

ONCOEMATOLOGIA TRA SOSTENIBILITÀ E ADERENZA

IL CASO DEL TRIVENETO

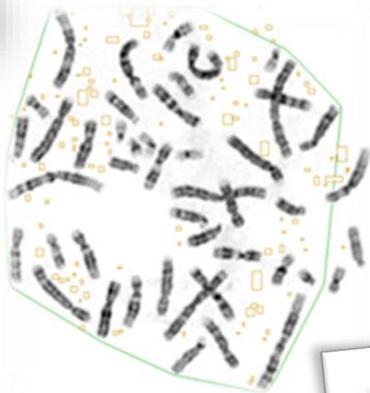


Importanza delle tecniche citogenetiche nella diagnosi del mieloma multiplo

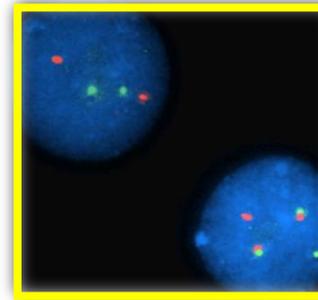
Lucia Zanatta

Laboratorio di Citogenetica – U.O. Anatomia Patologica
Ospedale Cà Foncello, Treviso

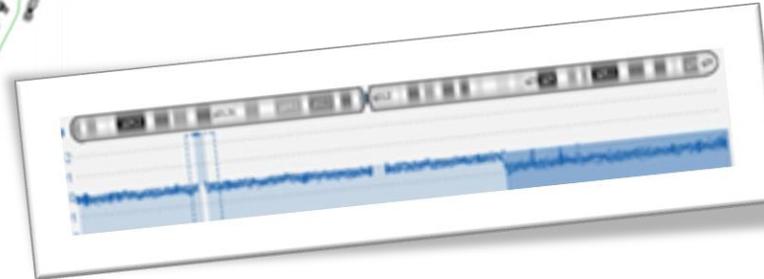
Citogenomica nel Mieloma multiplo



Cariotipo



FISH



Array-CGH



Necessità di armonizzazione

Assicurare la comparabilità dei risultati tra laboratori che utilizzano metodiche differenti



Esigenza di armonizzare tutti i vari aspetti delle fasi operative:

- Fase PRE-ANALITICA (prelievo, conservazione e trasporto del campione)
- Fase ANALITICA: utilizzo di metodiche condivise, standardizzate, validate e raccomandate dalle Linee guida internazionali
- Fase POST-ANALITICA: limite di sensibilità del test



Laboratori che utilizzano metodiche differenti possono produrre risultati diversi con conseguenze sul trattamento farmacologico del paziente

FASE PRE-ANALITICA

La fase preanalitica comprende differenti passaggi procedurali dove l'incidenza di diverse variabili può influire sulla **qualità del campione**, sui **risultati di laboratorio** e sul loro **utilizzo clinico**.

Difficoltà tecniche durante la fase preanalitica relative alle modalità di raccolta, trattamento, conservazione e trasporto del campione possono determinare la sua non idoneità.



Articles and Brief Reports

Multiple Myeloma

Report from the European Myeloma Network on interphase FISH in multiple myeloma and related disorders

Fiona M. Ross,¹ Hervé Avet-Loiseau,² Geneviève Ameye,³ Norma C. Gutiérrez,⁴ Peter Liebisch,⁵ Sheila O'Connor,⁶ Klara Dalva,⁷ Sonia Fabris,⁸ Adele M. Testi,⁹ Marie Jarosova,¹⁰ Clare Hodgkinson,¹¹ Anna Collin,¹² Gitte Kernstrup,¹³ Petr Kuglik,¹⁴ Dariusz Ladon,¹⁵ Paolo Bernasconi,¹⁶ Brigitte Maes,¹⁷ Zuzana Zemanova,¹⁸ Kyra Michalova,¹⁸ Lucienne Michau,¹⁹ Kai Neben,²⁰ N. Emil U. Hermansen,²¹ Katrina Rack,²² Alberto Rocci,²³ Rebecca Protheroe,¹ Laura Chiecchio,¹ Hélène A Poirel,³ Pieter Sonneveld,²⁴ Mette Nyegaard,²⁵ Hans E. Johnsen²⁵ on behalf of the European Myeloma Network²⁶

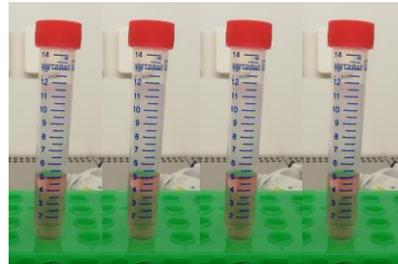
Haematologica 2012

La **QUALITA' DEL CAMPIONE** è un fattore chiave

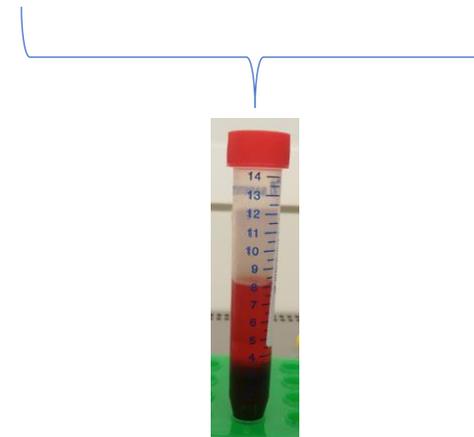
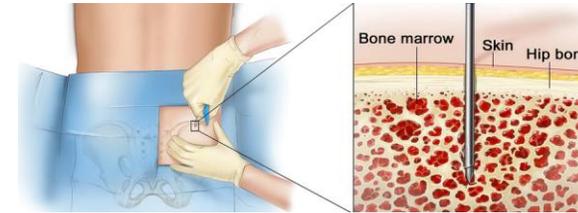
Although **laboratories** involved in providing the FISH analysis for clinical trials will make **every effort to 'rescue' poor samples**, it is strongly recommended that **referring clinicians** should also **maximize the chances of adequate results being obtained**.

Laboratorio di Citogenetica

U.O. di Ematologia



Terreno di trasporto
con anticoagulante
(RPMI, PS, eparina)



Per analisi citogenetiche:

- prima parte dell'aspirato midollare
- 0.5-1ml

N.B marrow samples taken for morphological review are often the highest quality 'first-pull' marrow aspirate samples while those sent for laboratory investigations are often secondary aspirate samples with a higher degree of peripheral blood contamination.

Il campione deve essere consegnato presso il Lab. di Citogenetica in tempi rapidi poiché le PC, fuori dal loro ambiente, tendono a perdere l'espressione di CD138 e rendere quindi inutile l'analisi citogenetica

N.B All methods require immediate processing of samples when received by the laboratory, which should be with minimum delay.



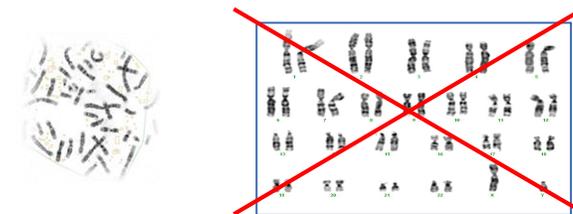
FASE ANALITICA



Il 70% dei casi analizzati presenta un cariotipo non alterato

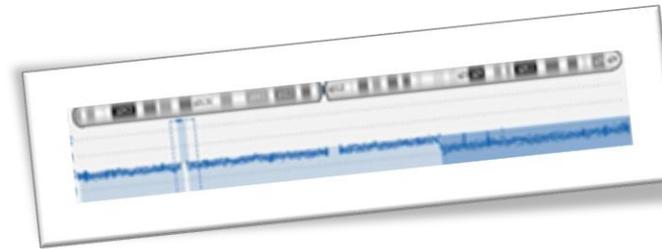
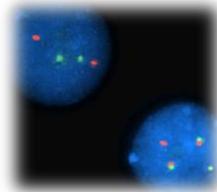
- Basso indice mitotico delle Plasmacellule (difficoltà ad ottenere metafasi anomale)
- Parziale infiltrazione midollare
- Traslocazioni con *breakpoint* telomerici

Karyotype is not a routine test



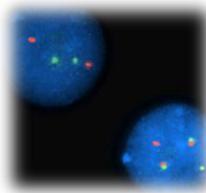


- **Basso indice mitotico delle Plasmacellule**

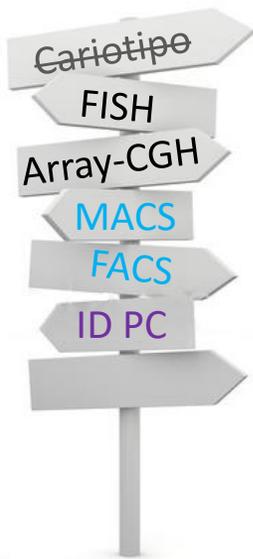


SI FISH e array-CGH

- **Traslocazioni bilanciate**



FISH



Parziale infiltrazione midollare

La metodica FISH non può essere eseguita direttamente sul campione appena raccolto.

Arricchimento plasmacellule

Magnetic Cell Sorting (MACS)

Flow Cytometric Cell Sorting

Identificazione plasmacellule

sistemi di analisi delle immagini che consentono la valutazione morfologica delle PC e lo scoring FISH solo in quelle cellule designate come PC



All of these methods give good results and the choice should be left to individual laboratories.

Magnetic Cell Sorting



Vantaggi: popolazione pura di PC che può essere analizzata con metodica FISH o tecniche di copy number analyses

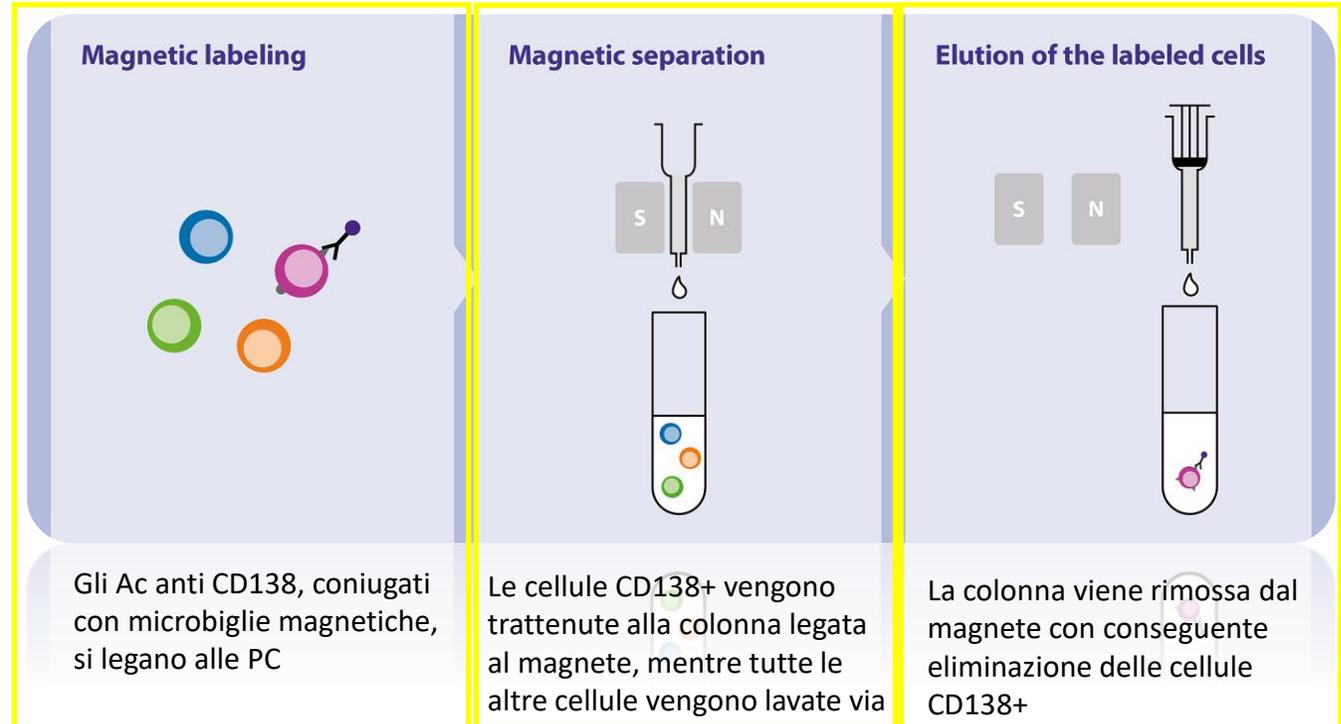
Maggior limite: perdita di cellule durante il processo di purificazione



labor, time,
cost intensive



MACS Cell Separation





Case	1q21 gain	t(4;14)	t(14;16)	del(TP53)
	non-PCE/PCE	non-PCE/PCE	non-PCE/PCE	non-PCE/PCE
1	0/0	0/70	0/0	0/0
2	0/80	0/0	0/0	0/0
3	0/0	0/0	0/0	0/0
4	0/0	0/0	0/80	0/0
5	25/55	0/0	0/0	0/0
6	0/0	30/95	0/0	30/95
7	0/0	0/0	0/0	0/50
8	0/0	0/0	0/0	0/0
9	0/90	0/0	0/0	0/0
10	0/0	0/0	0/0	0/0
11	0/0	0/0	0/0	0/0
12	30/90	0/0	0/0	0/0
13	0/0	0/0	0/0	0/0

L'arricchimento delle PC aumenta la sensibilità della FISH nel rilevare alterazioni citogenetiche

Attenzione ai falsi negativi quando non si utilizzano metodi di PCE

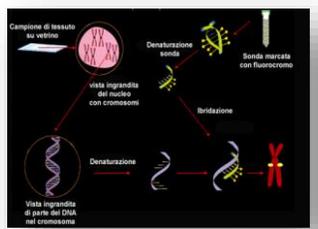
L'analisi FISH non è consigliata senza un metodo di arricchimento o identificazione delle PC

FISH is the standard technique

TECNICHE DI ANALISI CITOGENETICA FISH



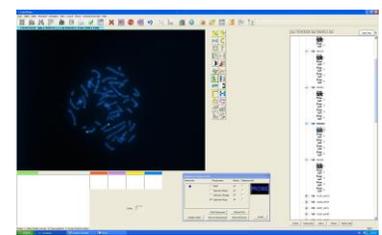
- Identificazione di anomalie numeriche e strutturali
- Elevata sensibilità e rapidità di esecuzione
- Applicabile in casi di basso indice proliferativo cellulare



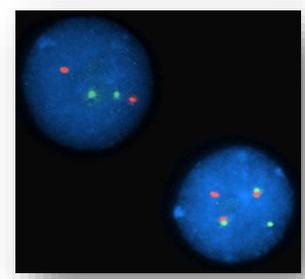
Allestimento vetrino



Sistema GSL-120



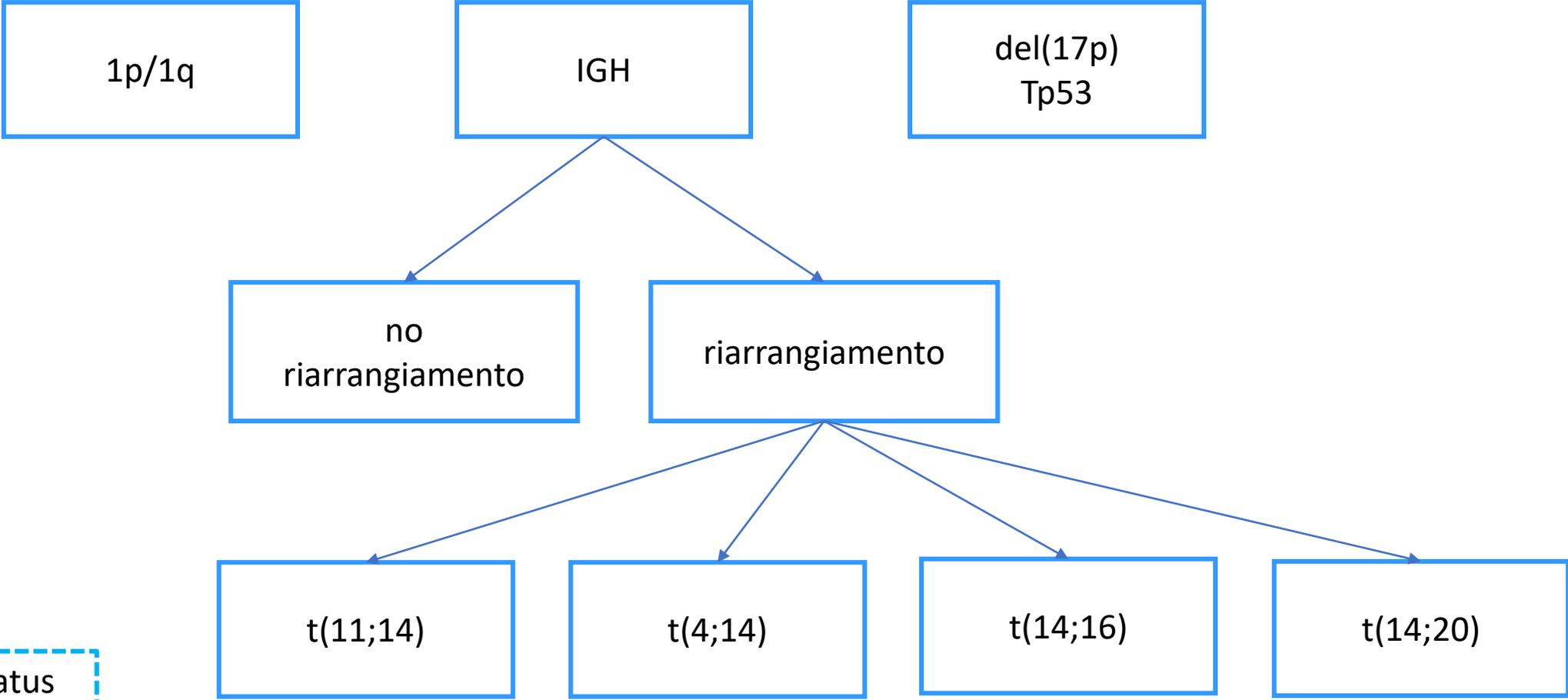
Scansione vetrino



Analisi

FISH: probe selection

Algoritmo operativo Treviso



Ploidy status

Myc

FASE POST-ANALITICA



Leukemia

<https://doi.org/10.1038/s41375-019-0378-z>

ARTICLE

Cytogenetics and molecular genetics



European recommendations and quality assurance for cytogenomic analysis of haematological neoplasms

K. A. Rack¹ · E. van den Berg² · C. Haferlach³ · H. B. Beverloo⁴ · D. Costa⁵ · B. Espinet⁶ · N. Foot⁷ · S. Jeffries⁸ · K. Martin⁹ · S. O'Connor¹⁰ · J. Schoumans¹¹ · P. Talley¹⁰ · N. Telford¹² · S. Stiouj¹³ · Z. Zemanova¹⁴ · R. J. Hastings¹⁵

Received: 25 April 2018 / Revised: 11 December 2018 / Accepted: 17 December 2018

© The Author(s) 2019. This article is published with open access

- FISH: at least 100 selected plasma cells should be scored
- The quality of the PC selection step should be assessed before hybridisation.
- Positive **cutoff levels** should be relatively conservative: 10% for fusion or break apart probes, 20% for numerical abnormalities

REFERTO



Regione Veneto
AZIENDA ULSS n°2 Marca Trevigiana

Dipartimento Interaziendale di Anatomia Patologica

Direttore Prof. Angelo P. Dei Tos

Accreditamento di eccellenza 2013-2016 rilasciato da ACCREDITATION CANADA

Treviso Tel 0422322707; Fax 0422322705
e-mail: seganapattv@aulss2.veneto.it

Conegliano Tel 0438668281; Fax 0438668264
e-mail: anatomiapatologica@aulss2.veneto.it

Esame Citogenetico T-G-●●●●

Cognome e nome		Accettato il
Data di nascita	Sesso	Tessera
Provenienza		

MATERIALE INVIATO

A Ibridazione fluorescente in situ (FISH) su Aspirato midollare

Metodica utilizzata per separare/identificare le PC

Notizie Cliniche
Mieloma multiplo

DESCRIZIONE

Analisi FISH su cellule separate (CD138 Microbeads Human - Milteny Biotec Srl).

Sonde utilizzate: Vysis 1p36/1q25 FISH Probe Kit, Vysis LSI IGH/FGFR3 Dual Color Dual Fusion Translocation Probe, Vysis IGH/CCND1 XT DF FISH Probe Kit, Vysis LSI IGH/MAF Dual Color Dual Fusion Probe e XL P53 (MetaSystems).

CONCLUSIONI

FISH: nuc ish(MEGF6,TP73x2)(ANGPTL1,ABL2x3)[180/200]

Osservazioni: l'indagine citogenetica molecolare FISH su 200 nuclei, ha evidenziato la trisomia della regione 1q25 nel 90% dei nuclei analizzati.

FISH: nuc ish(FGFR3,IGH)x3(FGFR3 con IGHx2)[180/200]

Osservazioni: l'indagine citogenetica molecolare FISH su 200 nuclei, ha evidenziato la presenza della t(4;14) nel 90% dei nuclei analizzati.

FISH: nuc ish(CCND1x2,IGHx3)[180/200]

Osservazioni: l'indagine citogenetica molecolare FISH su 200 nuclei ha escluso la presenza della

Regione Veneto
AZIENDA ULSS n°2 Marca Trevigiana

Dipartimento Interaziendale di Anatomia Patologica

Direttore Prof. Angelo P. Dei Tos

Accreditamento di eccellenza 2013-2016 rilasciato da ACCREDITATION CANADA

Treviso Tel 0422322707; Fax 0422322705
e-mail: seganapattv@aulss2.veneto.it

Conegliano Tel 0438668281; Fax 0438668264
e-mail: anatomiapatologica@aulss2.veneto.it

t(11;14).

FISH: nuc ish(IGHx3,MAFx2)[180/200]

Osservazioni: l'indagine citogenetica molecolare FISH su 200 nuclei ha escluso la presenza della t(14;16).

FISH: nuc ish(TP53,D17Z1)x2[200]

Osservazioni: l'indagine citogenetica molecolare FISH su 200 nuclei ha escluso la perdita del gene TP53.

SEGRETERIA:	ZL
ESAMINATORI:	ZL
ES. MACRO:	ZL

Dott. L. Zanatta

Refertato il

Il presente referto deve essere condiviso con il medico curante

INFORMAZIONE - Gentile Signore/Signora desideriamo renderla partecipe che il Servizio Sanitario Regionale ha impiegato euro 493,65 per il Suo percorso di cura. Il pagamento, se dovuto, è riferito al ticket (compartecipazione) più la quota fissa (statale) prevista dalla vigente normativa nazionale.



ISCN



GRAZIE!



Oncoematologia tra sostenibilità e aderenza
Padova 22 Marzo 2019 - Dott.ssa Lucia Zanatta