfociti stimolati con PHA (Phytoemagglutina) [Hastings RJ et al. 2013; Rack KA et al. 2019].

ANALISI CITOGENETICA MOLECOLARE (FISH)

La FISH, poiché identifica specifiche sequenze bersaglio, è utilizzata come tecnica complementare alla citogenetica convenzionale e può essere eseguita sia su metafasi sia su nuclei interfascici.

FISH su metafase: è raccomandata per la definizione di specifiche alterazioni cromosomiche (submicroscopiche o criptiche) non identificabili con le tecniche di bandeggio e per l'identificazione di specifiche alterazioni citogenetiche in casi in cui la qualità delle metafasi sia subottimale.

FISH su nuclei interfascici: pur fornendo un'informazione limitata alle specifiche anomalie ricercate, è particolarmente utile in casi di neoplasia a basso indice proliferativo.

Permette di analizzare un alto numero di cellule e quindi ha una maggiore sensibilità rispetto alla citogenetica classica nell'identificazione dell'eterogeneità citogenetica intratumorale, nel monitoraggio della malattia residua minima e nel post-trapianto, sebbene la RQ-PCR e altre tecniche molecolari siano più appropriate.

Alla diagnosi, è raccomandata l'analisi di un minimo di 100 nuclei in interfase.

Al *follow-up*, in caso di anomalie presenti alla diagnosi, devono essere analizzati almeno 200 nuclei, per verificare la persistenza di riarrangiamenti riscontrati all'esordio [Hastings RJ et al. 2013; Rack KA et al. 2019].

RACCOMANDAZIONI SPECIFICHE PER PATOLOGIA

Leucemia Mieloide Cronica

Diagnosi

E' prevista l'analisi del cariotipo, che rimane il *gold standard* per la diagnosi di leucemia mieloide cronica (Tab. 1). Il tessuto di elezione è il sangue midollare, ma in caso di impossibilità ad ottenerlo, l'analisi può essere condotta su sangue periferico se la percentuale di blasti circolanti è superiore al 10%.

Devono essere analizzate 20 metafasi per l'individuazione del cromosoma Philadelphia (Ph) e per escludere la presenza di aberrazioni cromosomiche addizionali (ACA), secondo le raccomandazioni dell' European LeukemiaNet (ELN) [Baccarani M. 2013; Baccarani M. 2015].

L'analisi FISH è essenziale nei casi con un insufficiente numero di metafasi o in cui il cromosoma Ph non sia evidenziabile o sia presente una traslocazione variante (5-10%).

La FISH deve essere eseguita anche nei casi con un cariotipo apparentemente normale per escludere un riarrangiamento criptico [Hastings RJ et al. 2013; Rack KA et al. 2019].

Si raccomanda l'utilizzo di sonde *Dual fusion* che producono un *pattern* di segnali più affidabile.

Follow-up

L'analisi cromosomica è richiesta anche durante il *follow-up*. Le linee guida ELN raccomandano l'analisi citogenetica a 3 e a 6 mesi e quindi ogni 6 mesi post-trattamento fino al raggiungimento della risposta citogenetica completa, ma un controllo più frequente può essere richiesto per pazienti con ACA.

Durante il monitoraggio post-trattamento devono essere analizzate almeno 20 metafasi [Baccarani M. 2015]. La risposta citogenetica (CgR) viene valutata come riportato in Tab. 3 [Baccarani M et al. 2009].

Raggiunta la remissione citogenetica completa, l'analisi cromosomica può essere sostituita dalla FISH. In questa fase, una accurata interpretazione dell'analisi FISH presuppone la conoscenza del preciso *pattern* di segnali presente alla diagnosi.

Da sottolineare, i casi con un singolo segnale di fusione (conseguente a delezione di sequenze di *ABL* e/o *BCR*) non possono essere accuratamente monitorati in FISH. Nei casi di riarrangiamento *BCR/ABL* criptico, il follow-up deve essere eseguito necessariamente con analisi FISH.

Tab. 3 Risposta Citogenetica [Baccarani M et al. 2009]

Risposta Citogenetica	% Cromosoma Ph
Nessuna risposta	96-100%
Risposta minima	66-95%
Risposta minore	36-65%
Risposta parziale	1-35%
Remissione citogenetica completa	0%

Neoplasie mieloproliferative

L'indagine citogenetica non è considerata essenziale (Tab. 1), talora limitandosi all'esclusione del riarrangiamento *BCR/ABL* nella diagnosi differenziale con la leucemia mieloide cronica. Recentemente, tuttavia, il dato citogenetico è stato incluso nel DIPSSPlus Prognostic Scoring System nella mielofibrosi primaria [Caramazza D. 2011; Hussein K. 2010; Tefferi A. 2018].

Il sangue midollare è il tessuto di elezione, ma in particolare in caso di mielofibrosi il sangue periferico può essere informativo. Se si riscontra un cariotipo anomalo, è sufficiente l'analisi completa di 5 metafasi e il conteggio di altre 5 metafasi. In caso di cariotipo normale devono essere analizzate 20 metafasi. In caso di fallimento dell'analisi citogenetica, è raccomandata l'analisi FISH per la rilevazione delle delezioni/monosomie dei cromosomi 5 e 7, della trisomia 8, delle anomalie 1p/1q e della delezione 17p13.1 (*TP53*), per il loro significato prognostico e come indicatori di evoluzione del cariotipo [Hastings R. 2013].

Neoplasie mieloidi/linfoidi con eosinofilia e anomalie di *PDGFRA*, *PDGFRB*, *FGFR1* o con riarrangiamento *PMC-JAK2*

L'individuazione del riarrangiamento dei geni *PDGFRA*, *PDGFRB*, *FGFR1*, *PMC-JAK2* mediante tecniche molecolari (FISH o RT-PCR) è fondamentale per la possibilità di strategie terapeutiche mirate.

Dal momento che la maggior parte dei suddetti riarrangiamenti (tranne *FIP1L1-PDGFRA*) è determinata da aberrazioni cromosomiche visibili, anche l'analisi citogenetica risulta informativa.

Mielodisplasia

L'analisi citogenetica su sangue midollare deve essere eseguita in tutti i pazienti con sospetto di mielodisplasia. Una serie di aberrazioni cromosomiche ricorrenti ha significato diagnostico anche in assenza di anomalie morfologiche correlate [Swerdlow SH. 2017].

Inoltre la categoria di rischio citogenetico è inclusa nell' IPSS e IPSS-R (International Prognostic Scoring System) [Greenberg PL. 2012; Schanz J. 2012].

In caso di riscontro di un cariotipo anomalo, è sufficiente l'analisi completa di 5 metafasi e il conteggio di altre 5 metafasi. In caso di cariotipo normale devono essere analizzate 20 metafasi [Hastings R. 2013].

La FISH deve essere eseguita in caso di assenza o di un numero insufficiente di metafasi mediante la ricerca di monosomia 5/delezione 5q, monosomia 7/delezione 7q e può essere estesa alla valutazione della trisomia 8, delezione 20q e delezione di *TP53*.

Ove la morfologia o l'immunofenotipo suggerissero la presenza di una delezione 5q o di un riarrangiamento del gene *MECOM*, in assenza di relativa anomalia citogenetica, ulteriori accertamenti (FISH) dovrebbero essere intrapresi [Rack KA. 2019].

Leucemia Mieloide Acuta

Diagnosi

Un numero crescente di LMA è definito dalla presenza di specifiche anomalie citogenetiche e molecolari [Swerdlow SH. 2017] per cui l'analisi cromosomica è un passaggio fondamentale nella diagnosi e nella stratificazione del rischio. Il sangue midollare è il tessuto di elezione, ma l'analisi può essere condotta su sangue periferico se la percentuale di blasti circolanti è superiore al 10%. Se si riscontra un cariotipo anomalo, è sufficiente l'analisi completa del cariotipo di 5 metafasi e il conteggio di altre 5 metafasi controllate per la presenza di anomalie aggiuntive. In caso di cariotipo normale, devono essere analizzate 20 metafasi, di cui 10 con ricostruzione del cariotipo e 10 contate e controllate per la presenza di eventuali anomalie strutturali.

In caso di fallimento delle colture, di un esiguo numero di metafasi nei preparati o in caso si sospetti una aberrazione cromosomica specifica non confermata dal cariotipo, è prevista l'indagine FISH per i riarrangiamenti *PML/RARA*, *CBFB-MYH11*, *RUNX1-RUNX1T1*, per la monosomia 5/delezione 5q e monosomia 7/delezione 7q. Data l'importanza ai fini della prognosi e la difficoltà a identificare su metafase i riarrangiamenti dei geni *KMT2A* e *MECOM*, una loro ricerca in FISH è altamente raccomandata in tutti i casi di LMA alla diagnosi, quando non siano evidenti altre anomalie entità-specifiche.

L'analisi FISH è raccomandata anche quando sia necessario un risultato in tempi rapidi, come nel caso del riarrangiamento *PML-RARA*. Per quanto riguarda i riarrangiamenti *RUNX1/RUNX1T1*, *CBFB*, *MLL*, ecc. una analisi FISH comprendente il relativo pannello di sonde può essere eseguita in tutti i casi di leucemia mieloide acuta all'esordio, quando non si disponga di un risultato molecolare sufficientemente tempestivo. In caso contrario, l'analisi FISH, estesa anche alla delezione /monosomia dei cromosomi 5 e 7 o ad altre anomalie cromosomiche, va concordata specificamente con l'ematologo.

Follow-up

L'analisi cromosomica, sebbene non mandatoria, può essere utile nel monitoraggio post-trattamento, in particolare, in caso di refrattarietà alla terapia o di ripresa di malattia.

In caso di cariotipo anomalo alla diagnosi, è raccomandata l'analisi di 20 metafasi con tecnica di bandeggio o di 100 nuclei in FISH per la rilevazione delle aberrazioni riscontrate all'esordio.

Ripresa di malattia

L'analisi citogenetica completa di 10 metafasi riportanti l'anomalia riscontrata all'esordio è sufficiente per la valutazione della ripresa di malattia. Se l'anomalia cromosomica originaria non è più presente e c'è la possibilità che sia insorta una seconda neoplasia, una analisi citogenetica completa diagnostica deve essere espletata al fine di escludere o confermare una nuova, diversa patologia [Hastings RJ et al. 2013; Rack KA et al. 2019].

Leucemia Linfoblastica Acuta

Le aberrazioni più significative dal punto di vista diagnostico e prognostico nelle leucemie linfoblastiche acute a cellule B (B-LLA) sono: la t(9;22)(q34;q11.2), i riarrangiamenti del gene *KTM2A (MLL)*, la t(12;21)(p13;q22); *ETV6-RUNX1*, l'iperdiploidia, l'ipodiploidia; la t(1;19)(q23;p13.3); *TCF3-PBX1*, l'amplificazione intracromosomica del cromosoma 21 (iAMP21) e la t(17;19)(q22;p13.3); *TCF3-HLF* [Swerdlow SH. 2017]. La diagnostica nella B-LLA non può prescindere dall'analisi cromosomica e dallo screening dei riarrangiamenti genici ricorrenti mediante FISH/RT-PCR. Tuttavia la scelta delle metodologie da utilizzare di *routine* nei singoli laboratori dipenderà dalla valutazione costi/benefici e dalla casistica afferente. E' auspicabile quindi una razionalizzazione delle risorse disponibili, prevedendo l'invio dei campioni a centri dotati delle tecnologie ed *expertise* più adeguate. In particolare, si raccomanda che siano testati di *routine*, simultaneamente o in modo sequenziale sulla base dell'età del paziente, i riarrangiamenti *BCR-ABL1*, *ETV6-RUNX1* e *KTM2A (MLL)*, (Tab. 4) [Rack KA. 2019].

Tab. 4 Test raccomandati nella diagnosi di LLA in base all'età del paziente

	Età del paziente	Test raccomandato	Opzionale
B-LLA	< 1 anno	<i>KTM2A (MLL)</i>	<i>ETV6-RUNX1</i> , <i>BCR-ABL1</i>
	< 25 anni	<i>ETV6-RUNX1</i> , <i>BCR-ABL1</i> , poi <i>KTM2A</i> e <i>TCF3</i>	
	Adulto	<i>BCR-ABL1</i> poi <i>KTM2A</i> e <i>TCF3</i>	<i>ETV6-RUNX1</i>
T-LLA	Età pediatrica e adulta		<i>TLX3</i> , <i>TLX1</i> , <i>KMT2A</i> , <i>TAL1</i> <i>LMO2</i> e <i>ABL1</i>

Il pannello di test proposto, per la presenza della sonda relativa al gene *RUNX1* (21q22.12), permette di individuare anche l' iAMP21, che viene definita dalla presenza di almeno 5 segnali FISH di *RUNX1* in nuclei in interfase e o da 3 o più segnali di *RUNX1* su un singolo cromosoma 21 nei preparati FISH su metafase. Il *pattern* di segnali a "cluster" è fortemente suggestivo di amplificazione, mentre segnali tra loro distinti sono più verosimilmente conseguenti ad un cariotipo iperdiploide.

Gli assetti cromosomici di tipo iperdiploide e ipodiploide sono associati rispettivamente a prognosi favorevole e sfavorevole e la loro interpretazione non è sempre scontata, perché cloni nel *range* aploide possono duplicare il loro corredo cromosomico mimando un cariotipo iperdiploide. La definizione del numero modale cromosomico prevede l'analisi del cariotipo, anche se pannelli di sonde FISH possono surrogare la citogenetica classica.

Le cellule linfoidei sono infatti meno facilmente coltivabili in vitro rispetto alle cellule mieloidi. I laboratori dovrebbero quindi allestire un preparato direttamente nella giornata di arrivo dal campione di midollo e a 24 e 48 ore per le B-LLA e a 72 ore per le T-LLA. Nelle B-LLA l'aggiunta di fattori di crescita ai terreni di coltura migliora la qualità dei preparati, così come l'utilizzo della PHA nelle T-LLA. E' raccomandato l'allestimento di colture multiple e a tempi differenti, quando possibile.

Alla diagnosi, in caso di riscontro di un cariotipo anomalo, è sufficiente l'analisi completa di 10 metafasi con anomalia cromosomica clonale. In caso di cariotipo normale, devono essere analizzate 20 metafasi, di cui 10 con ricostruzione del cariotipo e 10 contate e controllate per la presenza di eventuali anomalie strutturali.

Per quanto riguarda l'analisi citogenetica durante il *follow-up* e ripresa di malattia, si fa riferimento a quanto riportato nel capitolo "Leucemia mieloide acuta" [Hastings RJ et al. 2013; Rack KA et al. 2019].

Nella T-LLA le anomalie numeriche sono meno frequenti rispetto alla B-LLA, anche se nel 5% dei casi si osserva una tetraploidia [Swerdlow SH. 2017]. Il 35% dei casi presenta un riarrangiamento dei *loci* relativi ai Recettori delle Cellule T (*TCR*) in 7q34(*TCRB*) e 14q11.2(*TCRA/D*). La FISH per la ricerca dei riarrangiamenti dei geni *TLX3*, *TLX1*, *KTM2A*, *TAL1*, *LMO2* e *ABL1* è opzionale e la ricerca del riarrangiamento *BCR-ABL1* ha il doppio scopo di rilevare sia il gene di fusione sia l'amplificazione di *ABL1*, suggestiva della presenza di episomi *NUP214-ABL1* [Hagemeijer A et al. 2010].

REFERTAZIONE

I - 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. In tab. 5 sono riportati i tempi di refertazione relativi all'analisi citogenetica classica e molecolare secondo le linee guida dell' ECA Permanent Working Group for Cytogenetics [*Hastings RJ et al. 2013*].

Tab. 5 Tempi di refertazione raccomandati [*Hastings et al. 2013*]

Analisi urgente (es. Leucemia acuta)	95% dei casi dovrebbero essere refertati in 10 giorni consecutivi. In questi casi è adeguata una analisi FISH a scopo diagnostico, seguita da analisi cromosomica a conferma, nei tempi indicati per le analisi di <i>routine</i> .
Test rapido in FISH es. t(15;17)	95% dei casi refertati in 3 giorni.
Analisi citogenetica di routine	95% dei casi refertati entro 21 giorni.

II - Referto

Il referto citogenetico deve essere redatto in conformità con gli standard ISO 15189 e deve includere le seguenti informazioni:

- a) **Dati relativi alla struttura**
 - identificazione dettagliata della Struttura
- a) **Dati identificativi del paziente e del campione**
 - cognome e nome del paziente;
 - data di nascita del paziente;
 - codice identificativo del campione/paziente;

- data del prelievo;
- data di ricezione del campione;
- identificazione del medico/reparto/struttura richiedente;
- indicazione all'indagine;
- tipo di campione;
- data della conclusione dell'indagine;
- a) Dati relativi alle tecniche utilizzate : Analisi cromosomica**
- tecnica/e utilizzate (colture a 24/48/72 ore o altro, specificare eventuale agente stimolante o terreno condizionato utilizzati);
- tecnica/e di bandeggio;
- risoluzione del bandeggio;
- numero di cellule analizzate;
- a) Dati relativi all'indagine citogenetica: Analisi FISH**
- sonda/e utilizzate. Occorre specificare chiaramente il tipo di sonda utilizzata (nome commerciale/ditta fornitrice/clone/locus/gene).
- tessuto/campione analizzato (SP, MO, plasmacellule o altro);
- cellule coltivate o non coltivate;
- numero di nuclei e/o metafasi analizzate per sonda;
- numero di cellule anomale riscontrate nel preparato;
- a) Dati relativi ai risultati dell'analisi**
- definizione del cariotipo e dei risultati FISH secondo la versione più aggiornata dell'ISCN;
- descrizione delle anomalie numeriche e strutturali riscontrate, inclusi i bracci e le bande cromosomiche coinvolte nel riarrangiamento;
- descrizione degli sbilanciamenti derivanti dai riarrangiamenti cromosomici e aneuploidie;
- eventuale commento sulle limitazioni dell'analisi o sul suo incerto significato, soprattutto quando l'indagine non ha raggiunto gli standard qualitativi previsti dalle linee guida;
- commento sulla consistenza delle anomalie riscontrate rispetto al

- quesito diagnostico;
- il riferimento alla patologia deve essere fatta sec. la classificazione WHO;
 - associazione con la prognosi, se validata da pubblicazioni/trial clinici internazionali;
 - anomalie presenti in una singola cellula (non clonali) o eteromorfismi non devono essere inseriti nel cariotipo descritto sec. ISCN, ma possono essere riportati in un commento;
 - nome dei geni coinvolti nei riarrangiamenti cromosomici ricorrenti, espressi sec. la nomenclatura HUGO (Human Genome Organisation);
- a) Dati relativi alla firma**
- Nome e firma di uno o due Dirigenti responsabili dell'indagine.
La firma può essere generata manualmente o elettronicamente.

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 Società Italiana di Genetica Umana (SIGU), di cui si riporta estratto in Tab. 6.

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. Di seguito vengono riportati gli indicatori della fase analitica proposti dai disciplinari SIGU per i laboratori di Genetica Medica (Tabella 6). I risultati del monitoraggio del sistema di gestione devono essere riesaminati periodicamente nell'ottica del miglioramento continuo.

Tab. 6 Indicatori SIGU laboratori di citogenetica

Area	Contenuto del requisito	Modalità di verifica – Indicatore di conformità
REQUISITI PER GARANTIRE LA QUALITA' DEI TEST GENETICI		
CARICHI DI LAVORO	I carichi di lavoro devono essere organizzati in modo da non raggiungere livelli troppo elevati, tali da indurre pressioni che possano essere causa di errore. Deve essere considerato inoltre che il volume di attività può essere influenzato dall'esperienza professionale dei singoli operatori, dal livello organizzativo, dal grado di automazione delle dotazioni strumentali del laboratorio e dalla complessità delle indagini eseguite.	<i>CARICHI DI LAVORO ANNUALI PREVISTI:</i> Analisi del Cariotipo (Onco-Ematologiche): 250-350 <u>OPPURE</u> Analisi di Citogenetica molecolare (FISH): 400-450 <u>OPPURE</u> Tecniche citogenetica molecolare ad alta specializzazione: 150-220
LIVELLI MINIMI DI ATTIVITA' IN CITOGENETICA	Per mantenere un adeguato livello di competenza e di qualità delle analisi è necessario che il laboratorio esegua, per ciascuna tipologia di diagnosi citogenetica offerta, almeno 100 casi/anno e, complessivamente, non meno di 1200 casi/anno	100 casi/anno e, complessivamente, non meno di 1200 casi/anno.
FALLIMENTI/ANNO	Il Laboratorio deve mantenere sotto controllo i fallimenti su campioni idonei nel corso dell'anno.	Fallimenti/anno Analisi cariotipo Onco-Ematologiche (assenza di metafasi nel preparato): < 10% Fallimenti FISH Patologie Onco-Ematologiche: < 5% Analisi cariotipo Onco-Ematologiche inferiori agli standard SIGU/ECA (meno di 20 metafasi analizzate per paziente): < 20%
PERCENTUALE CAMPIONI NON IDONEI PER TIPOLOGIA	Il Laboratorio deve registrare e mantenere sotto controllo il numero dei campioni non idonei pervenuti e attuare azioni correttive/preventive per limitarne il numero..	Monitoraggio dei campioni non idonei per tipologia come non conformità. Azioni correttive e preventive.
CONTROLLI DI QUALITA'	ESTERNI: Il laboratorio deve partecipare per i test citogenetici e molecolari a programmi di verifica esterna della qualità (VEQ) a livello nazionale (Istituto Superiore Sanità ISS) ed europeo (Es: Cytogenetic European Quality Assessment CEQA). Qualora non venissero raggiunti gli standard va intrapresa una verifica del processo in oggetto.	Iscrizioni a VEQ e risultati VEQ

Referenze

- Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology <http://atlasgeneticsoncology.org/>
- Baccarani M, Castagnetti F, Gugliotta G, Rosti G. A review of the European LeukemiaNet recommendations for the management of CML. *Ann Hematol.* 2015;94(Suppl 2):S141–7.
- Baccarani M, Cortes J, Pane F, Niederwieser D, Saglio G, *et al.* European LeukemiaNet. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J Clin Oncol.* 2009 Dec 10;27(35):6041–51.
- Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, Hochhaus A, Soverini S, *et al.* European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2013;122:872–84.
- Butt NM, Lambert J, Ali S, Beer PA, Cross NCP, Duncombe A, *et al.* Guideline for the investigation and management of eosinophilia. *Br J Haematol.* 2017;176:553–72.
- Caramazza D, Begna KH, Gangat N, Vaidya R, Siragusa S, Van Dyke DL, *et al.* Refined cytogenetic-risk categorization for overall and leukemia-free survival in primary myelofibrosis: a single center study of 433 patients. *Leukemia.* 2011;25:82–88.
- Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, *et al.* Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood.* 2017;129:424–47.
- Earle VL, Ross F, Fisher A, Strike P, Berrington S, Chiecchio L, *et al.* Haemopoietic growth factors significantly improve the mitotic index and chromosome quality in cytogenetic cultures of myeloid neoplasia. *Genes Chromosomes Cancer.* 2007;46:670–4.
- Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Solé F, *et al.* Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2012;120:2454–65.
- Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters S, Goldstone AH, *et al.* Refinement of cytogenetic classification in AML: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities amongst 5635 younger adults treated in the UK MRC trials. *Blood.* 2010;116:354–65.
- Grimwade D, Ivey A, Huntly BKJ. Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood.* 2017;129:424–47.
- Hagemeyer A, Graux C. ABL1 rearrangements in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer.* 2010;49:299–308.
- Hastings RJ, Howell R, Betts D, Porter S, Haferlach C, Dastugue N, *et al.* Guidelines and Quality Assurance for acquired Cytogenetics. E.C.A. European Cytogeneticists Association newsletter N° 31. 2013.



Heim S, Mitelman F. Cancer Cytogenetics. 4th Ed. UK: Wiley-Blackwell Press; 2015.

Hoelzer D, Bassan R, Dombret H, Fielding A, Ribera JM, Buske C. Acute lymphoblastic leukaemia in adult patients: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2016;27(suppl_5):69–82.

Hook EB. Exclusion of chromosomal mosaicism: tables of 90%, 95% and 99% confidence limits and comments on use. *Am J Hum Genet.* 1977;29:94–97. 18. Gozzetti A, Le Beau MM.

Hussein K, Pardanani AD, Van Dyke DL, Hanson CA, Tefferi A. International Prognostic Scoring System-independent cytogenetic risk categorization in primary myelofibrosis. *Blood.* 2010;115:496–9.

ISCN: an international system for human cytogenomic nomenclature 2016. In: McGowan-Jordan J, Simons A, Schmid M, editors. Basel: S. Karger; 2016.

ISO 15189:2012 Medical laboratories-requirements for quality and competence. <https://iso.org/>

Linee Guida per la Diagnosi Citogenetica Consensus 2007 <https://www.SIGU.net>.

Malcovati L, Hellström-Lindberg E, Bowen D, Adès L, Cermak J, del Cañizo C, et al. Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the European LeukemiaNet. *Blood.* 2013;122:2943–64.

Mitelman F, Johansson B, Mertens F. Mitelman database of chromosome aberrations and gene fusions in cancer. 2018. <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>

Moorman AV, Ensor HM, Richards SM, Chilton L, Schwab C, Kinsey SE, et al. Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: results from the UK Medical Research Council ALL97/99 randomised trial. *Lancet Oncol.* 2010;11:429–38.

Rack KA, van den Berg E, Haferlach C, Beverloo HB, Costa D, Espinet B, Foot N, Jeffries S, Martin K, O'Connor S, Schoumans J, Talley P, Telford N, Stioui S, Zemanova Z, Hastings RJ. European recommendations and quality assurance for cytogenomic analysis of haematological neoplasms. *Leukemia.* 2019 Aug;33(8):1851-1867.

Schanz J, Tüchler H, Solé F, Mallo M, Luño E, Cervera J, et al. New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *J Clin Oncol.* 2012;30:820–9.

Società Italiana di Genetica Umana (SIGU). Sistema di Gestione per la Qualità nelle Strutture Cliniche di Genetica Medica. STANDARD SIGUCERT/2013.

Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th ed. Lyon: IARC; 2017.



Tefferi A, Nicolosi M, Mudireddy M, Lasho TL, Gangat N, Begna KH, et al. Revised cytogenetic risk stratification in primary myelofibrosis: analysis based on 1002 informative patients. *Leukemia*. 2018;32:1189–99.