

Royal Marsden Hospital, London

March 11th 2005



EMN FISH Workshop

Results from Questionnaire

Recommendations for FISH in multiple myeloma



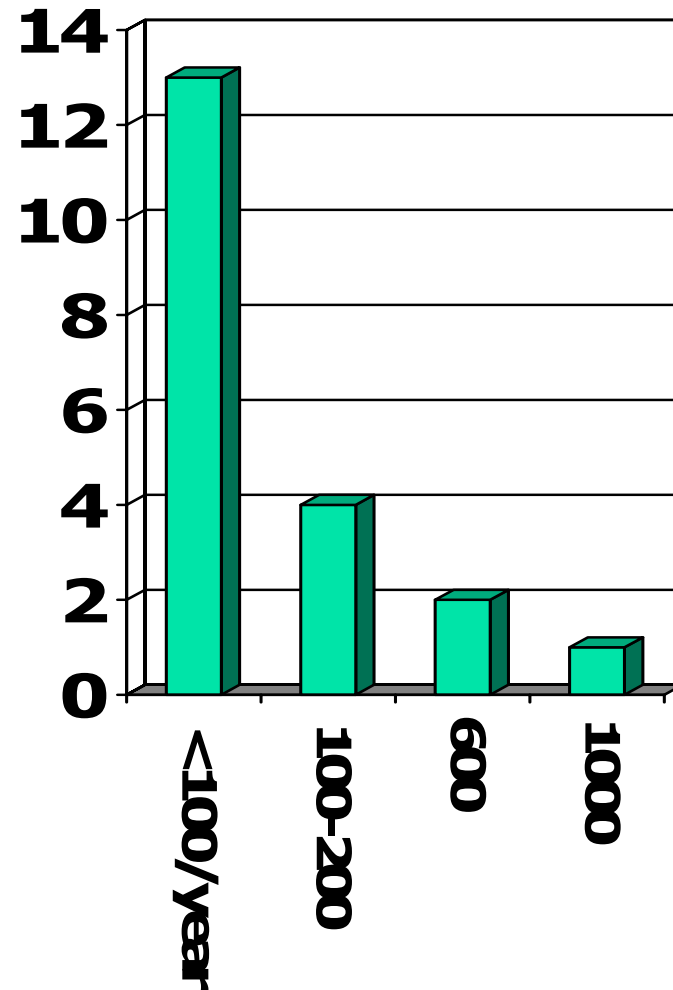
Cíle setkání:

- 38 účastníků ze 14 evrop. zemí
- informace o metodách cytogenetického a molekulárně cytogenetického vyšetření MM
- výměna zkušenosti mezi jednotlivými laboratořemi —————> dotazník

- metodická doporučení pro vyšetřování chromozomových abnormalit u MM

Workloads

- 24 active labs replied
- 10 are associated with cell banks
- 7 labs just starting MM FISH – similar pattern of proposed work but not detailed here





Types of analyses

- 18 labs also do cytogenetics
- 10 use purified PC (4 purified PC only, 3 predominantly purified PC, 3 purify under some circumstances)
 - 6 FISH nuclei exposed to hypotonic & Carnoy's fixative
 - 2 use cytopins
 - 2 use both techniques
- 20 use whole BM or mononuclear cells (6 also purified PC as above)
 - 4 currently using immunostaining + FISH
 - 4 about to start this
 - 3 using morphology (but 2 apparently on cells exposed to hypotonic & Carnoy's fixative)
 - only 5 currently using smears or cytopins!



Imunobarvení X separované buňky

Obě metody jsou srovnatelné, výběr záleží na každém pracovišti

Separované buňky jsou výhodnější pro uchovávání (banka)

Imunobarvení lze použít i na nátěrech KD (musí být čerstvé)

Fixovanou suspenzi KD je možno nakapat přímo na skla, event. uchovávat při -20°C



Cut-off levels and controls

- only 6 labs use a control with each experiment (3 using purified PC, 3 using cytogenetically prepared whole BM)
- 5 labs use a cut-off from the mean +3SD of a small number of controls
- 1 lab uses mean +3SD of controls run for every 8 patients
- 3 labs use normal blood/BM controls but did not state how they use these
- 4 use arbitrary cut-off level of 5% (2 labs), 10% or 20%



Doporučení ohledně „Cut-off level“

- I-FISH u MM je problematická vzhledem k paraproteinům, které mohou blokovat sondy (signály méně zřetelné)
- získání ideálního kontrolního materiálu je obtížné

stanovení „cut-off level“ je dáno průměrem 5-10 neg. kontrol +3 SD

ale

v praxi se ukazuje, že výsledky vyšetření pohybující se těsně nad touto hranicí jsou diskutabilní.

Proto byly doporučeny tyto hodnoty pro cut-off level:

-dual fusion, break apart, numerical gains **10%**

-deletion, single fusion **20%**

Nálezy v rozsahu 10-20% pozitivních buněk by dle doporučení neměly být vydávány pro lékaře jako **pozitivní**.



Number of cells being scored

- On purified PC samples
 - 2 labs do 50 (more for low % PC)
 - 3 labs do 100
 - 4 labs do 200
 - 1 lab does 300
- On whole BM with PC identification
 - 1 lab does 50
 - 4 labs do 100
 - 3 labs do 200
- On samples with no PC identification
 - 50 - 500



Acceptable minimum numbers to score

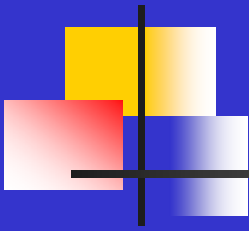
- 10-20 if abnormal acceptable to 5
- 50 acceptable to 4
- 150 acceptable to 1
- 200 acceptable to 3
- rest uncertain



Number of scorers

- 12 labs only have 1 person scoring each sample, although 5 used a checker under some circumstances
- 10 use 2 people, mostly doing half the cells each
- 2 labs involve more than 2 people

Doporučení ohledně počtu hodnocených buněk a odečítajících pracovníků



- má se hodnotit 100 plazmatických buněk**
- ve výjimečných případech lze hodnotit pouze 20 buněk, pokud nejméně 15 buněk je s pozitivním nálezem**
- většinu případů může hodnotit jeden člověk**
- v případě sporného výsledku nebo pokud je ve vzorku méně než 30% plazm. buněk by se měl někdo přidat**
- v malých laboratořích je doporučeno přizvat třetího, pokud se první dva liší o víc než 5%**



Types of probe and testing

- 15 labs use only commercially available probes
- 7 use both commercial and lab grown probes
- 2 use lab grown probes only (but 1 moving to some commercial)
 - 6 do not check any probes
 - 2 check the lab grown probes only
 - 16 batch check on a regular basis



Probes used

- 13q (RB1, D13S319, 13q34 Abbott/Vysis, D13S319-D13S25/13qter Cytocell)
 - D13S319 5 labs
 - RB1 5 labs
 - RB1 & D13S319 5 labs
 - RB1 & 13q34 1 labs
 - D13S319-D13S25 3 labs
 - PACs or BACs 2 labs
- IgH and translocations
 - Only commercial probes specified for break-apart and fusions are from Abbott/Vysis. Those using lab grown probes use different combinations
- p53 - Abbot/Vysis, Qbiogene and BACs used
- ploidy – poorly answered, only 2 clearly using Abbot/Vysis 5,9,15 kit

Doporučení ohledně použitých DNA sond

13q14 - Abbott/Vysis, Q-biogene

- používají se RB1, D13S319, D13S25 s minimálními rozdíly (diskrepance pod 1%), **rozhodnutí je na dané laboratoři**
- laboratoře používající 13q14 a 13q34 potvrdily, že až v 90% případů s delecí 13q14 dochází ke ztrátě celého chromozomu 13

IgH oblast –Abbott/Vysis

- **IgH** – neobvyklé změny (delece, 3 fúzní signály) značí pro jinou přestavbu
- **t(11;14)** – rozdíly mezi dual fusion t(11;14) a XT t(11;14) jsou zanedbatelné
- **t(4;14)** – doporučuje se začít s t(11;14), v případě negativního výsledku pokračovat s t(4;14)-pozor na ploidii!!!

p53 - Abbott/Vysis

t(6;14)(p21;q32), t(14;16), t(14;20), Abbott/Vysis 5,9,15 probe set



Abnormalities tested

- 13q deletion – 24
- IgH break apart – 19
 - t(11;14) 20 (+1 occasional)
 - t(4;14) 16
 - c-MYC 9
 - t(14;16) 8
 - t(6;14)(p21;q32) 6
 - t(14;20) 4
- p53 12
- ploidy 4 (+2 assorted cen, +6 trisomies not listed)
- others 1p, 1q, 8p, CCND2, 22q
- No-one tests for IgL or IgK abnormalities



Doporučení ohledně typu vyšetření

Vyšetřovat vždy:

-del(13q14)/monozomii 13

-IgH

-t(11;14)

-t(4;14)

Ploidie ___!!!!

- přidat p53, když to jde



Reporting

- 11 labs use ISCN – several labs strongly opposed!
- 17 labs report % (not always clear whether % PC abnormal, or % total cells abnormal)
- 1 lab reports % PC abnormal, with majority or minority statement
- 1 lab reports a majority or minority were abnormal
- 5 labs give a simple normal or abnormal report.
- 8 labs thought that it would be useful to adopt a system to indicate different levels of involvement. Most labs failed to understand the intent of the question.



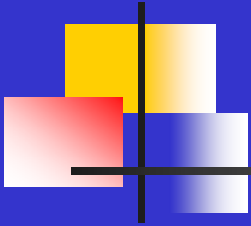
Doporučení ohledně interpretace výsledků vyšetření lékařům

-výsledky vydávat v procentech výskytu abnormálních PB

-nedoporučuje se používat nomenklaturu ISCN (je to matoucí), výsledky předávat klinikům v co nejjednodušší formě

“13q14	deleted (90%)
4p16	t(4;14) single fusion (96%)
11q13	normal
17p13 (p53)	normal

FISH on purified plasma cells identified a t(4;14) in 96% of plasma cells, but only one fusion was seen using a dual fusion probe, suggesting loss of one half of the translocation. From published results this is most likely to be loss of the derived 14 carrying the IgH/FGFR3 fusion. There was also a deletion of chromosome 13 seen in 90% of the plasma cells, but no abnormality of CCND1 or p53 was detected. Although the t(4;14) and deletion 13 have been associated with a poor prognosis in MM the data is not yet good enough to use these results for treatment decisions outwith the context of a clinical trial.”



Všechny laboratoře mají velké problémy s kvalitou vzorku KD, koncentrace PB je často podstatně menší než udává výsledek morfologie.

K dispozici by měl být první odběr!!!! (Téměř nikde není)

KD je třeba zpracovat co nejdříve (nedoporučuje se odebírat KD v pátek)

FISH u MM nelze vyšetřovat bez identifikace PB v KD !

Výsledky FISH u MM lze použít pro stanovení léčby či prognózy pouze v kombinaci s dalšími vyšetřovacími metodami, **ne samostatně !!!**