

ARTICLE



Cytogenetics and molecular genetics

## European recommendations and quality assurance for cytogenomic analysis of haematological neoplasms

K. A. Rack<sup>1</sup> · E. van den Berg<sup>2</sup> · C. Haferlach<sup>3</sup> · H. B. Beverloo<sup>4</sup> · D. Costa<sup>5</sup> · B. Espinet<sup>6</sup> · N. Foot<sup>7</sup> · S. Jeffries<sup>8</sup> · K. Martin<sup>9</sup> · S. O'Connor<sup>10</sup> · J. Schoumans<sup>11</sup> · P. Talley<sup>10</sup> · N. Telford<sup>12</sup> · S. Stioui<sup>13</sup> · Z. Zemanova<sup>14</sup> · R. J. Hastings<sup>15</sup>

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

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

GFCH, 20 juin 2019,  
*Audrey Bidet et Lauren Véronèse*

Terminologie recommandée  
par ISCN 2016

**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.

- ✓ Mise à jour des reco parues en 2013: Hastings et al, European cytogeneticists association newsletter N°31 : <https://www.e-c-a.eu/en/NEWSLETTER.html>.
- ✓ 16 experts en cytogénomique, très impliqués dans des EQA  
Chaque section a été revue par un sous-groupe d'experts
- ✓ Ces reco s'appliquent sauf dérogations par des lois ou des normes nationales  
« should », « must » ou « essential » -> exigences obligatoires  
« may », « could » -> recommandations

## Recommandations générales

- ❑ Etre en conformité avec les standards de l'**ISO 15189**  
CQE  
Procédures écrites
  
- ❑ En concertation avec les informations de l'**ELN**
  
- ❑ **Collaboration étroite entre les laboratoires et le cliniciens** essentielle pour s'assurer que seulement les échantillons cliniquement pertinents sont analysés et que les tests les plus appropriés sont réalisés

### GBPC:

« Le cytogénéticien peut décider de ne pas réaliser l'analyse si elle n'est pas pertinente : par exemple lorsque les données cliniques, biologiques et/ou anatomopathologiques ne sont pas en faveur d'une hémopathie ou si dans le suivi d'une maladie résiduelle, une autre technique de biologie moléculaire plus sensible est réalisée en parallèle.

Deux situations sont alors possibles :

- mise en culture avec conservation du culot de cytogénétique (permettant une éventuelle analyse ultérieure) , à privilégier si prélèvement précieux
- ou annulation complète de l'analyse (de préférence avec l'accord du prescripteur), si l'on est sûr que l'analyse n'est pas adéquate. »

- ❑ Toute analyse devrait impliquée **au moins 2 « analystes » indépendants** , dont au moins 1 avec une expérience « appropriée » en cytogénomique hématologique.

## Cultures

- Au moins 2 cultures différentes** devraient être réalisées si possible
- 1-2X10<sup>6</sup> cellules/mL

### GPBC:

« Les conditions de cultures peuvent être adaptées en fonction de la richesse et du jour d'arrivée de l'échantillon, selon les pratiques validées par le laboratoire. Par sécurité, faire si possible 2 flacons de culture »

0,5 à 2X10<sup>6</sup> cellules/mL ( 1 à 2x10<sup>6</sup> pour SLP et Lymphomes)

- LAM** : Une durée de culture de **48H** doit être envisagée pour les cas avec forte suspicion de **t(8;21) ou t(15;17)**  
-> basée sur l'expérience de beaucoup d'investigateurs / pas de ref biblio citée

### GBPC:

LAM : durée de culture : J1 à J2, voire J3; LAM3 jamais <J1

- LAL** : A réception les laboratoires doivent envisager de préparer, en plus de la culture, des **frottis ou des suspensions cellulaires** pour la FISH
- LLC** : PB > BM ; culture de **3 à 5 jours** + IL2-CpG recommandée ; culture complémentaire de 3 à 5 jours + **TPA** peut être utile
- Lymphome** :
  - pour les ganglions une **culture de 24h** est recommandée ; envisager en complément **72h TPA** ou **72h IL2-CpG**
  - Pour les **autres tissus** : **ajouter des mitogènes**. Peu de mitoses spontanées
- Myélome** : BM : tri CD138. PB seulement si leucémie à plasmog. Vérifier la pureté avant FISH

# Analyse des bandes chromosomiques

« est obligatoire pour plusieurs pathologies »

**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</i> , <i>CALR</i> , <i>MPL</i> mutations depending on referral reason	Indicated	Molecular methods	Gong et al. 2013 [32] Xia and Hassejian 2016 [33] WHO 2017 [1]
	Karyotype	Optional	Chromosome banding	
Myeloid/lymphoid neoplasms with eosinophilia	Recurrent gene fusions involving <i>PDGFRA</i> , <i>PDGFRB</i> , <i>FGFR1</i> , <i>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 <sup>b</sup>	FISH/ SNP array/ Molecular methods	
	High resolution chromosome analysis and aCN-LOH <sup>c</sup>	Recommended	SNP array	
	Mutation analysis of candidate genes	Recommended	Molecular methods	
AML	Karyotype	Mandatory	Chromosome banding	Döhner et al. 2017 [47]
	Gene mutations: <i>NPM1</i> , <i>CEBPA</i> , <i>RUNX1</i> , <i>FLT3</i> , <i>TP53</i> , <i>ASXL1</i>	Mandatory	Molecular methods	
	Recurrent gene fusions: <i>PML-RARA</i> , <i>CBFB-MYH11</i> , <i>RUNX1-RUNX1T1</i> . Gene rearrangements of <i>KMT2A</i> and <i>MECOM</i> .	Recommended <sup>a</sup>	FISH or molecular methods	
ALL	Recurrent gene fusions (Age-related priority see Table 3)	Mandatory	FISH or molecular methods	Harrison et al. 2010 [57] Moorman et al. 2010 [59]
	Hyperdiploidy	Recommended	Chromosome banding or SNP-Array/ FISH	
	Recurrent microdeletions	Recommended in paediatric	MLPA, Array, molecular methods	
Karyotype <sup>d</sup>	Mandatory			
CLL	Deletion 13q14, <i>ATM</i> , <i>TP53</i> , trisomy12	Mandatory	FISH, SNP-array or molecular methods	Hallek et al. 2018 [71] Malcikova et al. 2018 [75], Rosenquist et al. 2017 [76]
	<i>TP53</i> mutation/IGHV mutational status	Mandatory	Molecular methods	
Multiple myeloma	Karyotype	Desirable for clinical trials		Hallek et al. 2018 [71] Sonneveld et al. 2016 [82] Caers et al. 2018 [83]
	t(4;14) <sup>e</sup> , t(14;16), deletion <i>TP53</i> <sup>e</sup> gain 1q/del(1p)	Recommended	FISH for gene rearrangements	
	t(11;14), t(14;20), ploidy status (extended panel)		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 <sup>f</sup>		FISH	

<sup>a</sup>For prognostic impact

<sup>b</sup>In cases of karyotype failure or where morphological suspicion of specific abnormality

<sup>c</sup>aCN-LOH: acquired copy neutral loss of heterozygosity

<sup>d</sup>May not be required for all paediatric B-ALL where only basic risk stratification is required

<sup>e</sup>Minimum testing required

<sup>f</sup>If *MYC* rearrangement is detected *BCL2* and *BCL6* should be undertaken for differential diagnosis between Burkitt lymphoma and a double-hit lymphoma

Banding : une qualité minimale ne peut être recommandée  
Importance d'analyser des métaphases de différentes qualités

« Expertise in **G-banding is assumed** throughout this document, but R- and Q-banding may also be used »

Au diagnostic :

Examiner au minimum 20 mitoses si absence d'anomalie. 10 mitoses doivent être « fully analysed » (classées), et 10 supplémentaires peuvent être examinées ou comptées

en présence d'une anomalie clonale au diagnostic un minimum de **10 métaphases** doit être analysé, si possible.

Quand une anomalie constit est suspectée des métaphases additionnelles doivent être screenées

en suivi : si l'anomalie initiale est toujours détectée, on peut se limiter à 10 mitoses.

## FISH

- ❑ La FISH interphasique peut être utilisée comme **seul test ou test de 1<sup>ère</sup> ligne** dans certaines hémopathies : ex: LLC
- ❑ Indications : peu de métaphases, diagnostic rapide requis pour décision thérapeutique, méthodes moléculaires difficiles à mettre en place : points de cassure variables comme IGH ou partenaires multiples comme MLL, anomalies submicroscopiques ou cryptiques
- ❑ Rappel sur l'importance des **seuils** pour chacune des sondes, avec les différentes préparations mais sans détail sur l'établissement du seuil

[GBPC : 2.2.4. Détermination du seuil de positivité d'une sonde](#)

- ❑ Diagnostic : **Minimum 100 noyaux**
- ❑ Suivi d'une anomalie précédemment détectée : minimum 200 noyaux

[GBPC : « Nombres de noyaux lus :](#)

Il est impératif de compter un nombre suffisant de noyaux selon les circonstances suivantes :

- En cas de résultat négatif (absence d'anomalie aux loci étudiés), il est préférable de lire au moins 200 noyaux au total.
- En cas d'anomalie détectée, le nombre total de noyaux peut être réduit en fonction de la représentativité du clone : si l'anomalie est détectée dans au moins 50 noyaux sur 100, le comptage de 200 noyaux n'est pas obligatoire »

- ❑ Echantillons FFPE : focus sur présence/absence du réarrangement plus que sur le nombre de cellules analysées

## Genomic arrays

- Comme **complément** ou comme **seul test** selon les cas
- Au diagnostic ou en suivi (mais pas pour la MRD)
- Cf guidelines publiées en 2016 (*Schoumans et al, Genes Chrom Cancer 2016*)

## Testing strategies

European recommendations and quality assurance for cytogenomic analysis of haematological neoplasms

**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

## Recommandations spécifiques par pathologies

### LMC

- Rappel sur les **ACA** : « major route » et « minor route »  
OMS en cours inclut dans les nouveaux critères de la phase d'accélération la présence d'une ACA : major route, caryo complexe et anomalies 3q26.
- Reco ELN : fortement recommandé d'analyser **20 mitoses** pour exclure une ACA
- Les translocations variantes « must be » confirmées par FISH ou RT-PCR
- Sondes double fusion** sont recommandées
- Suivi : « should be » : **3, 6 et 12 mois** jusqu'à la RCyC sur **au moins 20 mitoses**
- Une fois la RcyC obtenue, le caryotype peut être remplacé par la FISH : les cas avec une seule fusion au diagnostic ne peuvent pas être suivis par FISH

- ❑ « Optional » / « not essential »
- ❑ Caryotype inclus dans le **DIPSSPlus**, score pronostique des myelofibroses primitives
- ❑ Pourrait être un indicateur utile dans les myelofibroses post PV ou TE
- ❑ Myeloid/lymphoid neoplasms with Eo and abnormalities of *PDGFRA*, *PDGFRB* and *FGFR1* or with *PCM1-JAK2* : Ref: Butt *et al.*, Guidelines for the investigation and management of eosinophilia , BJH 2017 : en 1<sup>ère</sup> intention **FISH ou RT-PCR nichée sur sang** pour FIP1L1-PDGFRB puis BOM et analyse cytogénétique

variable responsiveness to targeted drugs. *FIP1L1-PDGFRB*, *PCM1-JAK2* gene fusions and *PDGFRB* and *FGFR1* and *PCM1-JAK2* gene rearrangements should be excluded by FISH or RT-PCR [40]. Since almost all tyrosine kinase gene fusions, apart from *FIP1L1-PDGFRB*, are associated with visible chromosome rearrangements chromosome banding studies may be performed for screening.

## SMD

- ❑ chez tous les patients chez qui est suspecté un SMD
- ❑ MDS-U
- ❑ IPSS-R : basé sur l'analyse chromosomique mais FISH et array peuvent apporter des informations pronostiques :

**SNP-array** = outil important dans les SMD, recommandé

⇒ aCN-LOH = anomalie récurrente dans les SMD à caryotype normal avec souvent association dans ces régions de mutations de mauvais pronostic (*ASXL1*, *EZH2*, *TP53* et *RUNX1*) => panel NGS fortement recommandé en cas de LOH et bon IPSS-R.

- ❑ Absence/peu de métaphases => **FISH ou array obligatoires : -5/5q-, -7/7q** (étendu à +8, del(17p) et del(20q))
- ❑ si **évocation morphologique** de del(5q) ou anomalie *MECOM*: à rechercher si caryo normal
- ❑ Mutations de *TP53* doivent être recommandées sur le rapport chez patients 5q- , si non réalisées dans le laboratoire

- Obligatoire au diagnostic pour la stratification pronostique
- Screening de mutations dans les gènes : *FLT3, NPM1, CEBPA, RUNX1, ASXL1, DNMT3A et TP53*
- FISH **KMT2A** et **MECOM** recommandées pour tout diagnostic si aucune autre entité
- En cas d'échec de caryotype : **FISH -5/del(5q) et -7/del(7q)**
- FISH **inv(16) en cas de trisomie 22**
- FISH **t(5;11) NUP98-NSD1** : **patient < 5 ans** avec un caryotype normal
- « may require routine testing in the future » : **t(7;12)-MNX1-ETV6 et inv(16)-CBFA2T3-GLIS2**

## ABC 2016

---

(1) et (2)  
FISH KMT2A (MLL) obligatoire dans  
tous les cas: l'identification du  
partenaire peut modifier le pronostic  
+ chez l'enfant :  
NUP98 dans tous les cas,  
ETV6 (TEL) surtout avant 2 ans  
ou quand trisomie 19,  
GLIS2 si LAM7 (pas de sonde  
commerciale)

Evaluation du pronostic avant traitement / choix thérapeutique :

- FISH 4 sondes : del(17p)** (=ERIC), **del(11q), del(13q) et +12** (IWCLL)
- Mutation TP53** (=ERIC et IWCLL)
- IGHV** (=ERIC et IWCLL)

Caryotype : non obligatoire (sauf pour essais cliniques)  
 mais probablement inclus dans les prochaines recos (recherche de CK)

Tableau 1. Indications du caryotype et de la FISH dans la LLC.

Reco GFCH

Diagnostic	Indispensable/ obligatoire	Recommandé	Optionnel/ protocole
Caryotype FISH		del(11)(q22)( <i>ATM</i> ) del(17)(p13)( <i>TP53</i> )	x Gain 2p (2p16( <i>REL</i> ), 2p24( <i>MYCN</i> )...) del(6)(q21) Gain/translocation 8q24( <i>MYC</i> ) del(11)(q22)( <i>BIRC3</i> ) tri12 del(13)(q14) (D13S319) translocation <i>IG</i>
Avant traitement (1 <sup>re</sup> ligne ou rechute)	Indispensable/ obligatoire	Recommandé	Optionnel/ protocole
Caryotype FISH	del(17)(p13)( <i>TP53</i> )	x del(11)(q22)( <i>ATM</i> )	x Gain 2p (2p16( <i>REL</i> ), 2p24( <i>MYCN</i> )...) del(6)(q21) Gain/translocation 8q24( <i>MYC</i> ) del(11)(q22)( <i>BIRC3</i> ) tri12 del(13)(q14) (D13S319) translocation <i>IG</i>

## Myélome

Evaluation du pronostic avant traitement :

**Délétion TP53**

**t(4;14)(p16;q32) FGFR3/MMSET-IGH**

=IMWG et EMN

**t(14;16)(q32;q23) MAF-IGH**

IGH break apart en première intention ?

Ou directement avec 2 sondes DF spécifiques

**Gain 1q**

recommandé par certains groupes nationaux, utilisé en essai clinique

probablement inclus dans les prochaines recos => **fortement recommandé**

CCND1-IGH t(11;14)(q13;q32), MAFB-IGH t(14;20)(q32;q12), MYC translocation, ploïdie (recherche de trisomie des chromosomes 5, 9 et 15) = « panel étendu »

Au moins 100 noyaux après tri

**Cut off élevé** : 10% pour sonde de fusion ou BA, 20% pour anomalies de nombre

Intérêt de MLPA ou array en complément de la FISH (IGH)

## WM et HCL

### Screening mutationnel (diagnostic)

Caryotype non requis...

## B cell lymphomas

- Mantle cell lymphoma: t(11;14);*CCND1*-*IGH*, and *IGK*/*IGL* and *CCND2&3* variants.
- Follicular lymphoma: t(14;18); *BCL2*-*IGH*, and *IGK*/*IGL* variants, and less frequently *BCL6* rearrangements,
- Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): *IGH* (50%), *BCL6* (30%), *BCL2*(20–30%) and *MYC* (10%) gene rearrangements.
- ALK-positive DLBCL: t(2;17)(p23;q23);*CLTC*-*ALK* or rarely other translocations including t(2;5)(p23;q35); *NPM1*-*ALK* translocation.
- Burkitt lymphoma: t(8;14);*MYC*-*IGH*, and *IGK*/*IGL* variants, with no additional involvement of *BCL2* or *BCL6* or complex karyotype.
- Burkitt-like lymphoma with 11q aberration: characterised by chromosome 11q proximal gains and telomeric losses and no *MYC* rearrangement.
- Extra nodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue: t(11;18)(q21;q21); *BIRC3*-*MALT1*; t(1;14)(p22;q32);*BCL10*-*IGH*; t(14;18)(q32;q21);*MALT*-*IGH* and t(3;14)(p14.1;q32);*FOXP1*-*IGH*, trisomy 3 and/or trisomy 18. It should be noted that the t(14;18); *MALT1*-*IGH* translocation is cytogenetically

Reco GFCH WM : caryo ; FISH TP53 (recommandée)

identical to the t(14;18); *BCL2*-*IGH* translocation and that FISH is required to distinguish between them in cases with a differential diagnosis.

- T-cell prolymphocytic leukaemia: 14q11 (*TRA/D*) rearrangement in 80–90% T-PLL.
- Anaplastic large cell lymphoma (ALCL): *ALK* gene rearrangement, most frequent t(2;5)(p23;q35);*ALK*-*NPM1*.
- ALK-negative ALCL: *DUSP22*-*IRF4* rearrangement, most commonly a t(6;7)(p25.3;q32.3) or *TP63* rearrangements.

Liste des anomalies récurrentes les + fréquentes => **aide au diagnostic**

**Évaluation pronostique :**

**FISH MYC** (DLBCL / HBCL)

**FISH IGH, BCL2, BCL6** (DH / TH?)

Pas de consensus (tous DLBCL ? Seulement les GCB et/ou morpho haut grade ? Seulement si >40% MYC+ en IHC ?)

### Reporting

Reports of cytogenomic analyses should comply with ISO15189 standards and include the following information [90].

- Two unique patient identifiers (e.g. date of birth, full name—not initials);
- Sample information (type and source of sample, date of sample referral, date of report and unique sample identification);
- Referral information (reason for referral and clinical indication for test);
- Referring physician/scientist identification;
- Names of significant genes at loci involved in any established recurrent rearrangement;
- Gene names must be written following HUGO gene nomenclature (<http://www.genenames.org>);
- When there is fusion or rearrangement, the genes should be written as *BCR-ABL1* (i.e. use a – sign rather than a /) to distinguish the fusion product from a mixed probe kit;
- Long reports should be avoided as this detracts from the clarity of the results. Methodology and limitations of the

test should not take prominence in a report as they can detract from the results and interpretation;

- Name and signature of one or two authorised persons. The signature may be generated electronically or manually;
- Pagination (i.e. page 1 of 1 or page 1 of 2);
- It is helpful to draw attention to the limitations of the analysis and any uncertainties of the result, especially when the extent of analysis has not reached the standard given in guidance documents;
- It is advisable to provide information regarding the clinical consequences of the observed genetic aberrations in the report. If a purely technical report is issued it should be made clear that the referring clinician will interpret the results and this must be clearly documented elsewhere in the patient notes;
- Where abbreviated cytogenetic results are reported for integration into a MDT-report, the information in the abbreviated MDT result must be consistent with the full cytogenetic report. The cytogenetic summary must be authorised by a suitably qualified healthcare scientist. A full version of the cytogenetic report must be sent independently to the referring health specialist.

+ infos analytiques

FISH normale ou anormale (ne pas utiliser positif/négatif)

Nombre de cellules évaluées sauf pour FFPE

## Délais de rendu

---

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.

---

## interprétation

- Trisomie 8 en mosaïque : il n'est pas nécessaire d'éliminer systématique une anomalie constit
- Y et +15 : préciser leur survenue chez les sujets âgés en l'absence d'hémopathie
- Utiliser la nomenclature WHO
- Diagnostic / pronostic