

“Cromosomi e geni”

**Nona Giornata Fiorentina
dedicata ai pazienti con
malattie mieloproliferative
croniche**

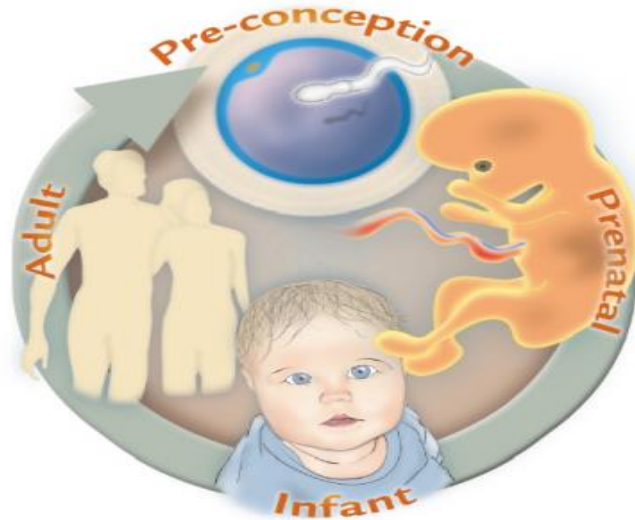
Sabato 20 maggio 2023

Elisabetta Pelo

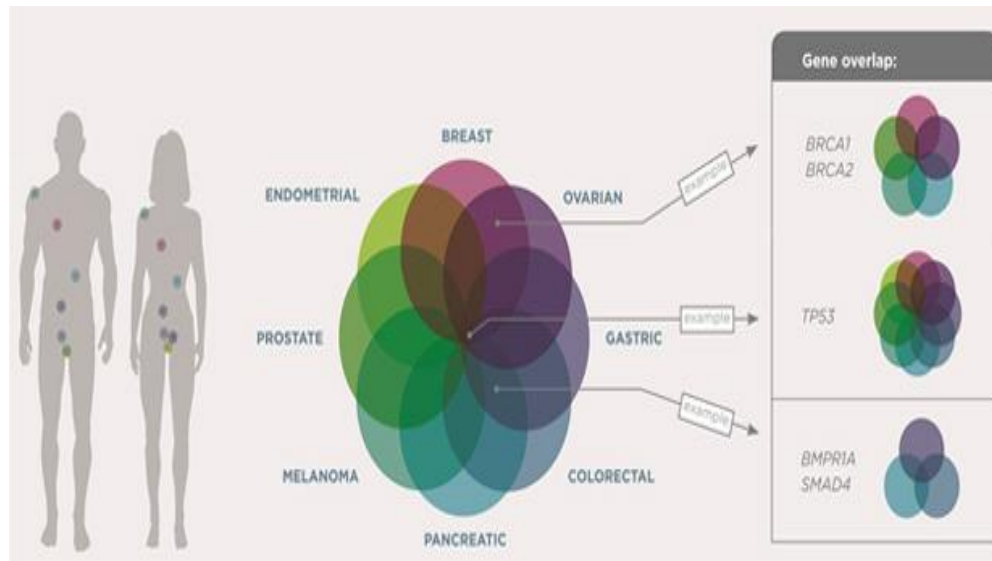
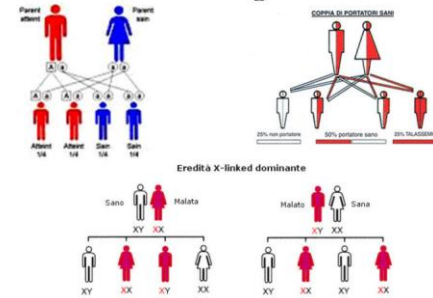
SOD Diagnostica Genetica

Azienda Ospedaliero Universitaria Careggi





Malattie genetiche, esempi trasmissioni genetiche



OGNI individuo è diverso dall'altro

Ogni individuo della specie umana (esclusi i gemelli monozigoti) nasce e rimane **geneticamente diverso** dagli altri. Ciò vale per gran parte degli individui appartenenti alle specie eucarioti.

Questo si traduce in risposte diverse agli stimoli ambientali e permette l'evoluzione degli individui con le caratteristiche migliori.



eterogeneità genetica

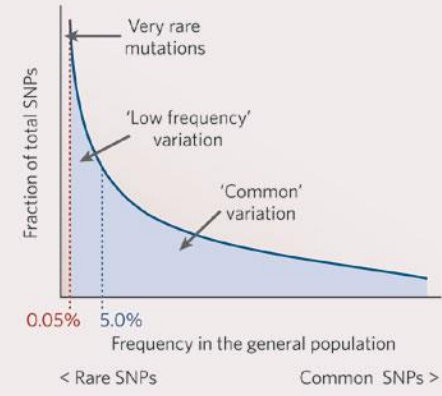
TC TCG ATATAGC TC GCG ACAC AC ACAG ATATAGC GTAGGG CTC TCG ATATAG CTC GCG AC ACAC AC AGAT ATATAG CGC TC C CTG AAACAG C
 TC C GAC AC AGC TCG C AC ACC G CTC GAG ACC TG ACC TGAC AC G TG C TAG CTAGC TCC TCTC GAG GAG AC G TAG GGC TC TCG ATATAGC TC GCG AC
 AC ACAC AG ATATATAGC G CTC CC TGAAAC AGC TCC G AC ACAG CTC GC ACAC CGC TC G AG ACC TGAC CTG AC ACG TGC TAG C TAG CTC CTC TC G A
 GAC GTAGGG CTC TC G ATATAG CTC GCG AC ACAC AC AGAT ATATAG CGC TC CCTG AAACAG CTC CG ACAC AG C TCG CAC AC C GC TCG AGAC CTTA
TAGC TCC TC TCG AGAC GTAGGG CTC TCG ATATAG CTC GCG AC ACAC AC AGAT ATTATAGC TCG C GAC AC ACAC AG ATATATAGCG TAG GGC T
 CTC GATATAGC TCG C GAC AC ACAC AG ATATATAGC G CTC CC TGAAAC AGC TCC G AC ACAG CTC GC ACAC CGC TCG AG ACC TGAC CTG AC ACG TG
 CTAGC TAGC TCC TC TCG ACG AGAC GTAGGG CTC TC G ATATAG CTC GCG AC ACAC AC AGAT ATATAG CGC TC CCTG AAACAG CTC CG ACAC AG C T
 CG C AC ACC G CTC GAG ACC TG ACC TGAC AC G TG C TAG CTAGC TCC TCTC GAG AC G TAG GGC TC TCG ATATAGC TCG CG ACAC AC ACAG ATATATA
 GCG CTC CC TGAAAC AGC TCC G AC ACAG CTC GC ACAC CGC TC G AG ACC TTAGCTAGC TCC TCTC GAG AC G TAG GGC TC TCG ATATAGC TC GCG AC
 AC ACAC AG ATATATAGC G CTC CC TGAAAC AGC TCC G AC ACAG CTC GC ACAC CGC TC G AG ACC TGAC CTG AC ACG TGC TAG C TAG CTC CTC TC G A
 GAC GTTATAGC TCG C GAC AC ACAC AG ATATATAGC G TAG GGC TC TCG **A** TATAGC TC G CG ACAC AC ACAG ATATATAG CGC TCC C TGAAAC AGC T
 CC G AC ACAG CTC GC ACAC CGC TCG AG ACC TGAC CTG AC ACG TGC TAG C TAG CTC CTC TC G AG ACG TAG GGC TCTC
 CAC AC AGA **T**ATAGC TCC CTG AAAC AGC TCC G AC ACAG CTC GC ACAC CGC TCG AG ACC TGAC CTG ACC TG ACAC GTG CT A
 ACG TAG GG **A** C AC AC ACAG ATATATAGC G CTC TCC TG AAAC AGC TCC G AC ACAG CTC GC ACAC CGC TC G
 CTAGC TCC TCTC GAG AC G TAG GGC TC TCG ATATAGC TC GCG ACAC AC ACAG ATATATAGC G CTC TCC TG AAAC AGC TC C
 CGC TC G AG ACC TGAC CTG AC ACG TGC TAG C TAG CTC CTC TC G AG ACG TAG ACG TAG GGC TCTC GATATAGC TCG C GAC AC ACAC
 CGG AC G TAG GGC TC TCG ATATAGC TC GCG ACAC AC ACAG ATATATAGC G CTC TCC TG AAAC AGC TCC G AC ACAG CTC GC ACAC CGC TC G
 CTAGC TCC TCTC GAG AC G TAG GGC TC TCG ATATAGC TC GCG ACAC AC ACAG ATATATAGC G CTC TCC TG AAAC AGC TC C
 CGC TC G AG ACC TGAC CTG AC ACG TGC TAG C TAG CTC CTC TC G AG ACG TAG GGC TCTC GATATAGC TCG C GAC AC ACAC
 GC TCTC GATATAGC TCG C GAC AC ACAC AG ATATATAGC G CTC CC TGAAAC AGC TCC G AC ACAG CTC GC ACAC CGC TC G
 GTG CTAGC TAGC TCC TC TCG ACG AGAC GTAGGG CTC TC G ATATAG CTC GCG AC ACAC AC AGAT ATATAG CGC TC CCTG
 GC TCG C AC ACC G CTC GAG ACC TG ACC TGAC AC G TG C TAG CTAGC TCC TCTC GAG AC G TAG GGC TC TCG ATATAGC TC G
 ATAGC G CTC CC TGAAAC AGC TCC G AC ACAG CTC GC ACAC CGC TCG AG ACC TTAGCTAGC TCC TCTC GAG AC G TAG GG C
 GAC AC ACAC AG ATATATAGC G CTC **C** CC TGAAAC AGC TCC G AC ACAG CTC GC ACAC CGC TC G AG ACC TGAC CTG AC ACG T
 CG AGAC GTAGGG CTC TCG ATATAG CTC GCG AC ACAC AC AGAT ATATAG CG TAG GGC TCTC GATATAGC TCG C GAC AC A
 TCC CTG AAACAG CTC CG ACAC AG C TC G CAC AC C GC TCG AGAC CTG ACC TG ACAC GTG CTAGC TAG C TCC TC TCG ACG A
 TATAGC TC G CC TCG C GAC AC ACAC AG ATATATAGC G TAG GGC TC TCG ATATAGC TC G CG ACAC AC ACAG ATATATAG C
 CC G AC ACAG CTC GC ACAC CGC TCG AG ACC TGAC CTG AC ACG TGC TAG C TAG CTC CTC TC G AG ACG TAG GGC TCTC
 CAC AC AGAT ATATAG CGC TC ACG TGC TAG C TAG CTC CTC TC G AG ACG TAG GGC TCTC GATATAGC TCG C GAC AC ACAC
 CTG AAACAG CTC CG ACAC AG C TC G CAC AC C G C TCG AGAC CTG ACC TG ACAC GTG CTAGC TAG C TCC TC TCG AGAC GTAGGG CTC TCG ATATAGC
 TC G CG ACAC AC ACAG ATATATAGC G CTC TCC TG AAAC AGC TC C GAC AC AGC TCG C AC ACC G CTC GAG ACC TG ACC TGAC AC G TG C TAG CTAGC TC
 CTC TC G AG ACG TAG GGC TCTC GATATAGC TCG C GAC AC ACAC AG ATATATAGC G CTC CC TGAAAC AGC TCC G AC ACAG CTC GC ACAC CGC TC G A
 GAC CTG ACC TG ACAC GTG CTAGC TAG C TCC TC TCG AGAC GTAGGG CTC TC G ATATAG CTC GCG AC ACAC AC AGAT ATATAG CGC TC CCTG AAAC
 AGC TC C GAC AC AGC TCG C AC ACC G CTC GAG ACC TG ACC TGAC AC G TG C TAG CTAGC TCC TCTC GAG AC G TAG GGC TC TCG ATATAGC TC G CG AC
 AC ACAC AG ATATATAGC G CTC CC TGAAAC AGC TCC G AC ACAG CTC GC ACAC CGC TC G AG ACC TGAC CTG AC ACG TGC TAG C TAG CTC CTC TC G
 GAC GTAGGG CTC TC G ATATAG CTC GCG AC ACAC AC AGAT ATATAG CGC TC CCTG AAACAG CTC CG ACAC AG C TCG CAC AC C GC TCG AGAC CTTA
 CC TGAC AC G TG C TAG CTAGC TCC TCTC GAG AC G TAG GGC TC TCG ATATAGC TC GCG ACAC AC ACAG ATATATAGC G CTC TCC TG AAAC AGC TC C G
 AC ACAG CTC GC ACAC CGC TC G AG ACC TGAC CTG AC ACG TGC TAG C TAG CTC CTC TC G AG ACG TAG GGC TCTC GATATAGC TCG C GAC AC ACAC A

Predisposing

Pathogenic

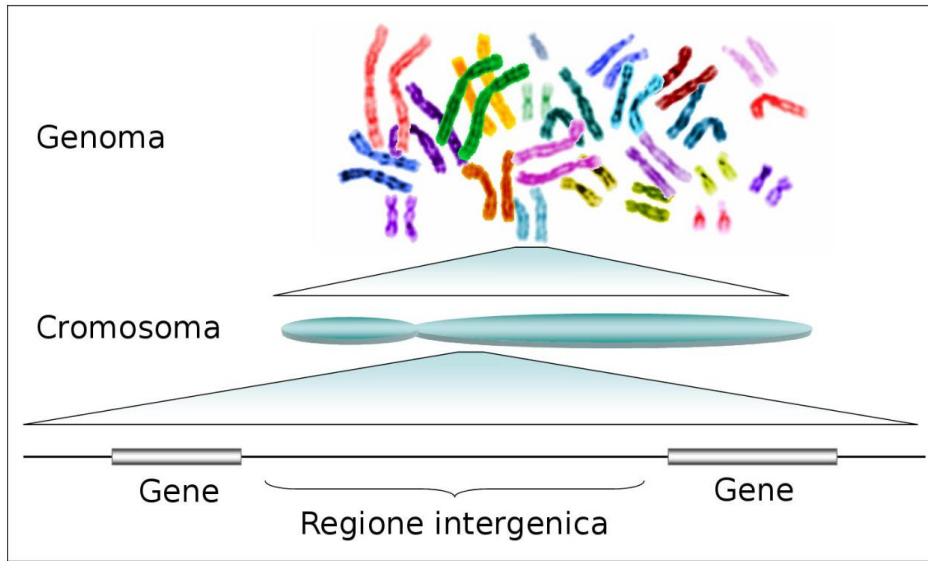
Neutral

GENETIC VARIATION IN HUMANS
 Variation is measured by single nucleotide polymorphisms (SNPs).



Frequenza SNPs:
 1/1000basi

IL GENOMA

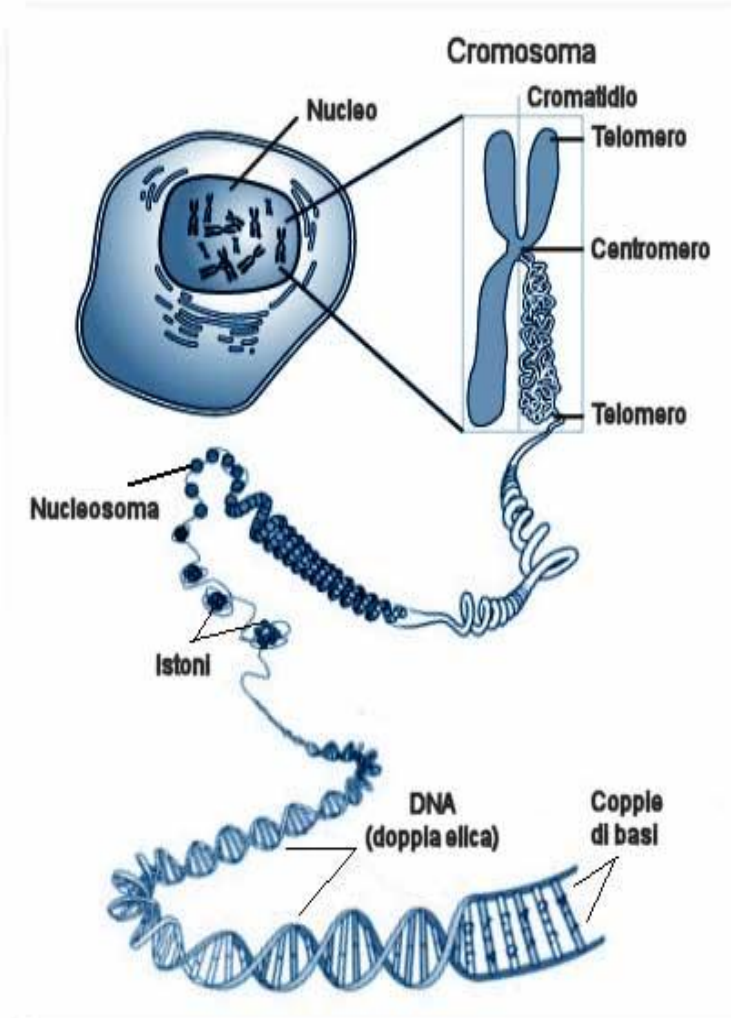


Genotipo e Fenotipo



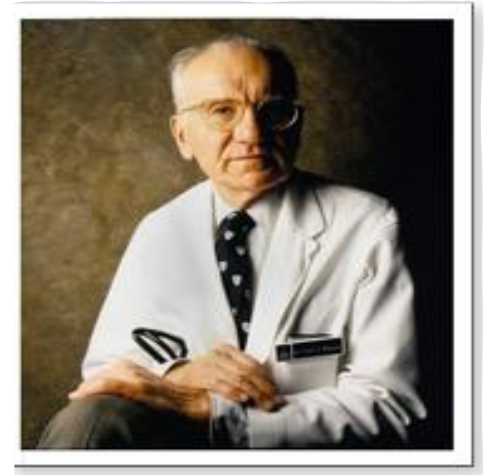
- **Fenotipo:** l'insieme delle caratteristiche visibili di un individuo
- **Genotipo:** l'insieme delle informazioni genetiche trasmesse dai genitori ai figli
- **Carattere:** una caratteristica fenotipica

..un po' di terminologia.....



- il patrimonio genetico: **genoma**
- l'informazione genetica: **gene**
- dove sono localizzati i geni: **cromosomi**
- la posizione sul cromosoma del gene: **locus**
- le forme alternative di informazione: **alleli**

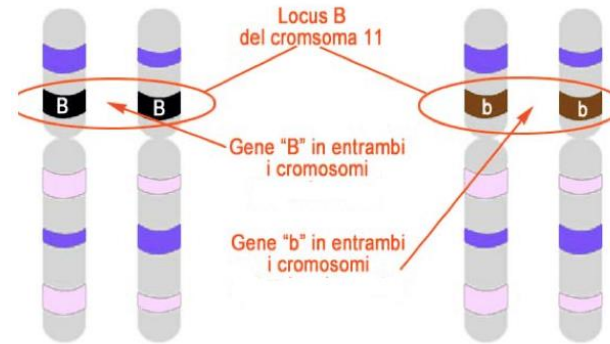
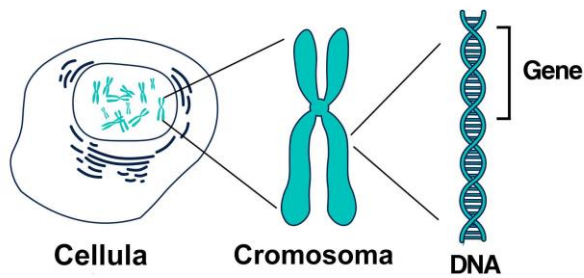
OMIM[®] - Online Mendelian Inheritance in Man[®]



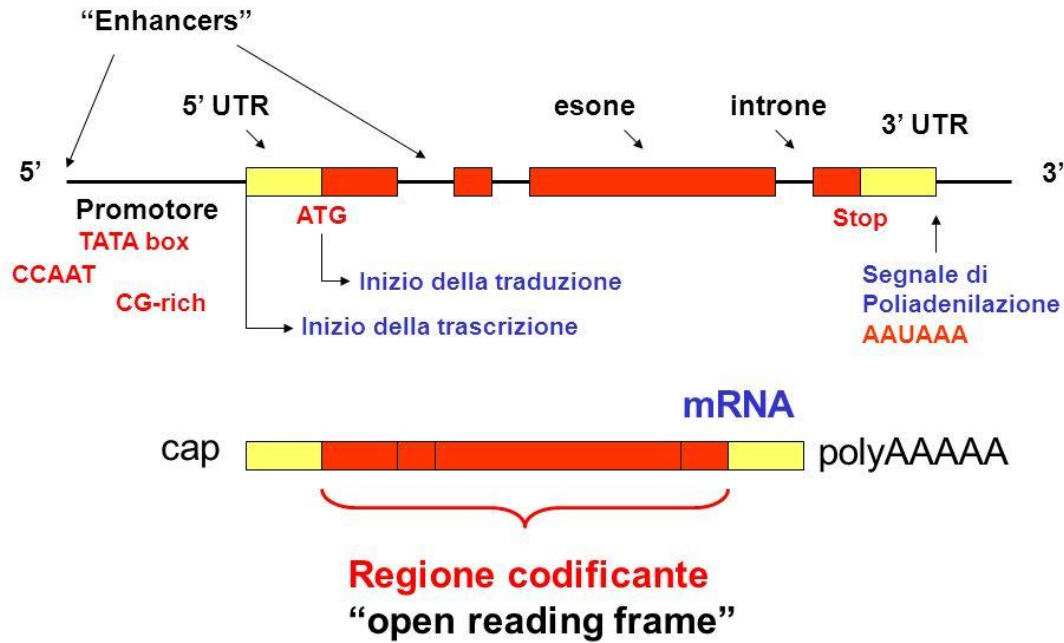
OMIM Entry Statistics

Number of Entries in OMIM (Updated May 17th, 2023) :

MIM Number Prefix	Autosomal	X Linked	Y Linked	Mitochondrial	Totals
Gene description [*]	16,159	767	51	37	17,014
Gene and phenotype, combined ⁺	25	0	0	0	25
Phenotype description, molecular basis known [#]	6,233	375	5	34	6,647
Phenotype description or locus, molecular basis unknown [%]	1,391	112	4	0	1,507
Other, mainly phenotypes with suspected mendelian basis	1,645	102	3	0	1,750
Totals	25,453	1,356	63	71	26,943



Struttura dei geni degli eucarioti



1) ORIGINE DELLE MUTAZIONI

❖ SPONTANEE:

- ✓ errori di duplicazione o modificazioni chimiche del DNA spontanee
- ✓ Tasso di mutazione spontanea (m. puntiformi) nell'uomo si stima sia di $1/10^{-9}$ - $1/10^{-11}$

❖ INDOTTE

- ✓ AGENTI MUTAGENI: CHIMICI e FISICI, come agenti intercalanti, alchilanti o analoghi delle basi oppure radiazioni U.V. e ionizzanti (raggi X e gamma).

MUTAZIONI: Tipi, Origini, Conseguenze

Conseguenze

Mutazioni puntiformi

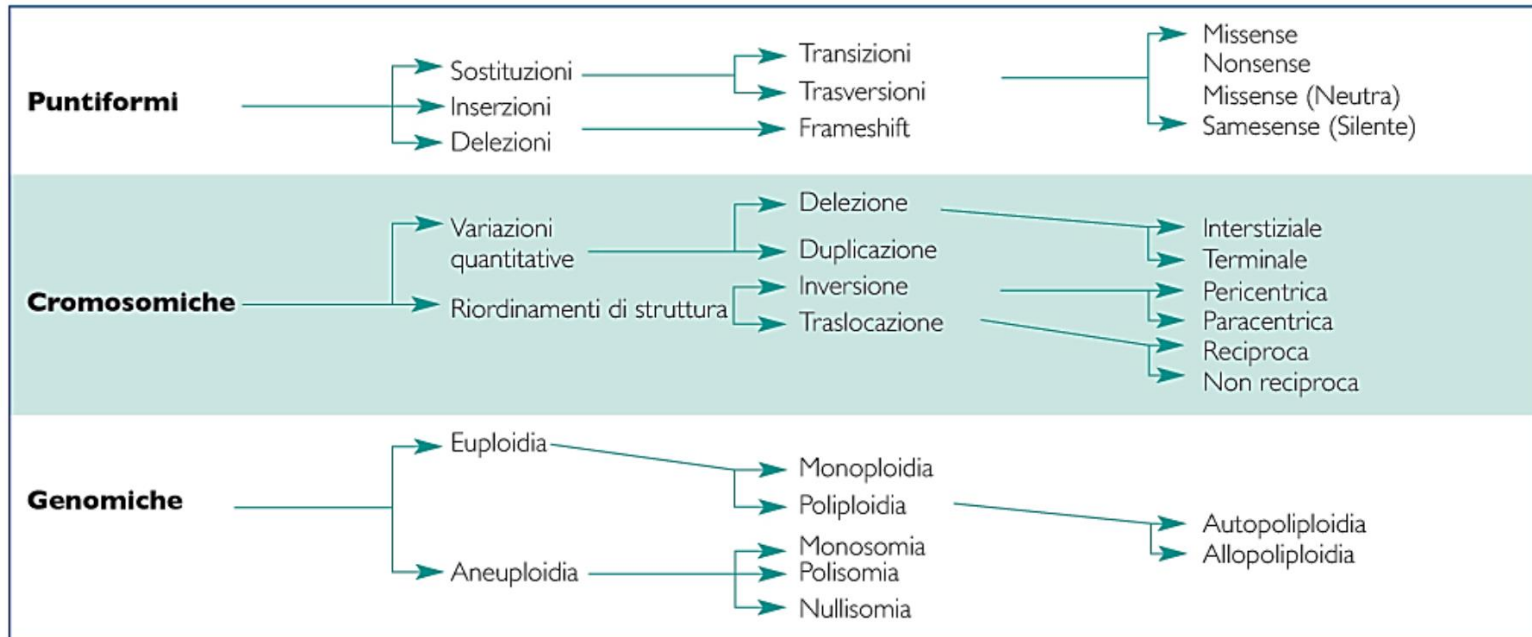
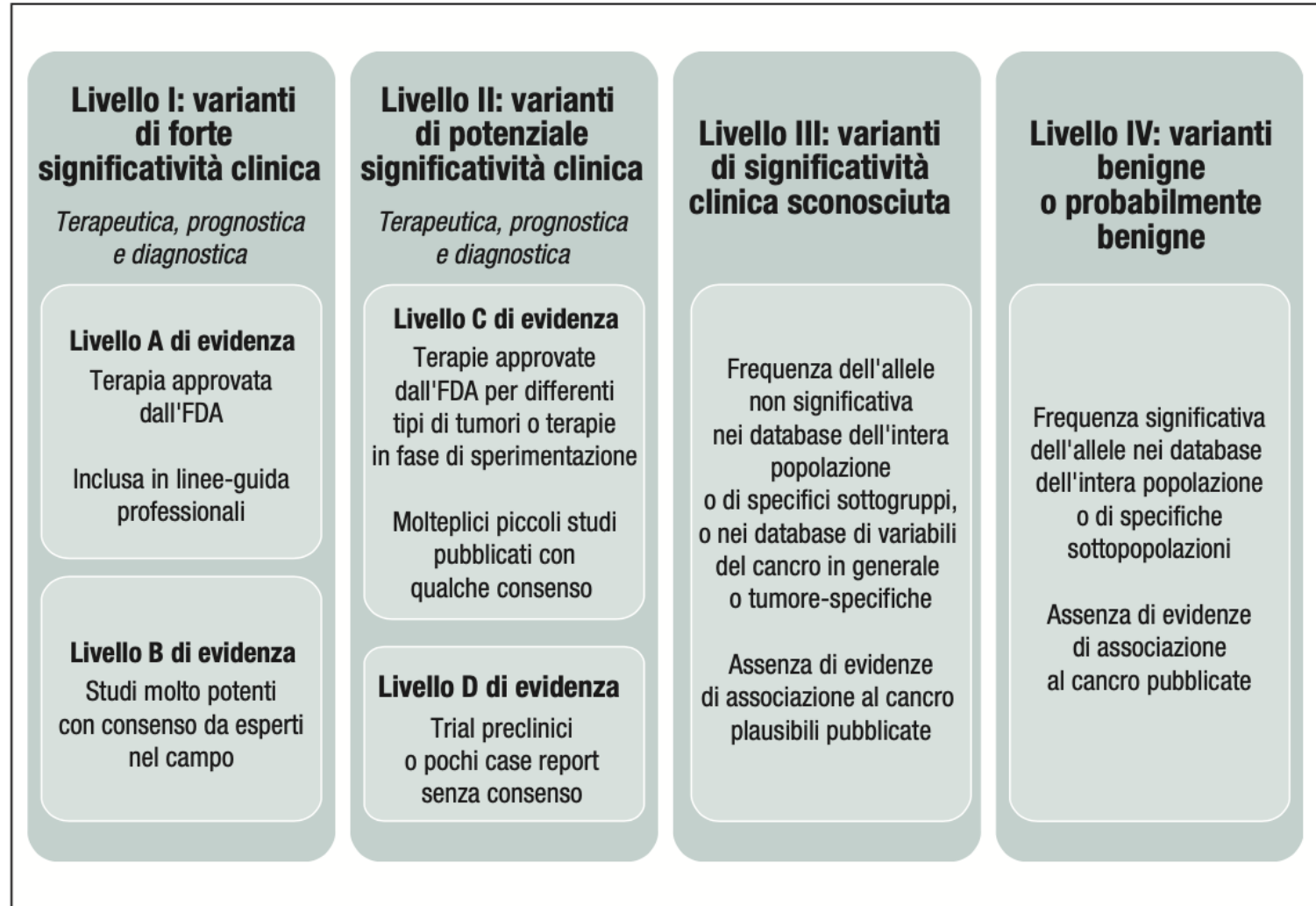


Tabella 10.1 Classificazione semplificata di diversi tipi di mutazioni.

Figura 4.1 • Classificazione delle varianti somatiche dell'AMP⁴



Tumori e Genetica

- **Geni con diverse funzioni**
 - Controllo del ciclo cellulare
 - Inibizione da contatto
 - Controllo dell' apoptosi
 - Riparazione del DNA
- **Mutazioni con diversi effetti**
 - Acquisizione di funzione (“gain of function”)
 - Perdita di funzione (“loss of function”)
 - Effetto dominante negativo
 - Anomalie cromosomiche
 - Amplificazione genica

TIPO DI CELLULE COLPITE

a) MUTAZIONI in cellule SOMATICHE

INDIVIDUO: MOSAICO GENETICO

es: tumore oppure colore occhio azzurro e scuro

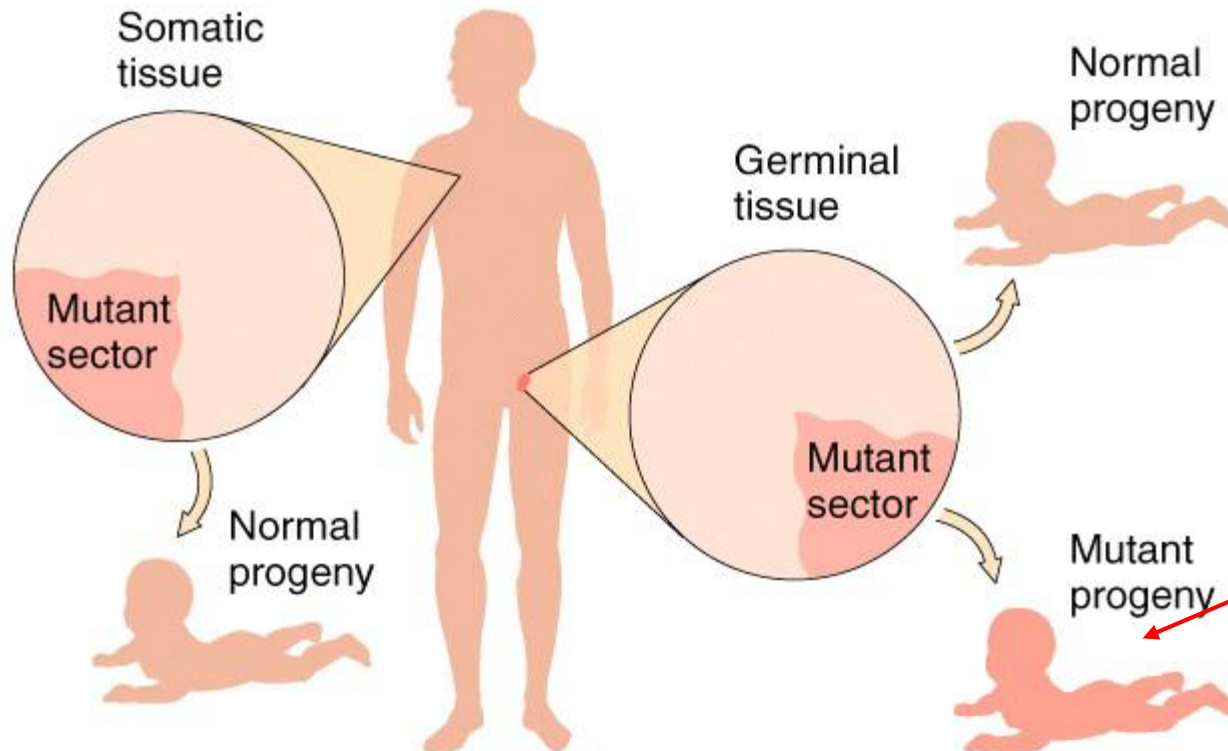
Individui che presentano 2 o più tipi cellulari geneticamente distinti derivati da un unico zigote.

b) MUTAZIONI in cellule GERMINALI

Trasmesse alla progenie

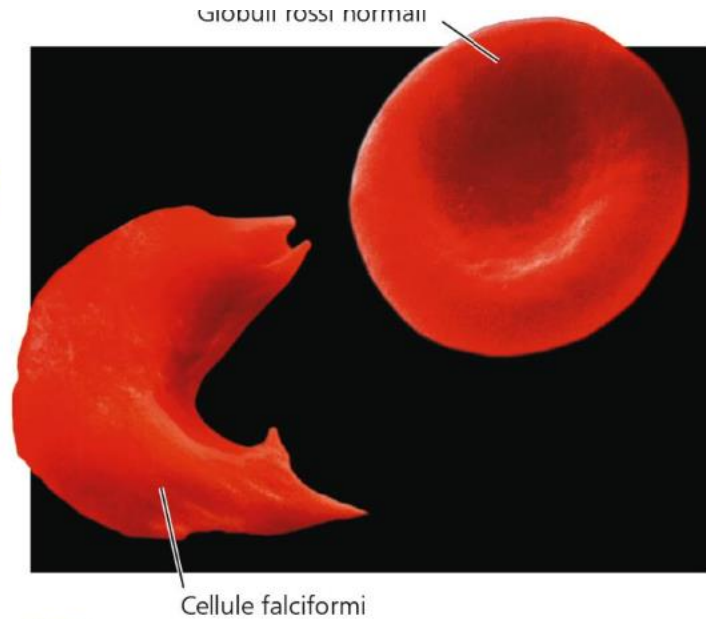
Mutazioni germinali

Mutazioni germinali possono presentarsi in tutte le cellule germinali o solo in una proporzione di esse (mosaicismo germinale) a seconda dello stadio di sviluppo dell'embrione in cui sono avvenute, e una volta trasmesse alla prole diventano "stabili"



Tutte le cellule (tutte le germinali + tutte le somatiche) portano la mutazione

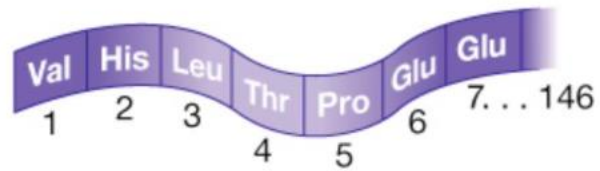
ANEMIA FALCIFORME



SEM 18 000X



(a) Globulo rosso normale



Emoglobina normale

SEM 18 000X



(b) Globulo rosso falciforme



Emoglobina falciforme

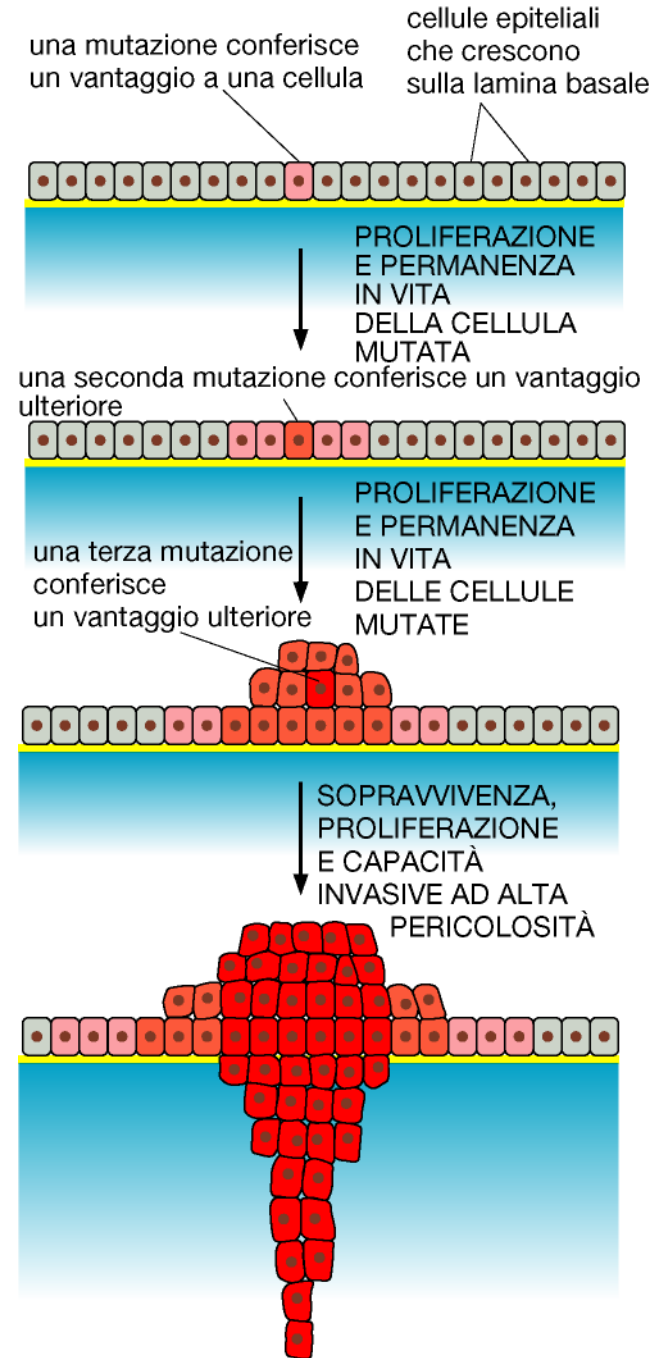
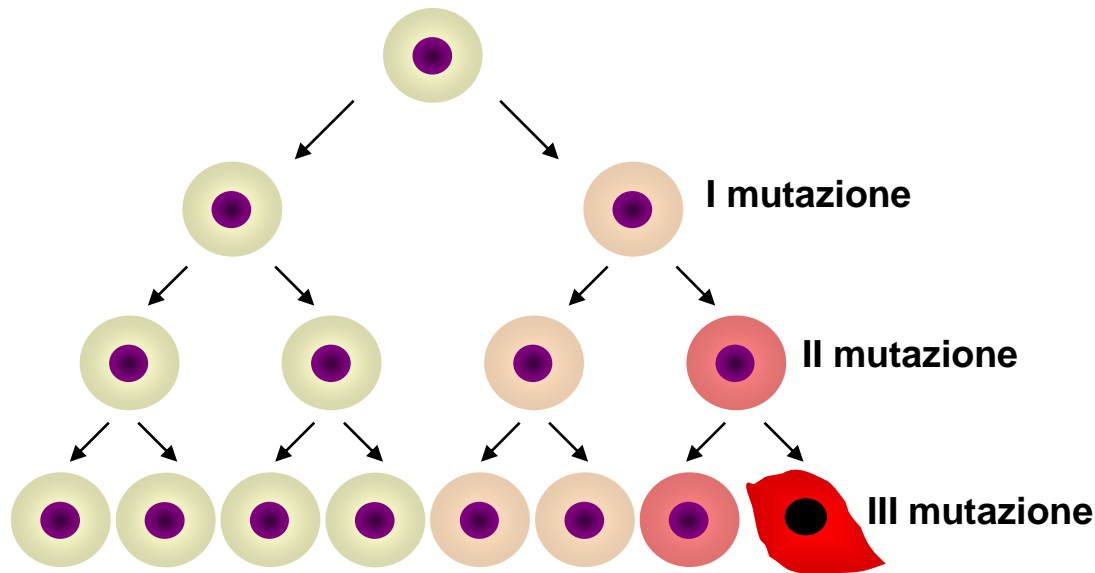
Mutazioni germinali e somatiche

Per quanto riguarda la *sede* della mutazione è necessario distinguere:

- a) *mutazioni germinali* che colpiscono i gameti e possono essere trasmesse alla prole

- b) ***mutazioni somatiche*** che colpiscono le cellule somatiche e si esauriscono nell'individuo. La mutazione viene trasmessa attraverso la mitosi alla progenie della cellula colpita in origine = l'individuo sarà un mosaico

EVOLUZIONE CLONALE: Accumulo di mutazioni multiple sequenziali di una singola cellula e della sua progenie



MUTAZIONI: Tipi, Origini, Conseguenze

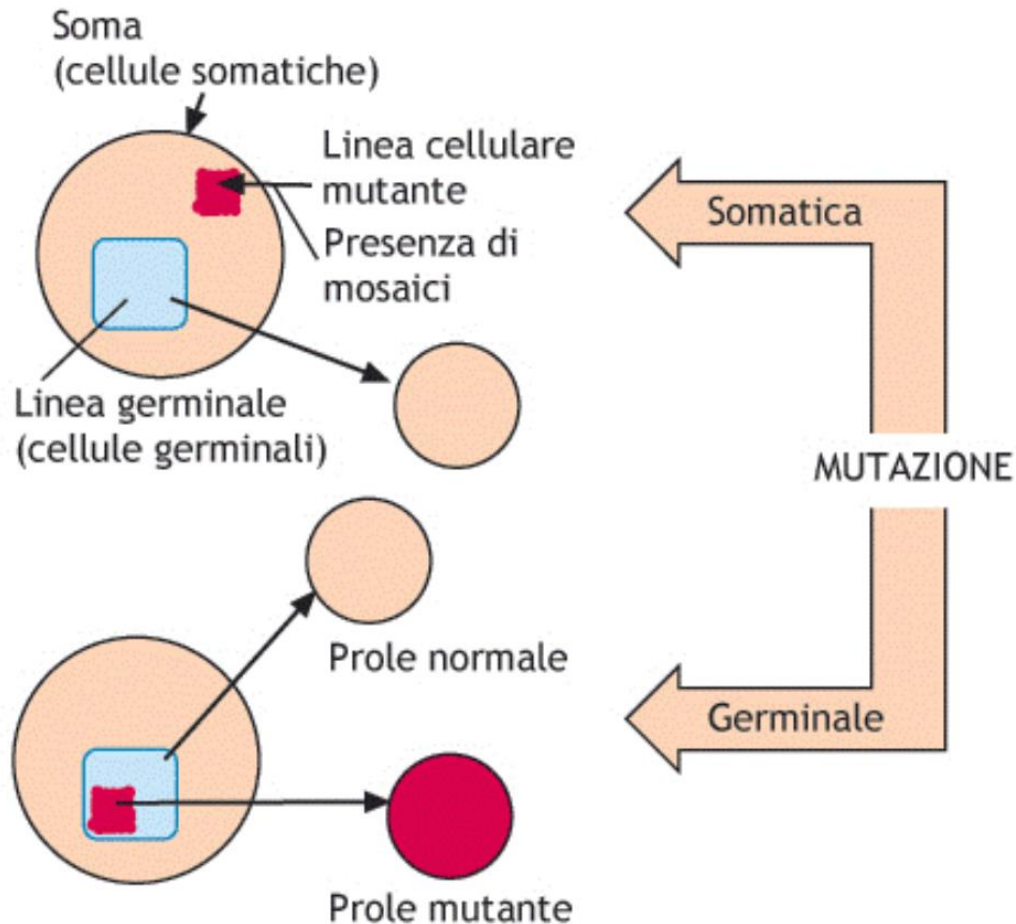


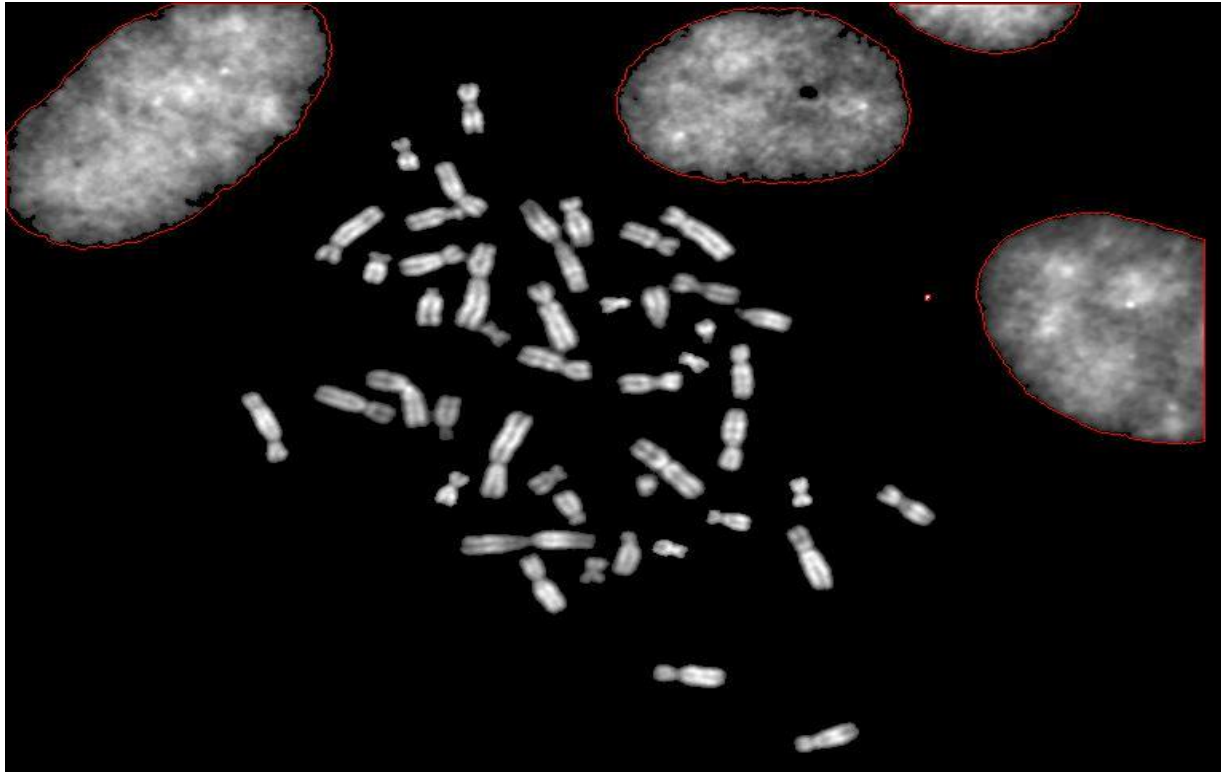
Figura 10.2 La mutazione può verificarsi in una qualsiasi cellula in qualsiasi momento. Rappresentazione schematica del tipo di mutazione, somatica o germinale, e rispettive conseguenze.

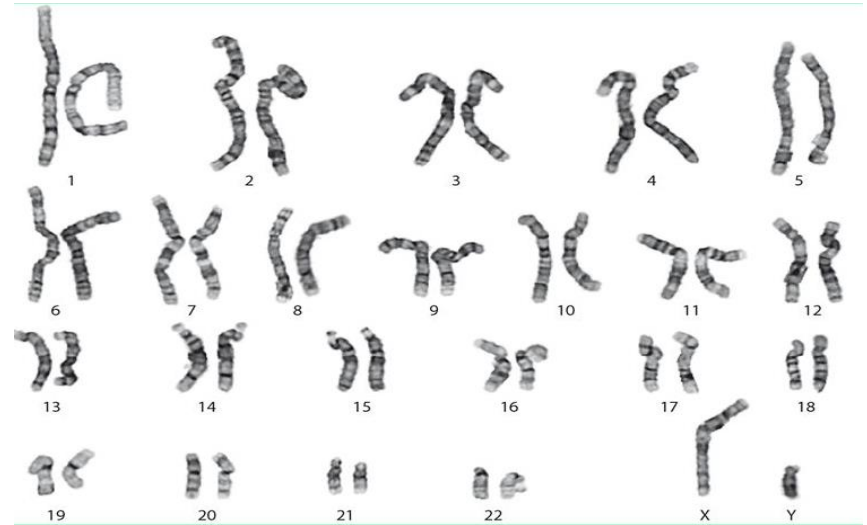
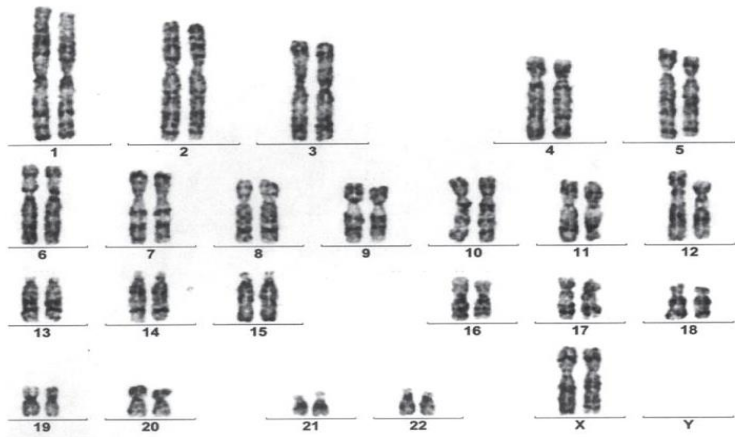
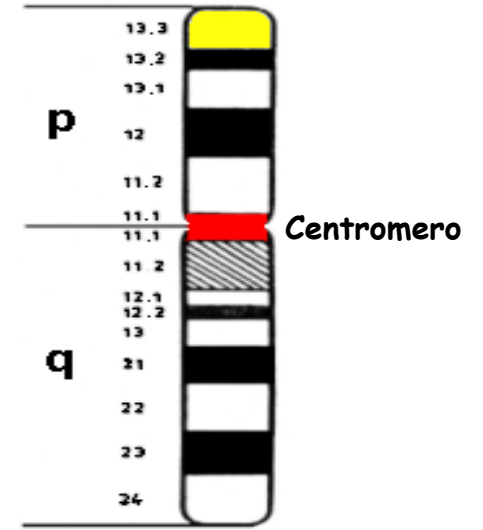
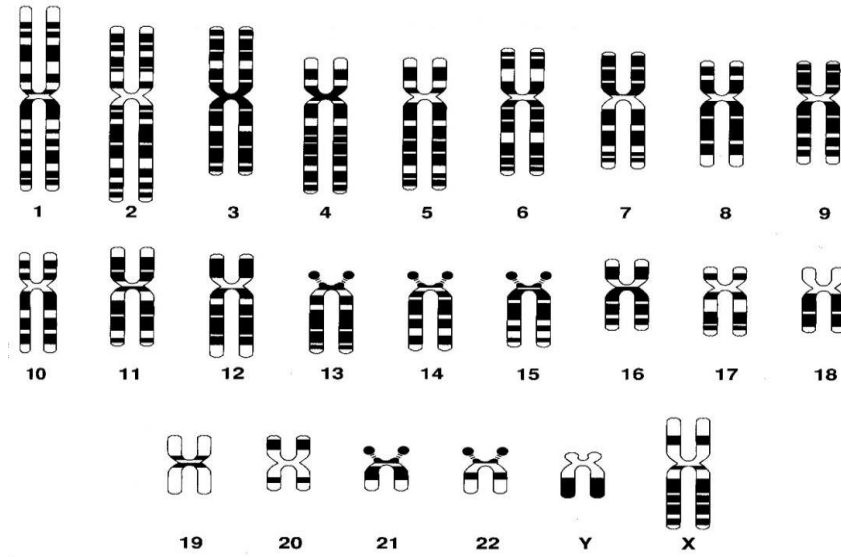
STRUTTURA DEI CROMOSOMI

L'analisi citogenetica viene eseguita in metafase, quando i cromosomi appaiono costituiti da 2 cromatidi fratelli tenuti insieme dal centromero



METAFASE





STRUTTURA DEL CROMOSOMA IN METAFASE

- Durante la metafase (divisione del nucleo) i cromosomi diventano **completamente eterocromatici** ad opera di 2 complessi proteici (condensina e coesina).
- Durante l'interfase il DNA si è replicato, quindi in metafase ci sono due copie per ogni cromosoma
- **Ogni cromosoma è costituito da due cromatidi fratelli tenuti insieme dal centromero**

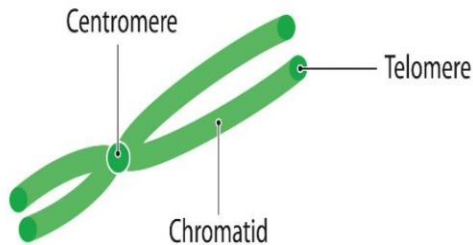
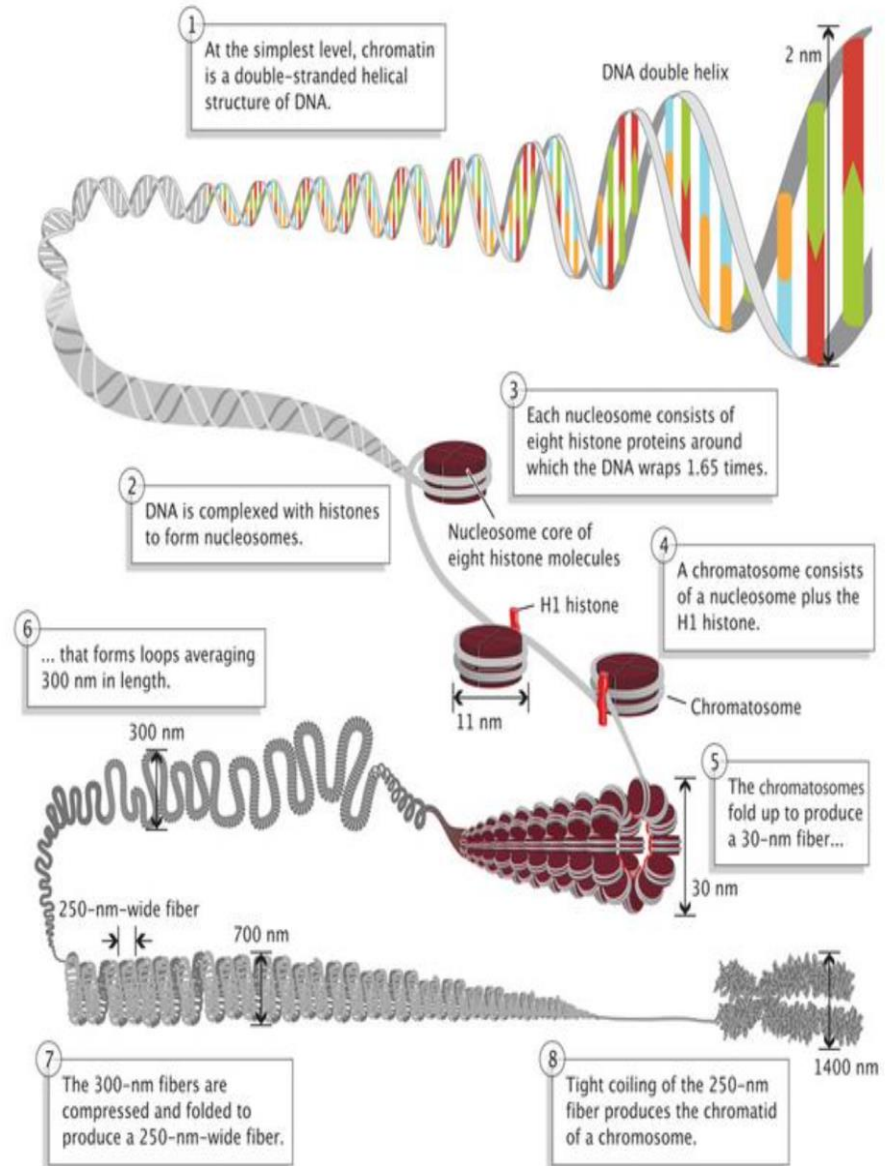
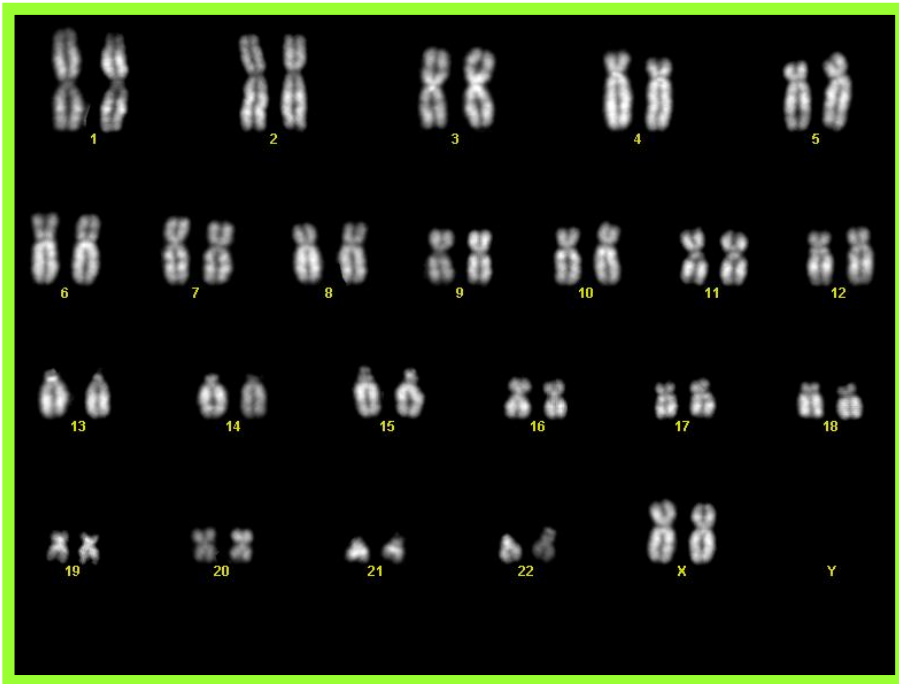
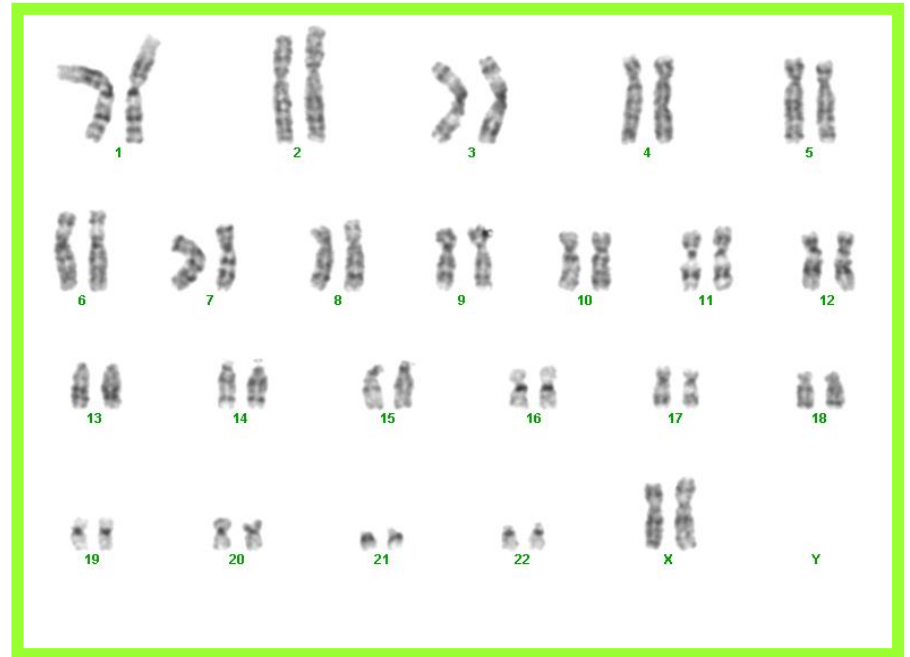


Figure 1.5. Genomes 4.0 © Garland Science 2010





BANDEGGIO Q



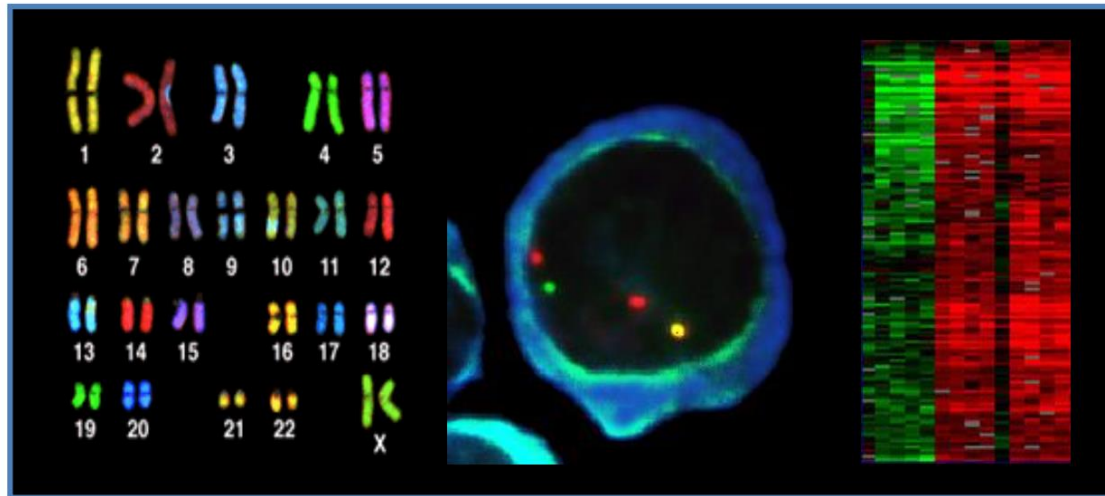
BANDEGGIO G

ANALISI GENETICA DELLE CELLULE MIDOLLARI

CITOGENETICA

FISH

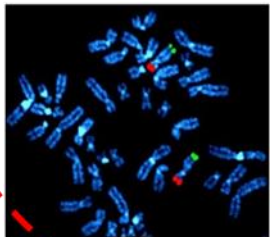
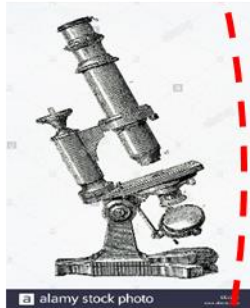
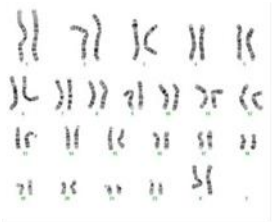
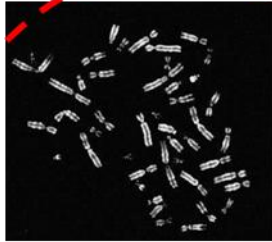
PROFILO
DEI GENI



Identificare pazienti
ad alto rischio

Può identificare
pazienti con necessità
di terapie particolari

Citogenetica e Citogenomica



Vantaggi e Svantaggi delle tecniche:

CC : ✓ **vantaggio**:
unico esperimento
assetto cromosomico
completo
-evidenzia cloni
distinti ed anomalie
dell'evoluzione
clonale
✓ **svantaggio**: scarsa
sensibilità per
anomalie criptiche
-richiede cellule
proliferanti
-tecnica laboriosa e
che richiede molta
esperienza

FISH: ✓ **vantaggio** : evidenzia
anomalie criptiche
-indipendente dall'indice
mitotico
-utile nello studio di casi con
cariotipo non disponibile per
mancanza di mitosi
-si associa alla CC nell'
identificazione di un clone
anomalo poco rappresentati
in CC
- ✓ **svantaggio**: scarsa
disponibilità di sonde per uso
diagnostico
- utilizzo di 1-3max sonde in
esperimenti di coibridazione
per esperimento

3) Riarrangiamenti cromosomici: traslocazioni

Neoplasm	Chromosomal translocation	% of cases	Proto-Oncogene affected
Burkitt lymphoma	t(8;14)(q24;q32)	0.80	MYC
	t(8;22)(q24;q11)	0.15	
	t(2;8)(q11;q24)	0.05	
Chronic myelogenous leukemia	t(9;22)(q34;q11)	0.90-0.95	ABL-BCR
Acute lymphocytic leukemia	t(9;22)(q34;q11)	0.10-0.15	BCR-ABL
Acute Lymphoblastic leukemia	t(1;19)(q23;p13)		PRL homeobox gene
Acute promyelocytic leukemia	t(15;17)(q22;q11)		PML-RARA
Chronic lymphocytic leukemia	t(11;14)(q13;q32)	0.10-0.30	BCL-1
Follicular lymphoma	t(14;18)(q32;q21)		BCL-2

Analisi citogenetica

Materiale esaminato: sangue midollare

N° protocollo: 23PE383

Coltura

Numero di colture indipendenti analizzate	2
Numero di colture allestite	2
Metodo utilizzato	Coltura in sospensione
Coltura	24 ore, 48 ore

Mitosi esaminate

Numero di metafasi cariotipate	21
Livello di risoluzione del bandeggio	300-band
Tecnica di bandeggio utilizzata	GTG

Cariotipo

**46,XY,del(20)(q?) [5]/
46,XY,der(7)inv(7)(p1?5q3?2)del(7)(q22q31),del(20)(q?) [16]**

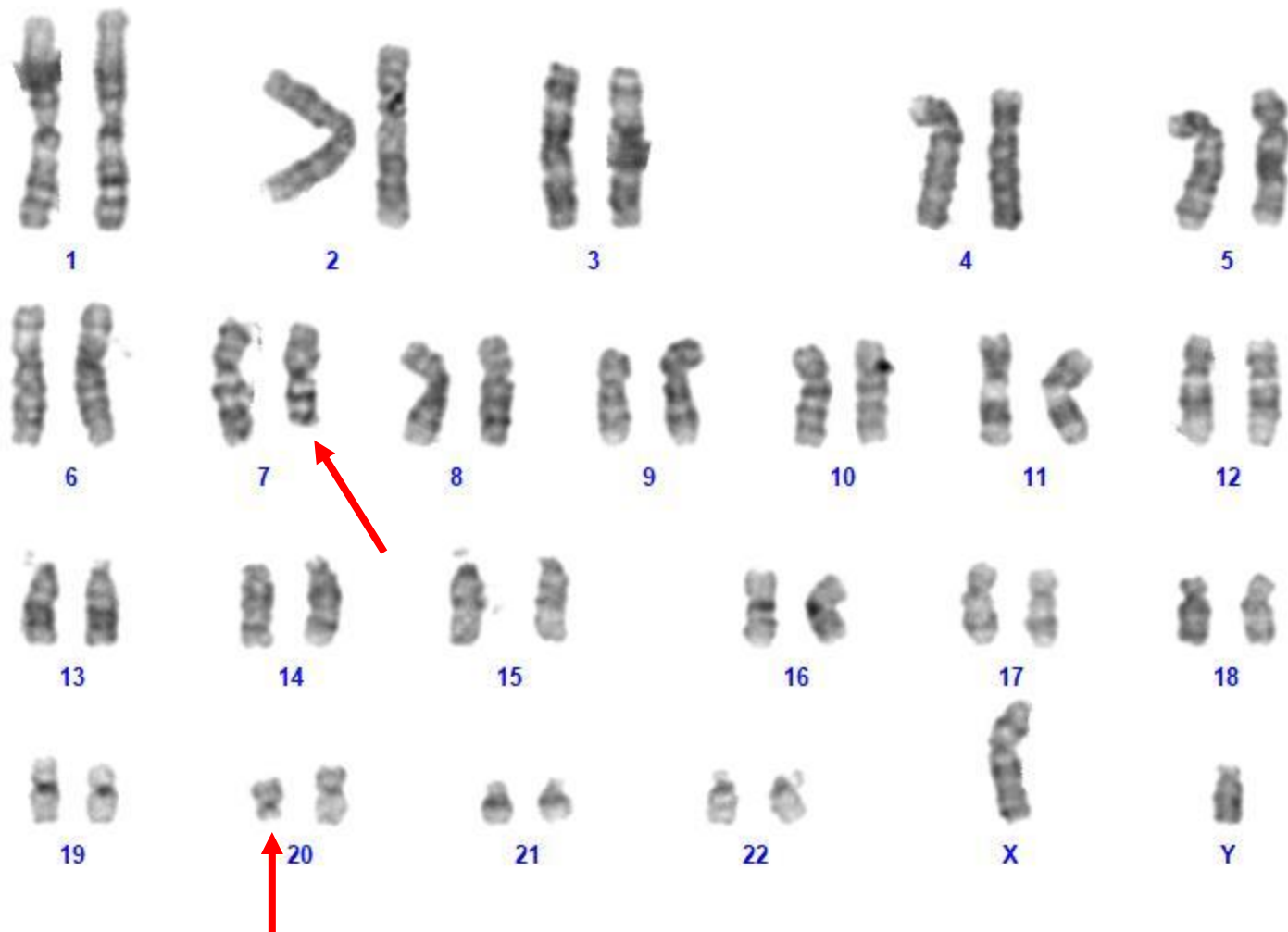
COMMENTI E CONCLUSIONI

L'esame citogenetico ha messo in evidenza la presenza di due linee cellulari:

- una linea mostra un cariotipo maschile a 46 cromosomi con una delezione parziale del braccio lungo di un cromosoma 20 in 5 delle 21 metafasi analizzate;
- l'altra linea presenta un cariotipo maschile a 46 cromosomi, che oltre alla delezione sopradescritta, mostra la presenza di un cromosoma 7 derivativo originatosi da un' inversione pericentrica e da una delezione interstiziale della regione q22q31, confermata anche dalla FISH (vedi referto 23FISH187), in 16 delle 21 metafasi analizzate. Per l'interpretazione clinica del risultato si raccomanda la valutazione da parte dello specialista di riferimento.

Limiti dell'esame: l'analisi citogenetica non permette di evidenziare piccoli riarrangiamenti al di sotto del limite di risoluzione della metodica (5-10 Mb) e bassi mosaicismi come indicato nella tabella di Hook (Am.J.Hum.Genet. 29:94-97,1977)

"European recommendations and quality assurance for cytogenomic analysis of haematological neoplasms - Leukemia 33, 1851-1867(2019)".



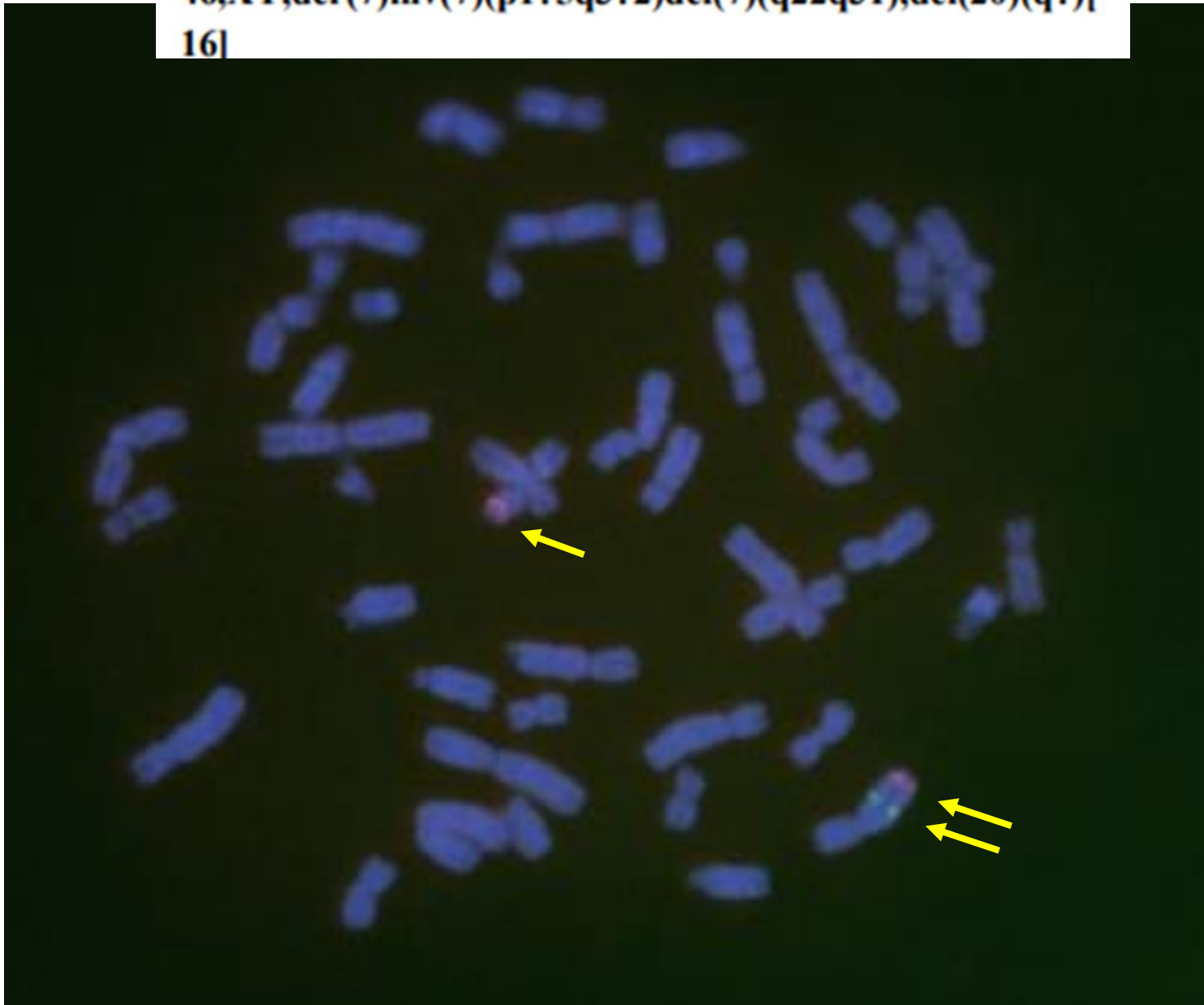
46,XY,del(20)(q?) [5]/

46,XY,der(7)inv(7)(p1?5q3?2)del(7)(q22q31),del(20)(q?) [

16]

46,XY,del(20)(q?) [5]/

46,XY,der(7)inv(7)(p1?5q3?2)del(7)(q22q31),del(20)(q?) [16]



Analisi citogenetica

Materiale esaminato: sangue midollare

N° protocollo: 23PE379

Coltura

Numero di colture allestite	2
Metodo utilizzato	Coltura in sospensione
Numero di colture indipendenti analizzate	2
Coltura	24 ore,48 ore

Mitosi esaminate

Numero di metafasi cariotipate	21
Tecnica di bandeggio utilizzata	GTG,QFQ
Livello di risoluzione del bandeggio	300-band

Cariotipo

45,XX der(13;14)(q10;q10)?c[1]/
45,XX,del(5)(q?),der(13;14)(q10;q10)?c[20]

COMMENTI E CONCLUSIONI

L'esame citogenetico ha messo in evidenza, in 20 delle 21 metafasi esaminate, un cariotipo femminile a 45 cromosomi con una delezione parziale del braccio lungo di un cromosoma 5 e la presenza di un cromosoma derivativo originatosi da una traslocazione tra il braccio lungo di un cromosoma 13 e il braccio lungo di un cromosoma 14.

Una metafase presenta un cariotipo femminile a 45 cromosomi con la presenza del cromosoma derivativo sopra descritto.

Si consiglia approfondimento diagnostico mediante esecuzione di cariotipo costituzionale per identificare l'origine del cromosoma derivativo.

Per l'interpretazione clinica del risultato si raccomanda la valutazione da parte dello specialista di riferimento.

Limiti dell'esame: l'analisi citogenetica non permette di evidenziare piccoli riarrangiamenti al di sotto del limite di risoluzione della metodica (5-10 Mb) e bassi mosaicismi come indicato nella tabella di Hook (Am.J.Hum.Genet. 29:94-97,1977)

"European recommendations and quality assurance for cytogenomic analysis of haematological neoplasms - Leukemia 33, 1851-1867(2019).

Germinale o Somatica ???????

Le anomalie citogenetiche sono uno dei fattori determinante per la prognosi in oncoematologia e la loro determinazione è importante a fini

✓ *Classificativi*

la classificazione dei Tumori secondo la World Health Organization (WHO) incorpora le aberrazioni cromosomiche insieme alla morfologia , all'immunofenotipo e alle caratteristiche cliniche, nella classificazione delle leucemie e dei linfomi(WHO 2016).

✓ *Monitoraggio della malattia minima residua (MMR)*

✓ *Prognostici*

L'impatto clinico delle aberrazioni citogenetiche è tale che i pazienti vengono suddivisi in base alle aberrazioni cromosomiche in: gruppo a prognosi favorevole, intermedia e sfavorevole.

Richiesta: 94227901 11/04/2023

Motivo Invio: LLC

Analisi molecolare del gene TP53**Materiale esaminato: DNA****N° protocollo: 23TP35**

Materiale biologico	Sangue periferico
Metodica utilizzata:	Sequenziamento diretto su 3730 Genetic Analyzer (sensibilità 98%). Analisi dati con utilizzo di GLASS: web-based tool per valutazione di mutazioni somatiche con frequenza allelica >10%.
Gene indagato:	TP53 (LRG_321t1, NM_000546.5) esoni 4-11
Risultato dell'esame	NM_000546.5: c.742C>T p.(Arg248Trp)
N° DNA analizzato	23DNA2039

COMMENTI E CONCLUSIONI

L'analisi di sequenza del gene TP53 (LRG_321t1, NM_000546.5) ha evidenziato la variante c.742C>T p.(Arg248Trp) nell'esone 7. La variante è annotata nel database di TP53iarc ed è descritta in ClinVar (variation ID 12347) come patogenetica. Tale variante cade in un hot spot mutazionale.

Si raccomanda valutazione del risultato da parte dell'ematologo di riferimento.

Limiti del test: Il sequenziamento con metodica Sanger non permette di rilevare varianti somatiche presenti con bassa frequenza allelica (VAF<10%).

Riferimenti bibliografici:

International Agency for Research on Cancer (IARC) TP53 database: <<http://p53.iarc.fr/>>

Malcikova J. et al. ERIC recommendations for TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia update on methodological approaches and results interpretation. Leukemia. 2018;32:1070-1080.

<<http://www.ericll.org/guidance-toolstp53/>>

<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>

<<http://www.hgvs.org/content/guidelines>>

“Cromosomi e geni”

**Nona Giornata Fiorentina
dedicata ai pazienti con
malattie mieloproliferative
croniche**

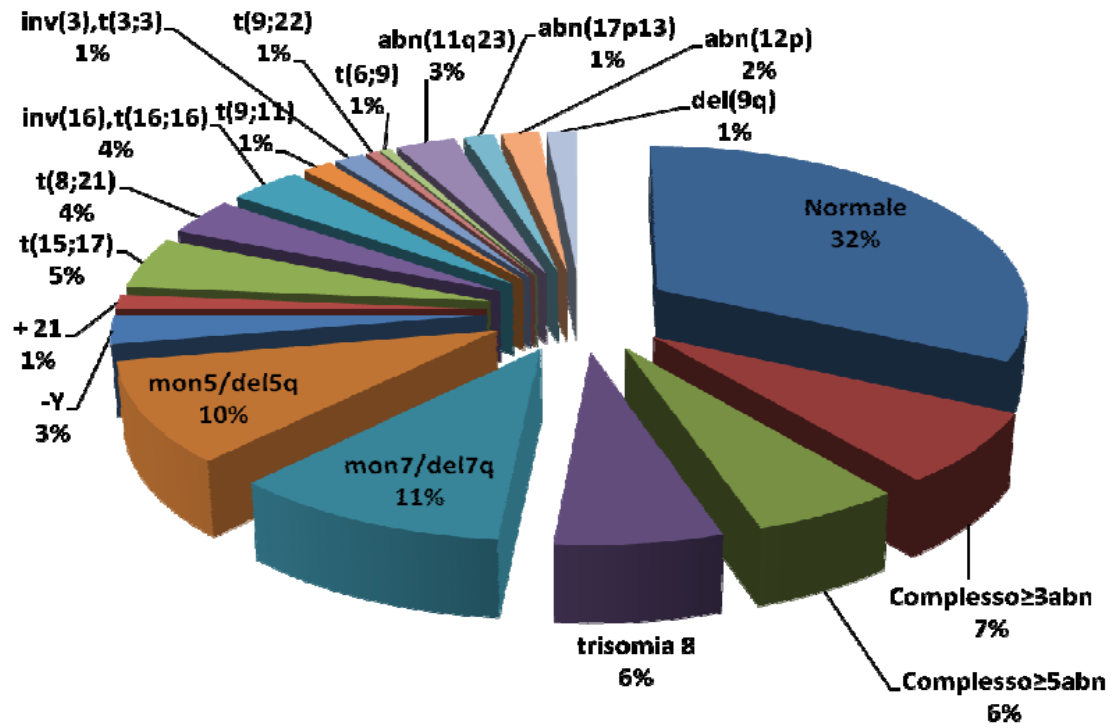
Sabato 20 maggio 2023

Elisabetta Pelo

SOD Diagnostica Genetica

Azienda Ospedaliero Universitaria Careggi

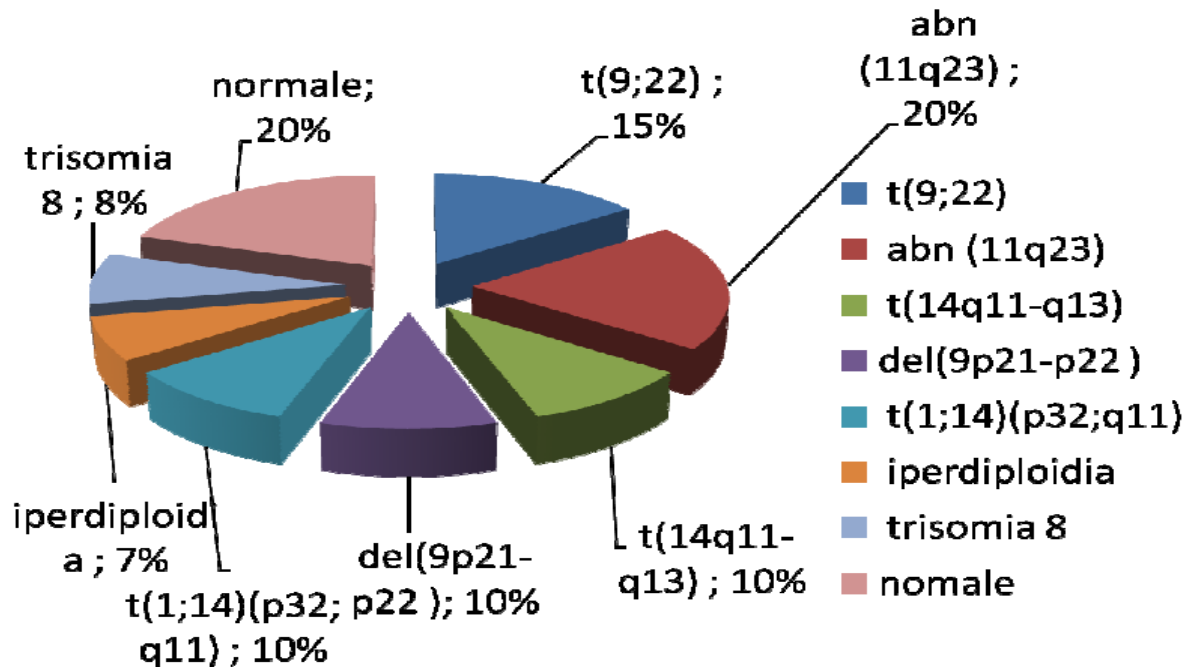




Nelle LAM l'incidenza delle anomalie cromosomiche è di circa il 40-60%, nel 10-15% è presente un cariotipo complesso, definito come la coesistenza di un n° di ≥3 anomalie cromosomiche nello stesso clone il cariotipo normale è presente nel 50-60% dei casi ioni

Anomalie cromosomiche nelle LAM

Anomalie cromosomiche nelle LLA



Nelle LLA
l'incidenza
delle
aberrazioni
cromosomiche
è dell'80-90%.



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. Stioui¹³ · 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

Abstract

Cytogenomic investigations of haematological neoplasms, including chromosome banding analysis, fluorescence in situ hybridisation (FISH) and microarray analyses have become increasingly important in the clinical management of patients with haematological neoplasms. The widespread implementation of these techniques in genetic diagnostics has highlighted the need for guidance on the essential criteria to follow when providing cytogenomic testing, regardless of choice of methodology. These recommendations provide an updated, practical and easily available document that will assist laboratories in the choice of testing and methodology enabling them to operate within acceptable standards and maintain a quality service.

Table 1 Recommended testing for different haematological neoplasms

Disease	Test	Requirement	Suggested methodology	Guidelines
CML	Karyotype	Mandatory	Chromosome banding	Baccarani et al. 2013 [24], 2015 [25]
	<i>BCR-ABL1</i> gene fusion	Mandatory	FISH or molecular methods	
	<i>ABL1</i> mutation when resistance to therapy	Mandatory	Molecular methods	
MPN	<i>JAK2, CALR, MPL</i> mutations depending on referral reason	Indicated	Molecular methods	Gong et al. 2013 [32] Xia and Hassejian 2016 [33]
	Karyotype	Optional	Chromosome banding	WHO 2017 [1]
Myeloid/lymphoid neoplasms with eosinophilia	Recurrent gene fusions involving <i>PDGFRA, PDGFRB, FGFR1, PCM1-JAK2</i>	Strongly recommended for most patients	FISH or molecular methods	Butt et al. 2017 [40]
	Karyotype	Recommended in absence of recurrent gene fusion	Chromosome banding	
MDS	Karyotype	Mandatory	Chromosome banding	Malcovati et al. 2013 [41]
	Targeted chromosome abnormalities -5/5q-, -7/7q-, <i>MECOM</i> (extended panel + 8,20q-del <i>TP53</i>)	Recommended ^b	FISH/ SNP array/ Molecular methods	
	High resolution chromosome analysis and aCN-LOH ^c Mutation analysis of candidate genes	Recommended Recommended	SNP array Molecular methods	
AML	Karyotype	Mandatory	Chromosome banding	Döhner et al. 2017 [47]
	Gene mutations: <i>NMP1, CEBPA, RUNX1, FLT3, TP53, ASXL1</i>	Mandatory	Molecular methods	
	Recurrent gene fusions: <i>PML-RARA, CBFβ-MYH11, RUNX1-RUNX1T1</i> . Gene rearrangements of <i>KMT2A</i> and <i>MECOM</i> .	Recommended ^d	FISH or molecular methods	
ALL	Recurrent gene fusions (Age-related priority see Table 3)	Mandatory	FISH or molecular methods	Harrison et al. 2010 [57]
	Hyperdiploidy	Recommended	Chromosome banding or SNP-Array/ FISH	Moorman et al. 2010 [59]
	Recurrent microdeletions Karyotype ^d	Recommended in paediatric Mandatory	MLPA, Array, molecular methods	Harrison et al. 2010 [57] Hoelzer et al. 2016 [60]
CLL	Deletion 13q14, <i>ATM, TP53</i> , trisomy 12 <i>TP53</i> mutation/IGHV mutational status	Mandatory Mandatory	FISH, SNP-array or molecular methods Molecular methods	Hallek et al. 2018 [71] Malcikova et al. 2018 [75], Rosenquist et al. 2017 [76]
	Karyotype	Desirable for clinical trials		Hallek et al. 2018 [71]
	Multiple myeloma	t(4;14) ^e , t(14;16), deletion <i>TP53</i> ^e gain 1q/del(1p) t(11;14), t(14;20), ploidy status (extended panel)	Recommended	FISH for gene rearrangements FISH or Array, MLPA for copy number gains and losses
Other mature B-cell neoplasms	Recurrent gene rearrangements depending on differential diagnosis		FISH	WHO 2017 [1]
	<i>MYC</i> rearrangements for prognostic testing ^f		FISH	

^aFor prognostic impact

^bIn cases of karyotype failure or where morphological suspicion of specific abnormality

^caCN-LOH: acquired copy neutral loss of heterozygosity

^dMay not be required for all paediatric B-ALL where only basic risk stratification is required

^eMinimum testing required

^fIf *MYC* rearrangement is detected *BCL2* and *BCL6* should be undertaken for differential diagnosis between Burkitt lymphoma and a double-hit lymphoma

Table 2 Alternative testing strategies

Testing requirement	Alternative strategies for testing
Whole-genome numerical and structural abnormalities	Chromosome banding plus FISH/molecular testing for recurrent cryptic structural abnormalities or Array/NGS copy number analysis plus FISH/molecular analysis for recurrent structural abnormalities or Whole-genome NGS analysis including copy number and structural abnormalities
Targeted region-specific analysis for recurrent structural abnormalities deletions, gain, translocations	FISH for copy number and structural abnormalities or FISH for copy number plus molecular techniques for structural abnormalities or Molecular-based copy number (e.g. MLPA, PCR) plus FISH/molecular analysis for recurrent structural abnormalities or Targeted Array/NGS copy number analysis plus FISH/molecular analysis for structural abnormalities or Targeted NGS analysis, including copy number and structural abnormalities

NGS next generation sequencing

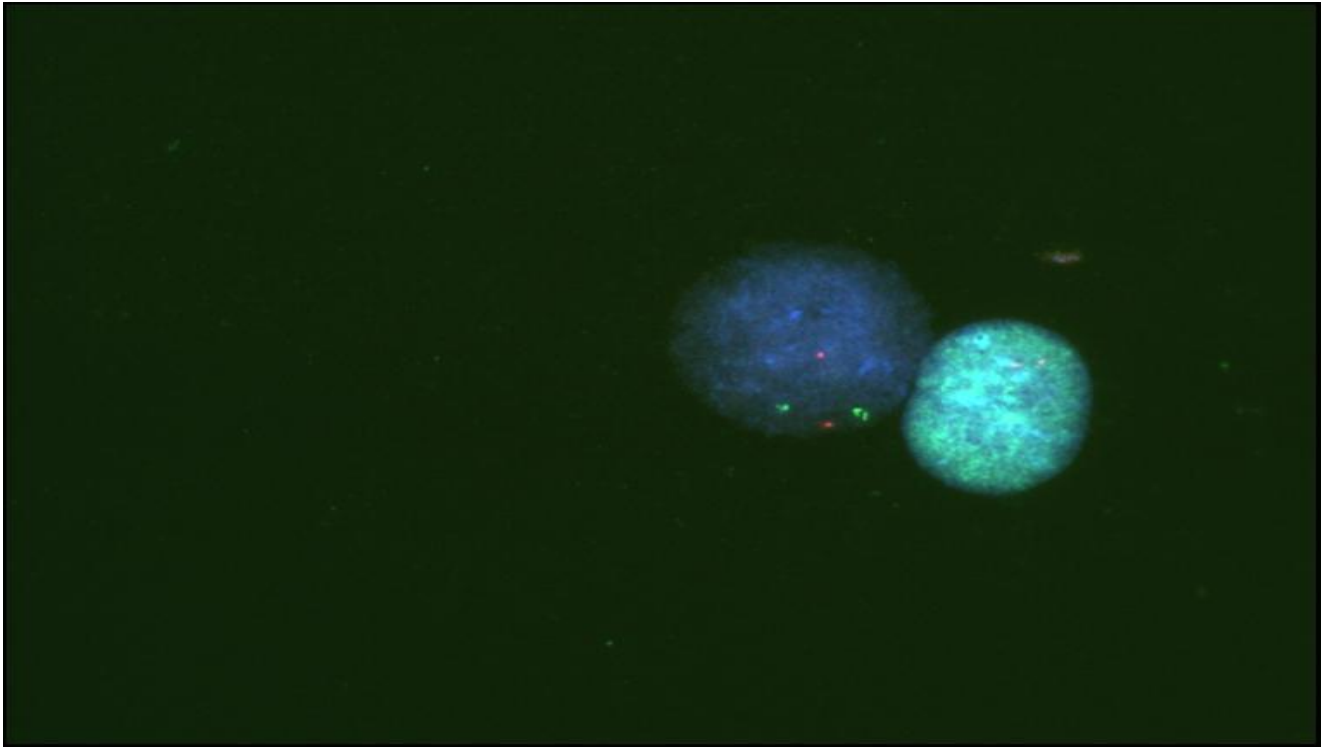
Table 3 Recommended analyses for fusion gene rearrangement testing in ALL

Patient details		Recommended	Optional
B-ALL	Infants (<1 year old)	<i>KMT2A</i>	<i>ETV6-RUNX1, BCR-ABL1</i>
	For paediatric/adolescent ALL (<25 years)	<i>ETV6-RUNX1, BCR-ABL1</i> , then <i>KMT2A</i> and <i>TCF3</i>	
	Adult	<i>BCR-ABL1</i> then <i>KMT2A</i> and <i>TCF3</i>	<i>ETV6-RUNX1</i>
T-ALL	Childhood and adult		<i>TLX3, TLX1, KMT2A, TALI, LMO2</i> and <i>ABL1</i>

Table 4 Recommended reporting times

Urgent referrals (e.g. acute leukaemia):	95% should be reported within 10 calendar days. A diagnostic FISH result is adequate in this category, with confirmatory chromosome banding analysis treated as for routine referrals.
Rapid test by FISH/PCR (e.g. <i>RARA</i> rearrangements)	95% reported in 3 working days. A result should be given in <24 h.
Routine referral (e.g. follow-up):	90% should be reported within 21 calendar days.

Sonda bcr/abl
Sonda dual color dual fusion



2 segnali verdi 2 segnali rossi.