

COURSE NOTES

Laboratory diagnosis of acute leukemia

Diagnosticul de laborator al leucemiilor acute

Selicean I. Elena-Cristina*, Pațiu Mariana

*Institute of Oncology „Prof. dr. I. Chiricuță” Cluj-Napoca,
Medical Laboratory – Hematology*

Abstract

Acute leukemias are a heterogeneous group of hematopoietic malignancies, characterized by uncontrolled growth of a leukemic clone, which is blocked in the maturation process. First classifications of acute leukemias were based solely on morphologic criteria, but the actual trend is to take into account biological and pathogenetic aspects. This review's purpose is to cover this complex subject, according to the latest WHO classification, in respect with examination requirements and from the perspective of laboratory physicians.

Keywords: acute leukemia, morphology, immunophenotyping, cytogenetics, molecular biology

Rezumat

Leuceemiile acute reprezintă un grup heterogen de îmbolnăviri acute ale sistemului hematopoietic, caracterizate prin proliferarea necontrolată a unei clone de celule leucemice blocată în maturare. Dacă primele clasificări ale LA se bazau exclusiv pe criterii morfologice, tendința actuală de abordare vizează aspecte biologice și patogenetice. Lucrarea își propune abordarea acestui subiect complex, respectând cerințele tematicilor de examen pentru medici rezidenți și specialiști, ținând cont de clasificarea actuală a OMS și abordând diagnosticul LA din perspectiva medicului de laborator.

Cuvinte cheie: leucemie acută, morfologie, imunofenotipare, citogenetică, biologie moleculară

*Corresponding author: Selicean Elena-Cristina,
Tel. 0723 769479, E-mail: cristinaselicean@hotmail.com

Definition, mechanisms, terminology for AL

Acute leukemias are a heterogeneous group of hematopoietic system malignancies, characterized by uncontrolled growth of a cell clone which does not mature normally replaces normal hematopoietic tissue and can invade extramedullary sites.

Proliferation may occur from a myeloid or lymphoid cell. ALs are classified into two broad categories: myeloid and lymphoblastic.

The term of myeloid leukemia includes proliferation of granulocytic, monocytic, erythroid, megakaryocytic lineage, referred as non-lymphoid leukemias.

Patients with AL present anemia, thrombocytopenia, usually neutropenia and blasts in peripheral blood.

FAB classification of AL

The first classification of AL based solely on morphological criteria was made in 1976 by a group of experts of the French-American-British group, and was later revised.

The latest FAB classification, released in 1985, includes 8 types of AML and 3 types of ALL.

The main diagnostic criterion is quantitative: over 30% blasts of the total nucleated non-erythroid cells in bone marrow smear examined under a microscope in Romanovski (May-Grünwald Giemsa) stain. The next step in the FAB classification is to establish lineage assignment of the blasts by using morphological criteria and cytochemical staining.

The **FAB classification of AML** is based on the type of myeloid series that proliferates and the degree of maturation of the leukemic clone.

Thus, acute myeloid leukemia without maturation (M1), acute myeloid leukemia with maturation (M2) and acute promyelocytic leukemia (M3) are proliferations of the granulocytic series, with different degrees of maturation.

For all other FAB types, their name in-

Definiție, mecanisme și terminologie în LA

Leucemiile acute sunt un grup heterogen de boli maligne ale sistemului hematopoietic, caracterizate prin proliferarea necontrolată a unei clone de celule imature, blocate în maturare, care înlocuiește țesutul hematopoietic normal și poate invada teritoriul extramedular.

Proliferarea se poate produce pornind de la o celulă mieloidă sau limfoidă, LA fiind clasificate în două mari categorii: mieloblastice și limfoblastice.

Termenul de LA mieloblastică include proliferări de linie mieloidă granulocitară, monocitară, eritocitară, megakariocitară, termenul alternativ pentru denumirea lor comună fiind LA non-limfoide.

Pacienții cu LA se prezintă cu anemie, trombocitopenie, de obicei neutropenie și blasti în sângele periferic.

Clasificarea FAB a LA

Prima clasificare a LA, bazată exclusiv pe criterii morfologice, a fost făcută de un grup de experți Franco-American-Britanic în 1976, ulterior revizuită.

Ultima versiune a clasificării FAB (1985) include 8 tipuri de LAM și 3 tipuri de LAL.

Principalul criteriu de diagnostic este cantitativ: peste 30% blasti din totalul de elemente nucleate non-eritroide în aspiratul medular examinat la microscop, în colorație tip Romanovski (May-Grünwald Giemsa). Următoarea etapă în vederea clasificării pe criterii FAB este stabilirea apartenenței de linie a blastilor, tot pe criterii morfologice, eventual folosind colorații citochimice ajutătoare.

Clasificarea FAB a LAM se face în funcție de seria/seriile mieloidă care proliferază și gradul de maturare a clonei leucemice.

Astfel, leucemia acută mieloidă fără maturare (M1), leucemia acută mieloidă cu maturare (M2) și leucemia acută promielocitară (M3) sunt proliferări de serie granulocitară, cu grade de maturare diferite.

Și pentru celelalte tipuri FAB denumirea

dicates lineage assignment: M4- myelomonocytic, M5-monocytic (M5a-monoblastic without maturation and M5b monoblastic with maturation), M6-erythroleukemia, M7-megakaryoblastic leukemia, M0 - acute myeloid leukemia without differentiation (Table 1).

FAB group classifies LAL in three categories, based upon the morphological appearance of blasts (Table 2).

L1 and L2 are similar in terms of morphology and it has been proved that they do not represent clinically and biologically distinct entities. L3 has a morphological appearance highly suggestive of lymphoblastic leukemia- Burkitt's lymphoma, which requires confirmation by demonstrating a mature B phenotype.

indică apartenența de serie a clonei leucemice: M4 - este leucemia acută mielomonocitară, M5 - leucemia acută monocitară (M5a monoblastică fără maturare și M5b - monoblastică cu maturare), M6 - eritroleucemie, M7 - leucemie acută megakarioblastică, M0 - leucemie acută mieloidă minim diferențiată (Tabelul 1).

Grupul FAB clasifică LAL, pe baza aspectului morfologic al blastilor, în trei categorii (Tabelul 2).

Categoriile L1 și L2 sunt asemănătoare din punct de vedere morfologic. S-a dovedit că nu reprezintă nici din punct de vedere clinic și biologic entități distincte. L3 reprezintă aspectul morfologic înalt sugestiv pentru leucemia limfoblastică - limfomul limfoblastic Burkitt, care necesită confirmare prin imunofenotipare (fenotip B-matur).

Table 1. FAB classification of AML

FAB	Blasts in BM	Granulocytic component	Monocytic component	Other
M1	≥ 90% from NEC, ≥ 3% MPO+	-	≤ 10% from NEC	-
M2	30-89% from NEC	>10% from NEC	<20% from NEC	-
M3				Typical morphology
M4	≥ 30% from NEC (myeloblasts, monoblasts and promonocytes)	≥ 20% from NEC (including myeloblasts)	≥ 20% from NEC	Additional diagnostic criteria : -monocytes in PB>=5x 10 ⁹ /l -seric lysozyme raised -cytochemistry- specific aspect
		Similar aspect with M2		Additional criteria : -monocytes in PB >=5x 10 ⁹ /l and seric/ urinary lysozyme three times normal values -monocytes in PB>=5x 10 ⁹ /l and cytochemistry specific for monocytic series
M5	M5a Monoblasts ≥ 80% from the monocytic series	-	≥ 80% from NEC	-
	M5b Monoblasts<=80% from the monocytic series	-	≥ 80% from NEC	-
M6	≥ 30% from NEC	-		Erythroblasts >= 50%
M7		-		lineage assignment to megakaryocytes documented by ultrastructural cytochemistry (platelet peroxidase) or by immunophenotyping (megakaryocytic markers)
M0	<3% MPO+	-		Myeloid immunophenotype

Table 2. FAB classification of ALL

	Blasts	Cytoplasm	Nucleus
L1	small	scant	Rather coarse chromatin, Nucleoli - indistinct or absent
L2	medium	moderate, weak basophilic	Finely dispersed, evident nucleoli
L3	large	Abundant, intense basophilic, sometimes vacuolated	condensed variable visible nucleoli

Identification of blasts - morphological criteria

The percentage of blasts in bone marrow is determined by counting 500 nucleated elements.

FAB Group recognizes 3 types of blasts with distinct morphological characters: lymphoblast, type I agranular myeloblasts and type II myeloblasts with azurophilic granules. National Cancer Institute Workshop describes an additional type III myeloblast with more than 20 azurophilic granules in the cytoplasm.

From a practical perspective and as recommended by the International Working Group on Morphology, it is important to describe the blasts as agranular and granular.

Agranular blasts are seen in MPO-negative acute leukemias: ALL, AML-M0, M6, M7. Today it is considered that classical morphology yields only indicative criteria for identifying these types of blasts and ultrastructural studies and immunophenotyping are needed for their correct classification.

Regarding granular blasts, it is important to differentiate them from normal and dysplastic promyelocytes. The main difference between a granular blast and a normally appearing promyelocyte is the clear perinuclear hof (Golgi area), a promyelocytic feature. An exception to this rule are the granular blasts of AML with t(8; 21), which may have a separate small Golgi area, but no other characters of a promyelocyte.

Identificarea blaștilor - criterii morfologice

Determinarea procentului de blaști în măduva osoasă se face prin numărarea a 500 elemente nucleate.

Grupul FAB recunoaște 3 tipuri de blaști cu caractere morfologice distincte: limfoblast, mieloblast de tip I - agranular și mieloblast de tip II - cu granulații azurofile. National Cancer Institute Workshop descrie un tip adițional, mieloblastul de tip III cu peste 20 granulații azurofile în citoplasmă.

Din punct de vedere practic și conform recomandărilor International Working Group on Morphology este importantă descrierea blaștilor ca agranulari și granulari.

Blaștii agranulari se întâlnesc în leucemiile acute MPO-negative: LAL, LAM - M0, M6 și M7. În prezent se consideră că morfologia clasică oferă doar criterii orientative de identificare a acestor tipuri de blaști și că sunt necesare studii de ultrastructură și imunofenotip pentru corecta lor încadrare.

În ceea ce privește mieloblaștii granulari, este importantă diferențierea lor de promielocitul normal și displazic. Principala deosebire a blaștilor granulari de promielocitul normal este considerată zona clară perinucleară (zona Golgi) caracteristică promielocitului. Excepția de la această regulă o reprezintă blaștii granulari din LAM cu t(8;21), care pot avea o mică zonă Golgi distinctă, dar fără alte caractere de promielocit.

Promielocitul displazic întrunește, pe

Table 3. Morphological aspects of monocytic lineage

	Nucleus	Chromatin	Cytoplasm	Other
Monoblast	Round/ oval	delicate/ lacy evident nucleolus	Basophilic, rare azurophilic granules	large, 20-30µm
Promonocyte	Convolutated/ indented	delicate/ lacy evident nucleolus	Variable basophilia, variable azurophilic granules	Monoblast- like, but different nucleus shape
Immature monocyte	Convolutated/ indented	condensed, sometimes nucleolated	Intermediate basophilia between promonocytes or blasts and mature monocytes	Resembles monocytes, but more immature and smaller
Monocyte	Lobulated/ indented	Condensed, without nucleoli	Grey, occasionally azurophilic granules, vacuoles	large, 20-25µm

Dysplastic promyelocytes display features belonging to the maturation stage, in addition to abnormal patterns: uneven cytoplasmic basophilia, poorly represented Golgi zone, hipergranularity or hipogranularity, irregular distribution of granules.

The morphological identification of these forms is important for:

- MDS-differential diagnosis - where the percentage of blasts is crucial
- differential diagnosis of AML - agranulocytosis-morphological aspects can be critical in certain stages
- further laboratory investigation for a possible t(8;21).

In AML-M3 malignant promyelocytes are counted as blasts. In the classical form, they are hipergranular and may have multiple Auer rods. The morphologic microgranular/ hypogranular variant requires cytogenetic confirmation (the presence of t(15, 17)). Prompt diagnosis of APL is followed by establishment of specific therapy and DIC prevention.

Other situations in which morphological assessment of blasts is crucial for diagnosis are proliferations of the monocytic compartment. In these cases the percentage of blasts results by adding the following: myeloid blasts, monoblasts and promonocytes. Differential diagnosis of chronic versus acute myelomonocytic leukemia depends on the morphological differentiation of monoblasts and promonocytes from more mature monocytes (*Table 3*).

lângă caracterele aparținând stadiului de maturare, aspecte anormale: bazofilie citoplasmatică neuniformă, zona Golgi slab reprezentată, hipergranularitate sau hipogranularitate, distribuție neregulată (în grămezi) a granulațiilor.

Identificarea acestor forme morfologice este importantă pentru:

- diagnosticul diferențial LAM - SMD - unde procentul de blaști este hotărâtor
- diagnosticul diferențial LAM - agranulocitoză, unde aspectele morfologice pot fi decisive în anumite stadii
- orientarea investigațiilor în vederea eventualei identificări a t(8;21).

În LAM-M3, promielocitele maligne sunt numărate ca și blaști. În forma clasică acestea sunt hipergranulare și pot prezenta corpi Auer multipli dispuși "în grămadă de surcele". Varianta morfologică microgranulară/hipogranulară necesită confirmare citogenetică (prezența t(15;17)). Diagnosticul pozitiv de LA promielocitară este decisiv pentru instituirea terapiei specifice și poate reprezenta o urgență din cauza riscului crescut de CID.

O altă situație în care evaluarea morfologică a blaștilor este crucială pentru diagnostic sunt proliferările de linie sau cu componentă monocitară. În aceste cazuri procentul de blaști este reprezentat, în funcție de situație, de însumarea procentelor următoarelor elemente: mieloblaști, monoblaști și promonocite. Diagnosticul diferențial al LA de leucemia mielomonocitară cronică depinde de deosebirea morfologică a monoblaștilor și promonocitelor de monocitele mai mature (*Tabelul 3*).

Other important morphological characters for the diagnosis and classification of AML are dysplastic changes of hematopoiesis. Thus, the identification of more than 50% dysplastic elements in at least two myeloid lineages allows categorization, according to recent WHO criteria, in the category of dysplasia related AML. Observation of abnormal eosinophils with large, basophilic granules guides investigations towards identification of inv(16) or t(16;16).

Cytochemical stains improve accuracy and reproducibility of **lineage assignment** in AL. The most useful cytochemical stains are peroxidase and non-specific esterase.

Myeloperoxidase is present in granulocytic and monocytic cells, absent in lymphocytic cells. Therefore MPO-stained myeloid cells (from granular blasts, promyelocytes to segmented granulocytes) have a specific yellowish-brown color, proportional to the content of MPO; monocytes are weakly positive; lymphocytic cells are always negative. Interpretation requires experience in order to distinguish false negative reactions (for technical reasons) from situations with peroxidase deficiency (dysplastic feature sometimes encountered in AML).

As per the FAB classification, peroxidase reaction allows differentiation in POX- positive and POX-negative AL and differentiation of AML-M0 and AML-M1 (the percentage of POX-positive blasts), aids the identification of the monocytic component by specific reaction appearance (thin veil) and detects the presence of Auer rods more frequently than the MGG stain.

In most laboratories where immunophenotyping is available, cytochemical stains were abandoned.

The Perls reaction can be useful in AL for identification of ringed sideroblasts as a dysplastic feature.

The FAB classification represents the first attempt to divide the heterogeneous group of acute leukemias, where each of the subtypes does not represent a distinct clinical and biological entity.

Alte caractere morfologice importante pentru diagnosticul și clasificarea LA sunt reprezentate de modificările displazice ale seriilor mieloidă. Astfel, identificarea a peste 50% elemente displazice în cel puțin două linii mieloidă permite încadrarea, conform criteriilor recente ale OMS, în categoria de LAM legată de displazie, iar evidențierea pe frotiu a unor eozinofile anormale, cu granulații mari, bazofile, orientează investigațiile în vederea identificării inv(16) sau t(16;16).

Colorațiile citochimice îmbunătățesc acuratețea și reproductibilitatea identificării de linie în LA. Cele mai utile colorații citochimice sunt mieloperoxidaza și esteraza nespecifică.

Mieloperoxidaza este o enzimă din granulațiile celulelor de linie granulocitară și monocitară, absentă în celulele de linie limfocitară. În consecință celulele de linie granulocitară prezintă în colorația specifică, o reacție gălbui-maronie proporțională cu conținutul de MPO; monocitele sunt slab pozitive; celulele de linie limfocitară sunt întotdeauna negative. Interpretarea reacției mieloperoxidazei necesită experiență pentru a putea distinge reacțiile fals negative (din motive tehnice) de situațiile cu deficit de peroxidază (caracter displazic întâlnit uneori în LAM).

Reacția mieloperoxidazei permite diferențierea LA în MPO - pozitive și MPO - negative și diferențierea LAM - M0 de LAM - M1 (prin procentul de blaști MPO - pozitivi), ajută la identificarea componentei monocitare prin aspectul specific al colorației (văl fin) și detectează mai frecvent decât colorația MGG prezența corpiilor Auer.

În majoritatea laboratoarelor în care este disponibilă imunofenotiparea, reacțiile citochimice au fost abandonate.

În LA mai poate fi utilă colorația cu albastru de Prusia - *reacția Perls* pentru identificarea sideroblaștilor inelari ca semn de displazie.

Clasificarea FAB a LA reprezintă prima încercare de împărțire a grupului heterogen al leucemiilor acute, fără ca fiecare din subtipuri să reprezinte o entitate distinctă din punct de vedere clinic și biologic.

Subsequently, the classification proposed by MIC Cooperative Study Group (morphology, immunology, cytogenetics) paved the way for the recognition of the significance of cytogenetics and immunophenotype in AL.

The next classification proposed and widely accepted was the **WHO classification** of 2001, revised in 2008. The principles underlying this classification are:

- the percentage of blasts required for diagnosis according to WHO criteria is 20%
- the percentage of blasts is not a diagnostic criterion for AL, when there is evidence of recurrent cytogenetic mutations in a significant hematologic context
- includes two provisional entities characterized by mutations in NPM1 and CEBPA
- introduces MDS-related AML, diagnosis based on MDS history, cytogenetic abnormalities associated with MDS, multilineage dysplasia
- introduces the post-chemotherapy AML class
- maintains FAB terminology for morphological classification of AML in the category "not otherwise specified"

Ulterior, clasificarea propusă de Grupul de Studiu Cooperativ MIC (morfologie, imunologie și citogenetică) a deschis calea pentru recunoașterea semnificației modificărilor citogenetice și respectiv a imunofenotipului în LA.

Următoarea clasificare propusă și acceptată pe scară largă a fost **clasificarea OMS** din 2001, revizuită în 2008. Principiile pe care se bazează această clasificare sunt următoarele:

- procentul de blaști necesar pentru diagnosticul pozitiv de LA este de 20%;
- procentul de blaști nu mai reprezintă criteriu de diagnostic pentru LA atunci când într-un context hematologic semnificativ se demonstrează prezența unei mutații citogenetice recurente;
- include două entități provizorii caracterizate prin mutații NPM1 și CEBPA;
- introduce clasa LAM legată de SMD, având ca și criterii de diagnostic antecedentele de SMD, anomalii citogenetice asociate SMD, displazia multiliniară;
- introduce clasa LAM post- chimioterapie;

WHO 2008 classification of AL

I. Acute myeloid leukemia				
I.1 AML with recurrent cytogenetic abnormalities				
I.1.1	AML with	t(8;21)(q22;q22)	(RUNX1;RUNX1T1)	
I.1.2	AML with	inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22)	(FBMYH11)	
I.1.3	AML with	t(15;17)(q22;q12)	(PML-RARA)	(promyelocytic)
I.1.4	AML with	t(9;11)(p22;q23)	(MLLT3-MLL)	
I.1.5	AML with	t(6;9)(p23;q34);	(DEK-NUP214)	
I.1.6	AML with	inv(3)(q21;q26.2) or t(3;3)(q21;q26);	(RNP1-EVI1)	
I.1.7	AML with	t(1;22)(p13;q13)	(RMB15-MKL1)	(megakaryoblastic)
Provisional entities :		AML with mutated NPM1		
		AML with mutated CEBPA		
I.2 AML dysplasia related				
I.3 Myeloid neoplasia therapy related				
I.4 Myeloid sarcoma				
I.5 Myeloid proliferations Down syndrom related				
I.5.1	Transitory abnormal myelopoiesis			
I.5.2	AML Down syndrome associated			

I.6	AML not otherwise specified		
I.6.1	AML with minimal differentiation		
I.6.2	AML without maturation		
I.6.3	AML with maturation		
I.6.4	Myelomonocytic AL		
I.6.5	Myeloblastic/ monocytic AL		
I.6.6	Acute erythroid leukemia		
	Pure erythroid leukemia		
	Erythroleukemia (erythroid/ myeloid)		
I.6.7	Acute megakaryoblastic leukemia		
I.6.8	Acute basophilic leukemia		
I.6.9	Acute panmyelosis with myelofibrosis		
II.	Acute leukemia of ambiguous lineage		
II.1	AL undifferentiated		
II.2	AL mixed phenotype	with t (9;22)(q34;q11.2)	BCR-ABL1
II.3	AL mixed phenotype	with t(v;11q23);	MLL rearrangements
II.4	AL mixed phenotype	B/myeloid, NOS	
II.5	AL mixed phenotype	T/myeloid NOS	
II.6	AL mixed phenotype	NOS-rare types	
II.7	Acute lymphoblastic leukemia/ lymphoma NK cells		
III.	Acute lymphoblastic leukemia/ lymphoma		
III.1	ALL/ LL B NOS		
III.2	ALL/LL B with recurrent cytogenetic abnormalities		
	III.2.1	t (9;22)(q34;q11.2)	BCR-ABL1
	III.2.2	t(v;11q23)	MLL rearrangements
	III.2.3	(12;21)(p13;q22)	TEL-AML1 (ETV6-RUNX1)
	III.2.4	hyperdiploidy	
	III.2.5	hypodiploidy t(5;14)(q31;q32);	IL3-IGH
	III.2.6	t(1;19)(q23;p13.3)	E2A-PBX1 (TCF3-PBX1)
III.3	ALL/LL T		

- classifies ALL and ambiguous line leukemias on immunophenotypic and genetic criteria
- correlates ALL with lymphoblastic lymphoma.

Imunophenotyping - role in diagnosis of AL

Technical Considerations

Determination of cell surface antigen expression may be done on cytological and histological preparations (imunocytochemistry, imunohistochemistry), but imunophenotyping by flow-cytometry became the most widely used because it has many advantages.

- menține terminologia FAB pentru clasificarea morfologică a LAM din categoria « not otherwise specified »;
- clasifică LA limfoblastice și de linie ambiguă pe criterii de imunofenotipare și genetică;
- corelează LAL cu echivalentul tisular de limfom limfoblastic.

Imunofenotiparea – rolul în diagnosticul LA

Considerații tehnice

Determinarea expresiei antigenelor de suprafață celulară se poate face pe preparate cito-

Currently available protocols for in vitro diagnostic allow concurrent reading at up to 3-4 wavelengths and perform a multiparametric, objective, sensitive and rapid analysis of a large number of cells, with the ability to delineate and characterize distinct populations of cells in the analyzed sample in terms of expression of surface and intracellular antigens.

This technique may be used in samples of peripheral blood, bone marrow, and when warranted, cerebrospinal fluid, other fluids (pleural, pericardic, peritoneal), tumor masses.

Before being analyzed, the primary sample is subject to a preliminary process for separating mononucleate cells in a concentration gradient or for red cell lysis. Many laboratories prefer lysing protocols, because separation methods are more laborious and cells could get lost during processing. For analysis of intracellular antigens the method involves a step consisting in permeabilisation of cell membranes.

The current strategy for demarcating cell populations from the sample ("gating") is plotting CD45 versus SSC (side scatter - side scattering of a laser beam). Blasts have a low side scatter (because they are weak granular) and express low CD45 +, compared to other nucleated cells in the sample: lymphocytes intensely CD45 +, erythroblasts CD45 negative, precursors of granulocytic series – high side scatter.

Antibody panel selection

The use of minimal antibody panels for diagnostic purposes is recommended, since they offer great diagnostic information and are reproducible in laboratories with different equipment.

The panel should help distinguishing between AML and ALL, establishing lineage assignment (myeloid, monocytic, megakaryocytic, erythroid, namely B or T), highlighting possible aberrant expression of antibodies and outlining a characteristic immunophenotype (leukemia-associated immunophenotype "LAIP")

The choice of fluorochrome depends on the type of device; most devices can use fluorescein isothiocyanate, phycoerythrin, phycoerythrin-cyanin 5.

logice (imunocitochimie) sau histologice (imunohistochimie), dar în practică s-a impus imunofenotiparea prin citometrie în flux continuu, datorită multiplelor avantaje pe care le prezintă.

Metodele aplicate în prezent în scop diagnostic permit citirea concomitentă la 3-4 lungimi de undă și efectuează o analiză multiparametrică, sensibilă și rapidă a unui număr mare de celule, oferind posibilitatea de a delimita și caracteriza din punct de vedere al expresiei antigenelor de suprafață și intracelulare, populațiile celulare din eșantionul analizat.

Tehnica se poate aplica pe probe de sânge periferic, măduvă osoasă, iar atunci când este justificat, lichid cefalorahidian, alte lichide (pleural, pericardic sau peritoneal) sau mase tumorale.

Înainte de a fi analizată, proba primară se supune unui procedeu de separare a mononucleatelor în gradient de concentrație sau unui procedeu de liză a hematiilor. Multe laboratoare preferă metoda cu liză, deoarece metodele de separare sunt mai laborioase și există riscul de a pierde celule pe parcursul procesului de prelucrare. Pentru analiza antigenelor intracelulare, metoda presupune și o etapă de permeabilizare a membranei celulare.

Strategia actuală pentru delimitarea populațiilor de celule din proba de analizat (strategia de "gating"), pentru leucemiile acute, este CD45 versus SSC (side scatter- dispersia laterală sub unghiuri mari 90° a fasciculului laser). Blaștii au un grad redus de dispersie laterală a fasciculului (deoarece sunt slab granulari) și exprimă CD45 dim+. Aceasta permite diferențierea lor de celelalte celule nucleate din proba analizată: limfocite CD45 +++, eritroblaști CD45-, precursori neutrofilici și eozinofilici – intensitate mare a fasciculului laser dispersat lateral.

Alegerea panelului de anticorpi

În practică se urmărește utilizarea unor paneluri minimale de anticorpi, care să permită obținerea unor date cu valoare diagnostică mare și reproductibile în laboratoare cu dotări diferite.

Panelul trebuie să permită deosebirea LAM de LAL, stabilirea apartenenței la o linie (mieloidă, monocitară, megakariocitară, eritocitară, respectiv B sau T), evidențierea expresiei aberante de anticorpi,

Interpretation

For practical reasons, it was established that the positivity limit is 20% for surface antigens, and 10% for cytoplasmic markers.

Differentiation of ALL AML

AML blasts express immature neutrophilic and monocytic antigens: CD13, CD15, CD33, CD64, CD117, MPO.

The most sensitive and specific marker for B lymphoblasts is CD19, followed by CD22c. In T lineage lymphoblasts the highest sensitivity is provided by CD3c.

Immunological characterization of POX-negative AML

Immunophenotyping is essential for differential diagnosis of POX- negative ALs.

Expression of CD13, CD33 and MPO, together with the lack of expression of CD19, CD79a, TdT and CD3c demonstrates an AML phenotype.

AML-M0 is defined as having less than 3% MPO-positive blasts in classic cytochemistry. The presence of MPO in turn can be better demonstrated by immunophenotyping and electron microscopy. In these conditions, at least one positive myeloid marker (CD113, CD33, or MPO), in the absence of lymphoid markers (CD3, CD22a, CD79a) and megakaryocytic markers (CD41 and CD61), allows the diagnosis of AML-M0. HLA-DR, CD34, CD117, CD65, CD14 and CD15 may be positive and sometimes lymphoid markers (CD2, CD4, CD7, CD19) are aberrantly expressed by myeloid cells.

Blasts of AML-M7 express megakaryocytic markers: CD41, CD42, CD61.

In erythroleukemia blasts express CD235 or the characteristic phenotype CD36 + / CD64-/MPO-.

Immunological characterization of AML morphological classes

AML-M1 and AML-M2 are characterized by the expression of CD13, CD33, MPO, CD34, and CD117, without expression of CD79a, CD14, CD64.

care să contureze un imunofenotip asociat leucemiei. Alegerea fluorocromilor depinde de tipul aparatului, majoritatea aparatelor pot utiliza izotiocianat de fluoresceină, ficoeritrină, ficoeritrină - cyanin 5.

Interpretare

Din rațiuni practice s-a stabilit ca limită de pozitivitate expresia la peste 20% din celulele populației examinate a antigenelor de suprafață, respectiv 10% pentru markeri citoplasmatici.

Diferențierea LAM de LAL

În principiu, blastii din LAM exprimă antigene imature de linie neutrofilică și /sau monocitară: CD13, CD15, CD33, CD64, CD117 și MPO.

Markerul cel mai sensibil și specific pentru limfoblastii de linie B este CD19, urmat de CD22c. Pentru limfoblastii de linie T, cea mai mare sensibilitate o are CD3c.

Caracterizarea imunologică a LAM – MPO negative

Imunofenotiparea este esențială pentru diagnosticul diferențial al LA – MPO negative.

Expresia de CD13, CD33, MPO, cu CD19, CD79a, CD3c și TdT negative, este fenotip de LAM.

LAM - M0 se definește în citochimie clasică având sub 3% blasti MPO +. Prezența MPO se poate demonstra mai bine prin imunofenotipare și prin microscopie electronică. În aceste condiții, imunofenotipul cu cel puțin un marker mieloid pozitiv (CD113, CD33 sau MPO), în absența markerilor limfoizi (CD3, CD22a, CD79a), a markerilor megakariocitari (CD41 și CD61) și eritrocitari (CD235), permite diagnosticul de LAM - M0. Pot fi pozitivi: HLA-DR, CD34, CD117, CD65, mai rar CD14 și CD15 și uneori markeri limfoizi exprimați în mod aberant pe celulele mieloid (CD2, CD4, CD7 sau CD19).

Blastii din LAM –M7 exprimă markeri megakariocitari: CD41, CD42 și CD61.

În eritroleucemie blastii exprimă CD235, iar, în absența acestui marker, imunofenotipul caracteristic este CD36+/CD64-/MPO-.

Caracterizarea imunologică a celorlalte clase morfologice de LAM

LAM-M1 și LAM-M2 se caracterizează

Subtypes of monocytic lineage or with monocytic component express CD13 and CD33, and are characterized as follows:

- AML-M4 can present two blast subpopulations: monocytic cells with stronger CD45 expression and CD117-/ CD64 +, while myeloid cells are CD117 +, CD64-;
- In AML-M5 it has been proven that CD14 is not highly specific, as blasts can be CD14 + or negative, but CD64, CD11c, CD15, CD117 are generally positive.

Attempts to establish morphology - immunophenotype correlations showed that, within the same FAB classes, there are different immunophenotypes and the same immunophenotype is found in different FAB classes.

However, there are two AML classes characterized by recurrent cytogenetic abnormalities and specific morphology, which show strong association with certain immunophenotypes:

- *APL with t(15;17)* is usually HLA-DR and CD34 negative, with MPO + + +, CD33 +, CD11b-, CD14-. This is particularly useful for differential diagnosis of APL hypogranular variant and AML M4 and M5.

- *AML with t(8;21)* with M2-type morphology is characterized by MPO +, CD13 +, CD33 weakly +, HLA-DR +, CD34 + and aberrant expression of CD19, frequently asynchronous expression of CD13 and CD33, which are weakly positive in comparison with MPO expression.

These immunophenotypes are not considered of absolute diagnostic value but, together with the morphology, they guide the genetic investigation towards specific recurrent abnormalities.

ALL immunophenotyping

Immunophenotyping ALL has demonstrated that many cases with FAB L3 morphology are malignancies with mature B cells and represent the leukemic phase of Burkitt's lymphoma.

80% of cases of ALL have B precursor immunophenotype. These blasts express a variety of B and pan-B antigens, and typically do not express the surface immunoglobulin charac-

prin expresia de CD13, CD33, MPO, CD34 și CD117, fără expresie de CD79a, CD14 și CD64.

Leucemiile de linie monocitară sau cu componentă monocitară exprimă CD13 și CD33, putând fi caracterizate în plus astfel:

- în LAM-M4 se evidențiază două subpopulații de blaști, populația monocitară cu expresie mai intensă de CD45 și CD117-, CD64 +; celulele mieloides sunt CD117+, CD64-.
- în LAM-M5 s-a dovedit că CD14 nu este extrem de specific, blaștii pot fi CD14+ sau CD14-, dar CD64, CD11c, CD15 și CD117 sunt de obicei pozitive.

Încercarea de a stabili corelații între morfologie și imunofenotip, a demonstrat că, în cadrul aceleiași clase FAB, întâlnim imunofenotipuri diferite și același imunofenotip se regăsește în diverse clase FAB.

Totuși, există două clase de LAM cu anomalii citogenetice recurente și morfologie specifică, la care s-a demonstrat o corelație puternică cu imunofenotipul, astfel:

LA promielocitară cu t(15;17) se prezintă cu HLA-DR-, CD34-, MPO intens+, CD33+, CD11b-, CD14-. Acest imunofenotip este util în special pentru diagnosticul diferențial dintre LA promielocitară, varianta hipogranulară, și LAM - M4 sau M5.

LAM cu t(8;21) cu morfologie tip M2 este caracterizată de imunofenotipul MPO+, CD13+, CD33 slab+, HLA-DR+, CD34+ și expresie aberantă de CD19. Se întâlnește frecvent expresia asincronă de CD13 și CD33, slab pozitivă comparativ cu expresia MPO.

Aceste imunofenotipuri nu reprezintă un criteriu de diagnostic, dar, împreună cu morfologia, pot orienta investigațiile de genetică.

Imunofenotiparea LAL

Imunofenotiparea LAL a demonstrat că multe din cazurile cu morfologie FAB L3 sunt neoplazii cu celule B mature care reprezintă faza leucemică a limfomului Burkitt.

80% din cazurile de LAL au imunofenotip B precursor. Acești blaști exprimă o mare varietate de antigene B (tinere și pan-B) și nu exprimă

Table 4. ALL immunophenotype

B-ALL classification according to Ig expression									
PAX-5, CD19, CD20, CD22(s,cyt), CD24, CD79a (cyt), CD20 (part/dim/-), CD10 (CALLA), CD45dim, CD34, TdT									
	μ cyt			μ surface			Expression/ restriction of light chain		
Pro-B	-			-			-		
Pre-T	+			-			-		
Pre-T transitional	+			+ (dim)			-		
T-ALL classification according to tymocyte maturation stage									
CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD1a, CD10, CD34, CD99, HLA-DR, Tdt									
	CD1a	CD2	cCD3	sCD3	CD4	CD5	CD7	CD8	CD34
Pro-T	-	-	+	-	-	-	+	-	+
Pre-T	-	+	+	-	-	+/-	-	-	+/-
Cortical	+	+	+	-	+	+/-	+	+	-
Medular	-	+	+	+	+/-	+/-	+	+/-	-

teristic for B mature lymphocytes. They also contain TdT, a nuclear enzyme present in the precursors of B or T lymphocytes but absent from mature lymphocytes.

15% of ALL have a precursor T profile expressing young T, pan-T antigens and TdT.

Immunological classification of ALL is important in terms of prognosis and therapeutic decision. Precursor B type leukemia has more favorable prognosis, but in this group there still are prognostic subgroups according to cytogenetic results.

ALL immunophenotype associated with recurrent cytogenetic changes:

- B-ALL with t(1, 19)(q23, p13): CD9 +, CD10 +, CD19 +, CD20-or partially +, CD34-;
- B-ALL with t(4; 11)(q21, q23): CD10-, CD15 +, CD24-or partially +, CD34-;

Leukemic blasts usually differ from normal blasts by *aberrant antigen expression*:

- asynchronous expressions (simultaneous expression of young and mature markers)
- expression of antigens which are specific for other lines
- lack of expression of specific antigens
- antigen overexpression.

Thus, myeloid blasts may present asynchronous expressions of CD15 (a marker of ma-

imunoglobuline de suprafață care sunt caracteristice limfocitelor B mature. De asemenea conțin TdT, enzimă nucleară prezentă în precursori de linie B sau T, dar absentă din limfocitele mature.

15% din LAL au profil precursor T. Limfoblaștii T exprimă antigene T tinere, pan-T și TdT.

Clasificarea imunologică a LAL este importantă din punct de vedere prognostic și al atitudinii terapeutice. Categoria precursor B are prognostic mai favorabil, dar și în cadrul acestui grup există subgrupe de prognostic, în funcție de rezultatele citogenetice.

Imunofenotipurile LAL asociate cu modificări citogenetice recurente sunt:

- B-LAL cu t(1;19)(q23;p13), imunofenotip: CD9+, CD10+, CD19+, CD20- sau parțial +, CD34-
- B-LAL cu t(4;11)(q21;q23), imunofenotip CD10-, CD15+, CD24- sau parțial +, CD34-.

Blaștii din LA se deosebesc de obicei de blaștii din hematopoieza normală prin *expresii aberante de antigene*:

- expresii asincrone (expresie concomitentă de markeri de celulă tânără și matură);
- expresia de antigene specifice pentru alte linii;
- lipsa expresiei unor antigene specifice;
- supraexpresia unor antigene.

Astfel, blaștii mieloidi pot prezenta ex-

Table 5. EGIL scoring for biphenotypic leukemia

Scoring	Lineage		
	B	T	myeloid
2	CD79 cμ	CD3 TCR	MPO(lysozyme)
1	CD 2 CD19 CD10 CD20	CD2 CD5 CD8 CD10	CD13 CD33 CDw65 CD117
0.5	TdT CD24	TdT CD17 CD1a	CD24 CD25 CD64

turity) and CD117 (a marker usually present on young elements of the myeloid lineage) and the expression of antigens specific for other lines: CD19, CD7, CD56

Lymphoblasts can express aberrant myeloid antigens, B lymphoblasts sometimes express CD20 and T lymphoblasts may express asynchronous markers.

It is important to establish the leukemia-associated immunophenotype for each individual case at diagnosis. This may be useful later in the follow-up and the diagnosis of minimal residual disease, with the specification that blasts may undergo immunophenotypic changes during evolution or post-therapy.

Diagnosis of **acute leukemia with mixed phenotype** is the result of immunophenotyping and applying the EGIL score. This score assigns values of 2, 1, 0.5 points for markers of B, T and myeloid lineage, respectively (Table 5).

AL with mixed phenotype is further classified according to recurrent cytogenetic abnormalities seen in this group.

The role of cytogenetics in AL

Clonal cytogenetic abnormalities, both numerical and structural, are present in 60-80% of the AML and respectively 80% of the ALL.

Identification of genetic changes in AL at karyotype and molecular level allowed for:

presii asincrone CD15 (marker de maturitate) cu CD117 (marker prezent de obicei pe elemente tinere) și expresia de antigene specifice pentru alte linii: CD19, CD7 sau CD56.

Limfoblaștii pot exprima în mod aberant antigene mieloid, limfoblaștii B exprimă uneori CD20, iar limfoblaștii de linie T exprimă uneori markeri asincroni.

Pentru fiecare caz în parte este importantă stabilirea la diagnostic a imunofenotipului asociat leucemiei. Acesta poate fi util ulterior pentru urmărirea în dinamică și pentru diagnosticul de boală minimă reziduală, cu specificația că imunofenotipul blaștilor poate suferi modificări pe parcursul evoluției sau post-terapie.

Diagnosticul de **leucemie acută cu fenotip mixt** se stabilește pornind de la imunofenotipare. Scorul EGIL atribuie valori de 2, 1, 0.5 puncte pentru markerii de linie B, T și mioizi (Tabelul 5). Scorul peste 2 pentru două din linii definește LA bifenotipică. Clasificarea OMS 2008 redefinește criteriile pentru LA de linie ambiguă, incluzând LA bifenotipice și biliniale în această categorie.

LA cu fenotip mixt sunt clasificate în continuare în funcție de anomalii citogenetice recurente întâlnite la acest grup.

Rolul citogeneticii în LA

Anomalii citogenetice clonale, atât numerice cât și structurale, se întâlnesc la 60-80%

- classification into prognostic classes- cytogenetic changes were found to be significant independent prognostic factor, with different recommendations regarding the usefulness and right moment for bone marrow transplantation;
- a better understanding of the leukemogenesis with achievements and promises regarding drug therapy.

In practice, **standard cytogenetic analysis of chromosome G banding** is still the most used method to detect many rearrangements in the leukemic clone. It is a laborious method, performed by trained personnel, requires the presence of dividing cells in the analysis sample, examines a small number of metaphases and leaves no evidence of submicroscopic mutations.

Molecular biology techniques currently used in the diagnosis and classification of LA are **fluorescent in situ hybridization (FISH)** and **polymerase chain reaction (PCR)** used for:

- clonality demonstration (e.g. TCR - T cell receptor – rearrangements);
- identification of cryptic mutations in classic cytogenetics, i.e. mutations involving small fragments;
- explaining complex karyotypes.

These investigations are guided by clinical, morphological and cytogenetic aspects. Molecular biology finds its practical application in AL, when contributing to diagnosis (see *AL with recurrent cytogenetic abnormalities*), or documents a significant abnormality in terms of prognosis.

PCR technique also tends to find its place in the definition of complete remission and minimal residual disease for many types of rearrangements, provided the methods used are standardized.

Fluorescent in situ hybridization (Fluorescent in Situ Hybridization) combines the advantages of standard cytogenetic analysis with molecular techniques. It allows identification of clonal rearrangements in metaphase and interphase nuclei and analyzes more cells than conventional cytogenetics.

Recommended PCR techniques use RNA as target and synthesize by reverse-transcription a DNA copy subsequently amplified

din LAM și respectiv la 80% din LAL.

Identificarea modificărilor genetice din LA, la nivelul cariotipului și la nivel molecular, a permis:

- încadrarea LA în clase de risc - modificările citogenetice s-au dovedit a fi factor prognostic major și independent, cu recomandări diferite în ceea ce privește utilitatea și momentul optim al transplantului medular;
- o mai bună înțelegere a fenomenului leucemogenezei cu perspective în ceea ce privește terapiile medicamentoase.

În practică, **analiza citogenetică standard cu bandare G a cromozomilor** este încă metoda cea mai utilizată pentru a detecta cât mai multe dintre rearanjamentele de la nivelul clonei leucemice. Această tehnică necesită prezența de celule în diviziune în proba de analizat, analizează un număr mic de metafaze și nu permite evidențierea mutațiilor submicroscopice.

Tehnicile de biologie moleculară utilizate în prezent pentru diagnosticul și clasificarea LA sunt **hibridizarea fluorescentă in situ (FISH)** și **reacția de polimerizare în lanț (PCR)**. Acestea se utilizează pentru:

- demonstrarea clonalității (de exemplu rearanjamente TCR – T cell receptor);
- identificarea mutațiilor criptice, adică acele mutații care implică fragmente mici, submicroscopice;
- descifrarea cariotipurilor complexe.

Conducerea acestor investigații este orientată de aspecte clinice, morfologice, citogenetice. Rolul biologiei moleculare este de a contribui la diagnostic (vezi LA cu anomalii citogenetice recurente) și de a demonstra prezența unor anomalii importante din punct de vedere prognostic.

De asemenea, se tinde ca tehnica PCR să își găsească locul în definirea noțiunilor de remisiune completă și boală minimă reziduală pentru cât mai multe tipuri de rearanjamente, cu condiția standardizării metodelor utilizate.

Hibridizarea fluorescentă in situ combină avantajele analizei citogenetice standard cu tehnicile moleculare. Aceasta permite vizualizarea rearanjamentelor pe celule în metafază și în interfază și analiza unui număr mai mare de celule decât citogenetica clasică.

Table 6 – Cytogenetic prognosis classes in AML

Favorable	Inv (16) , t(16;16)(p13;q22), del(16q)
	t(8;21)(q22;q22) t(15;17)
Intermediate	Abnormalities of 11q 23 ex. t(11 ;19)(q23 ;p13.1) +8, +21, +22, +11,+13, +6
	t(6;9) del(5q), del(7q), del(9q), del(11q), del(12p), del(20q) -7, -y
Unfavorable	-5, -7 t(v;11)(v;q23)
	Inv(3), t(3 ;3) Complex karyotype (>= 3 unrelated abnormalities) t(6 ;9), t(6 ;11), t(11 ;19)

(RT-PCR). DNA is recommended as target only when break points are located nearby, on a short fragment of DNA.

Important genetic rearrangements in AML

Translocation (15;17)(q22;q21) is always associated with APL, a subtype of AML with clinical and morphological distinctive characters. The fusion product of the PML gene on chromosome 15 with RAR-alpha gene on chromosome 17 triggers a pathway to block granulocytic maturation at the promyelocytic stage. This is a pathogenetic mechanism on which the therapy with ATRA (All Trans Retinoic Acid) specifically acts. No other AML has a therapeutic response to ATRA. There are molecular variants of APL which do not respond to ATRA therapy.

AML with rearrangements involving CBF (Core binding factor)

t(8;21)(q22;q22) leads to the fusion gene of AML1 (CBF-alpha) gene on chromosome 21 with the ETO (eight twenty one) on chromosome 8. 90% are AML-M2 with Auer rods, dysgranulopoiesis, eosinophils in large numbers in bone marrow, and favorable response to repeated cycles of high dose cytarabine.

Inv (16) or t(16;16)(p13;q22) (CBF-beta-MYH11) have M4Eo morphology with high percentage of immature eosinophils with primary (basophilic) granules and a favorable prognosis.

Tehnicile preferate de PCR sunt cele care utilizează ARN-ul ca țintă și sintetizează sub acțiunea revers-transcriptazei (RT) o copie de ADN, care ulterior se amplifică (RT-PCR). ADN este recomandat ca țintă doar pentru situațiile în care punctele de ruptură sunt situate în apropiere, pe un fragment scurt de ADN.

Rearanjamente genetice importante în LAM

Translocția (15;17)(q22;q21) se asociază întotdeauna cu LAP, subtip de LAM cu caractere clinice și morfologice distincte. Produsul de fuziune a genei PML de pe cromozomul 15 cu gena RAR-α de pe cromozomul 17 declanșează o cale de blocare a maturăției pe linia granulocitară la nivel de promielocit, mecanism patogenic asupra căruia acționează în mod specific terapia cu ATRA (all trans retinoic acid). Nici o altă LAM nu beneficiază de această terapie. Există variante moleculare de LAP care nu răspund la terapia cu ATRA.

LAM cu rearanjamente ce implică CBF (Core binding factor)

t(8;21)(q22;q22) se soldează cu fuziunea genei AML1(CBF-α) de pe cromozomul 21 cu gena ETO (eight twenty one) de pe cromozomul 8. O proporție importantă (90%) sunt LAM-M2 cu corpi Auer, disgranulopoieză, eozinofile în număr mare în măduvă, și răspuns favorabil la cicluri repetate cu citarabină în doză mare.

AML with 11q23 abnormalities involving the MLL gene: the most common is **t(9;11)(q23;q23) (MLL-AF9)**, often with monoblastic morphology and unfavorable prognosis. Mutations are cryptic for classical cytogenetics and are identified by RT-PCR or FISH.

Other common cytogenetic abnormalities in AML are trisomy 8, monosomy 5, 7, del(5q), del(7q); there are also AML with normal karyotype and AML with complex karyotype.

Cytogenetic abnormalities in LAL

The most common cytogenetic abnormality in precursor B ALL is hyperdiploidy with 50 chromosomes, most frequently encountered in patients of 2-10 years of age, associated with low or intermediate number of blasts in peripheral blood. An additional copy of chromosomes 4 and/or 10 is frequently encountered. ALL with 50 chromosomes hyperdiploidy has a very good therapeutic response.

Structural cytogenetic changes in B ALL have an intermediate to unfavorable prognosis. An exception is **t(12;21)(p12;q22)**, which is usually not showed by classical cytogenetics. It requires FISH or PCR for identification and has a favorable prognosis.

Patients with precursor B ALL with **t(9;22)(q24;q11)** or abnormalities on 11q23- most commonly **t(4;11)(q21;q23)**, have unfavorable prognosis.

Strategy for genetic investigation of acute leukemia may vary, but always involves a cytogenetic analysis at onset, followed if necessary by molecular biology studies, for example:

- for ALL B cases in children one should seek cryptic translocation **t(12;21)(p13;q22) ETV6-RUNX1** bu using FISH or PCR;
- cases of AML with morphology suggestive for **inv(16)** or **t(16;16)(p13.1;q22)** should be confirmed by genetic analysis;
- in cases of Burkitt's lymphoma, in which MYC gene translocation from chromosome 8 to chromosome 14 specifically occurs, the PCR technique is not recommended due to the

LA cu inv (16) sau t(16;16)(p13;q22) (CBF-β - MYH11) au morfologie M4Eo cu procent mare de eozinofile imature cu granulații primare (bazofile) și prognostic favorabil.

LAM cu anomalii 11q23 cu implicarea genei MLL

Cea mai frecventă este **t(9;11)(q23;q23) (MLL-AF9)**, deseori cu morfologie monoblastică și prognostic defavorabil. Mutațiile sunt criptice și se identifică prin RT-PCR sau FISH.

Alte anomalii citogenetice întâlnite în LAM sunt trisomia 8, monosomia 5, 7, del(5q), del(7q); se descriu de asemenea LAM cu cariotip normal sau complex.

Anomalii citogenetice în LAL

Cea mai comună anomalie citogenetică în LAL precursor B este **hiperdiploidia** cu 50 de cromozomi. Întâlnită cel mai frecvent la pacienți de 2-10 ani, se asociază cu număr mic sau intermediar de blaști în sângele periferic. Frecvent se întâlnește o copie în plus pentru cromozomii 4 și/sau 10. LAL cu hiperdiploidie cu 50 de cromozomi au răspuns terapeutic foarte bun.

Modificările citogenetice structurale în LAL B au prognostic intermediar sau defavorabil. O excepție o reprezintă **t(12;21)(p12;q22)** care nu este evidențiable de obicei prin citogenetica clasică și trebuie identificată prin FISH sau PCR, cu prognostic favorabil.

Pacienții cu LAL precursor B cu **t(9;22)(q24; q11)** sau anomalii la nivelul 11q23 - mai frecvent translocția **t(4;11)(q21; q23)**, au prognostic defavorabil.

Strategia de investigare genetică a leucemiilor acute poate să difere, dar presupune întotdeauna o analiză citogenetică la debut, urmată, în funcție de caz, de studii de biologie moleculară, de exemplu:

- pentru cazurile de LAL B la copii se caută translocția criptică **t(12;21)(p13;q22) ETV6-RUNX1** prin FISH sau PCR;
- cazurile de LAM cu morfologie sugestivă pentru **inv(16)** sau **t(16;16)(p13.1;q22)** vor fi investigate în acest sens;

heterogeneity of break points and, as such, FISH is preferred;

- identification of specific translocations for APL in cases with uncommon morphology is essential for initiating treatment with ATRA and reduces the risk of DIC, extremely high in these cases;
- identification of BCR-ABL fusion gene (p190) with prognostic significance in ALL.

Current theory on leukemogenesis implies the existence and time sequence of at least two mutations: **class I mutation** providing survival and proliferation advantage and **class II mutation** affecting the differentiation, maturation and apoptosis.

Thus NPM1, FLT3-TKD and CEBP α are class II mutations with favorable prognosis, unless FLT3-ITD mutation is associated. The latter is a class I mutation with unfavorable prognosis.

Other mutations with unfavorable prognosis are MLL-PTD (class II), overexpression of BAALC gene (class II), ERG overexpression (class I), and WT1 mutation.

In conclusion, the diagnostic steps for LA currently involve conducting the following investigations:

- automated blood cell count and blood film morphology
- bone marrow aspiration biopsy- is absolutely necessary until the number of blasts in peripheral blood is high
- cytochemistry and immunophenotyping by flow cytometry
- cytogenetic examination in all cases, RT-PCR and FISH for selected cases.

Other laboratory investigations essential to describe the clinical-biological status of the patient at onset and in follow-up are: coagulation studies, biochemical determinations: LDH and uric acid are usually high in patients with LA, liver and kidney function assessment before starting treatment, microbiologic investigation of different biological products for appropriate antimicrobial therapy, HLA and DNA typing for potential candidates for allogenic transplant.

- pentru cazurile de limfom Burkitt, în care în mod specific se produce translocarea genei MYC de pe cromozomul 8 pe cromozomul 14, tehnica PCR nu este recomandată datorită heterogenității punctelor de ruptură și se preferă FISH;
- identificarea translocăției specifice pentru LAP în cazurile cu morfologie necaracteristică este esențială pentru inițierea tratamentului cu ATRA și reducerea riscului de CID, extrem de mare la aceste cazuri;
- identificarea genei de fuziune ABL-BCR (p190) cu importanță prognostică în LAL.

Teoria actuală a leucemogenezei presupune existența și succesiunea în timp a cel puțin două mutații: o **mutație de clasa I**, care oferă avantaj de supraviețuire și proliferare a clonei și o **mutație de clasa II**, care alterează diferențierea, maturarea și apoptoza.

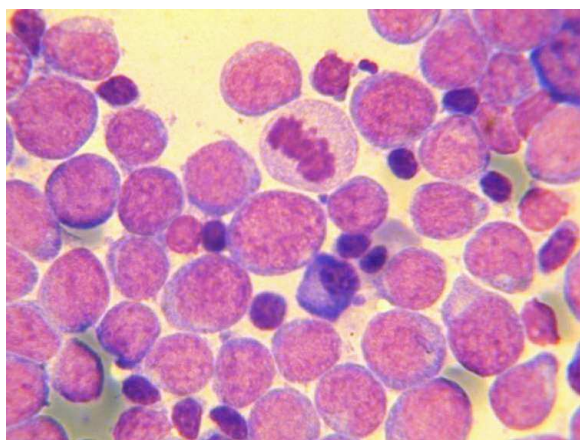
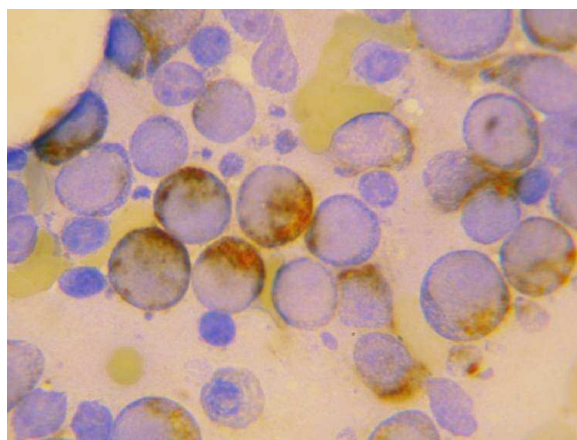
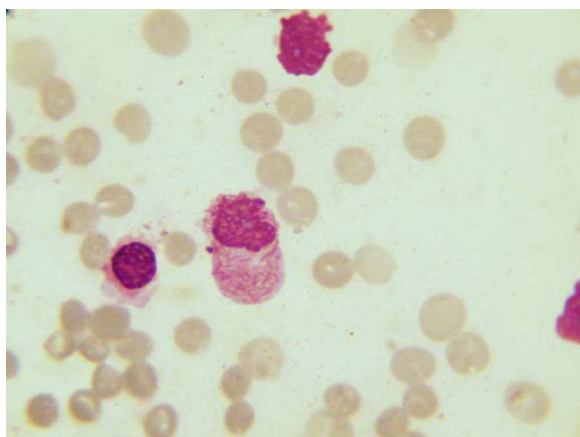
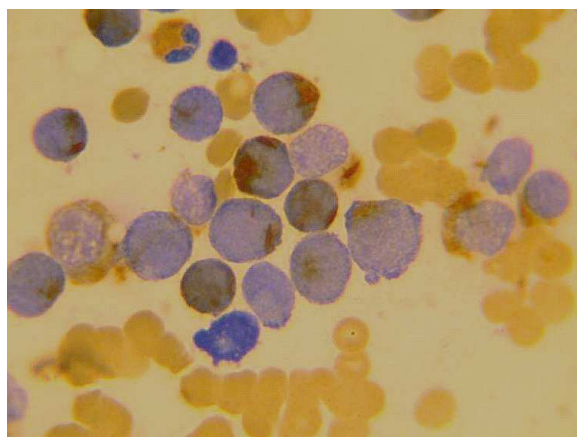
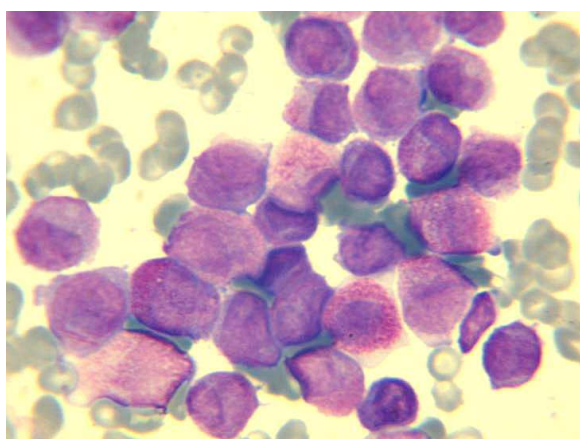
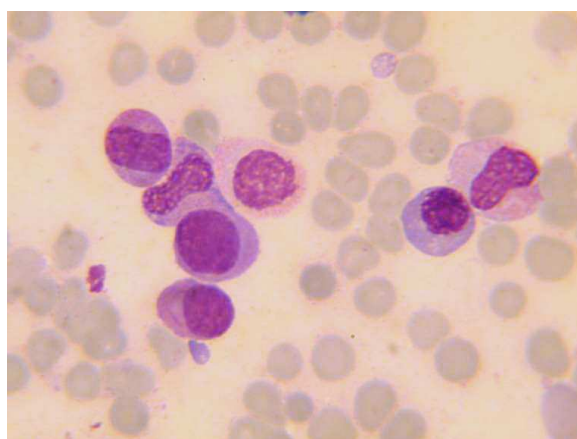
Astfel mutațiile NPM1, FLT3-TKD și CEBP - α sunt mutații de clasa II cu prognostic favorabil, cu condiția să nu se asocieze cu mutația FLT3-ITD. Aceasta din urmă este o mutație de clasă I cu prognostic defavorabil.

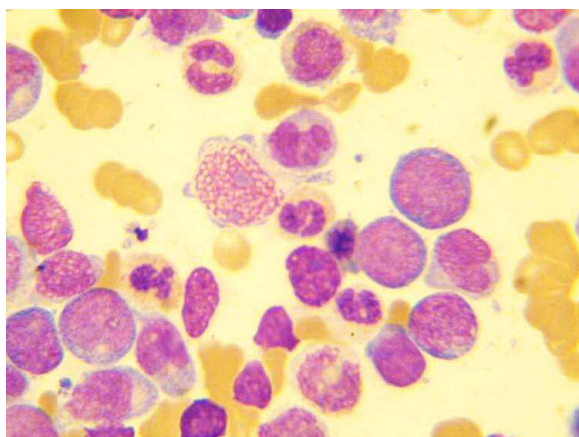
Alte mutații cu prognostic defavorabil sunt MLL-PTD (clasa II), supraexpresia genei BAALC (clasa II), supraexpresia ERG (clasa I), mutația WT1.

În concluzie, etapele de diagnostic al LA presupun în prezent efectuarea următoarelor investigații:

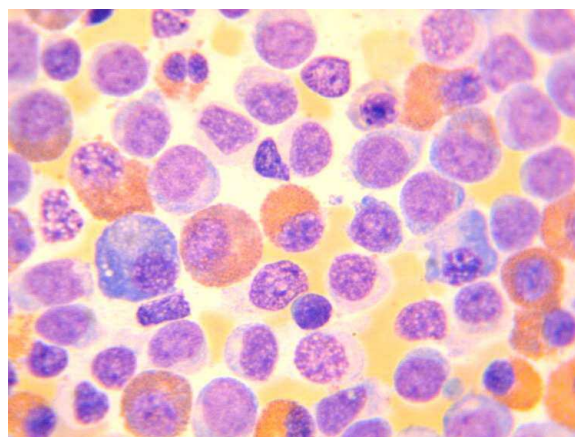
- hemograma, frotiu sanguin
- puncție - biopsie medulară - se poate renunța doar dacă numărul de blaști din sângele periferic este mare;
- citochimie sau imunofenotipare prin citometrie în flux;
- citogenetică pentru toate cazurile, RT-PCR și FISH pentru cazuri selectate.

Alte investigații indispensabile pentru conturarea tabloului clinico-biologic al bolnavului cu LA la debut și în evoluție sunt explorarea coagulării, determinări biochimice (LDH și acid uric sunt de obicei mari la pacienții cu LA), explorarea funcției hepatice și renale înainte de inițierea tratamentului, culturi din produse biologice pentru terapie antimicrobiană adecvată, tipizare HLA și ADN pentru pacienții potențiali candidați pentru transplant allogen.

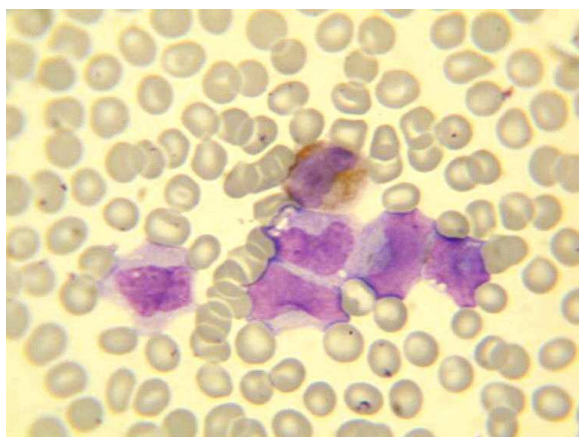
**LAM M1****LAM M1 peroxidaza****Corpi Auer****LAM M2 peroxidaza****LAM M3****LAM M3 varianta**



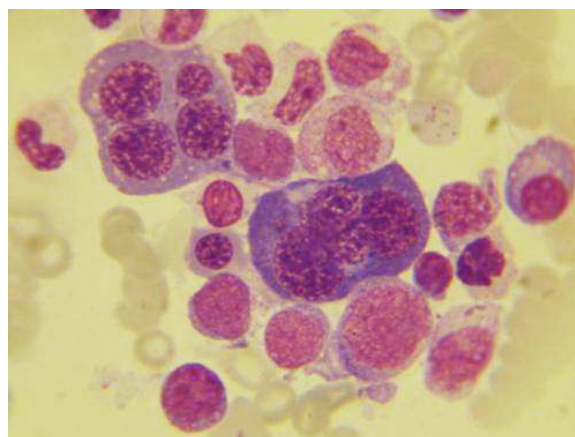
LAM M4



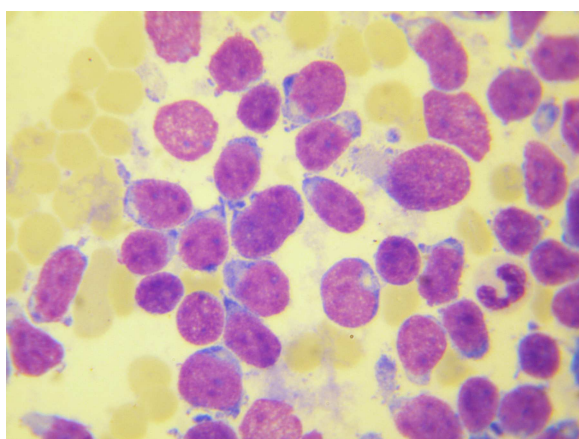
LAM M4 cu eozinofile



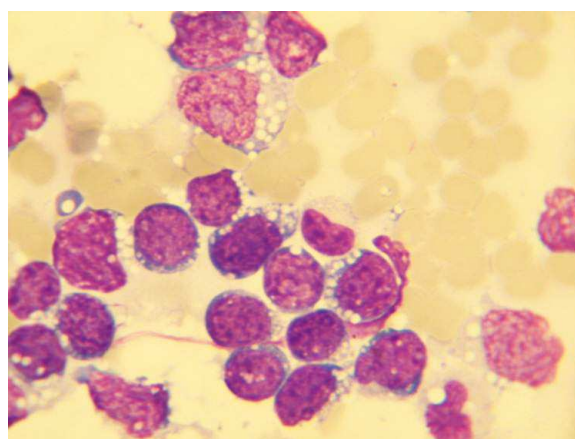
LAM M55



LAM M6



LAL 1/ LAL 2



LAL 3

Abbreviations:

ABL – BCR – Abelson - breakpoint cluster region,
 AL – acute leukemia,
 ALL – acute lymphoblastic leukemia,
 AML – acute myeloid leukemia,
 APL – acute promyelocytic leukemia,
 ATRA – all trans retinoic acid,
 BAALC – Brain and Acute Leukemia, Cytoplasmic,
 CBF – core binding factor,
 CD – cluster of differentiation,
 CEBPA – CCAAT/enhancer-binding protein,
 del – deletion,
 DIC – disseminated intravascular coagulation,
 DNA – deoxyribonucleic acid,
 EGIL – European Group for the Immunological Characterization of Leukemias,
 ERG – Ets -erythroblastosis virus E26 oncogene homolog - related gene,
 FAB – French - American - British,
 FISH – fluorescent *in situ* hybridization,
 FLT3 – FMS-like tyrosine kinase 3,
 HLA – human leukocyte antigen,
 i – inversion,
 ITD – internal tandem duplication,
 M4Eo – acute myeloid leukemia M4 with eosinophilia,
 MDS – myelodysplastic syndrome,
 MGG – May Grunwald Giemsa,
 MIC – morphology, immunophenotyping, cytogenetics,
 MLL – mixed lineage leukemia,
 MPO or POX – Myeloperoxidase,
 MYH – myosine heavy chain,
 NPM1 – nucleophosmin 1,
 PCR – polymerase chain reaction,
 PTD – partial tandem duplication,
 RNA – ribonucleic acid.
 RT-PCR – reverse transcriptase polymerase chain reaction,
 SSC – side scatter,
 t – translocation,
 TCR – T-cell receptor,
 TdT – Terminal deoxynucleotidyl transferase,
 TKD – tyrosine kinase domain,
 WHO – World Health Organization,
 WT – Wilms' tumour,

Abrevieri:

ABL-BCR – Abelson - breakpoint cluster region,
 ADN – acid dezoxiribonucleic,
 ARN – acid ribonucleic
 ATRA – all transretinoic acid,
 BAALC – Brain and Acute Leukemia, Cytoplasmic,
 CBF – core binding factor,
 CD – cluster of differentiation,
 CEBPA – CCAAT/enhancer-binding protein,
 CID – coagulare intravasculară diseminată,
 del – deleție,
 EGIL –European Group for the Immunological Characterization of Leukemias,
 ERG – Ets -erythroblastosis virus E26 oncogene homolog - related gene,
 FAB – French - American – British,
 FISH – fluorescent *in situ* hybridization,
 FLT3 – FMS-like tyrosine kinase 3,
 HLA – human leukocyte antigen,
 i – inversiune,
 ITD – internal tandem duplication,
 LA – leucemie acută,
 LAL – leucemie acută limfoblastică,
 LAM – leucemie acută mieloidă,
 LAP – leucemie acută promielocitară,
 M4Eo – leucemia acută mieloidă M4 cu eozinofile,
 MGG – May Grunwald Giemsa,
 MIC – morphology, immunophenotyping, cytogenetics,
 MLL – mixed lineage leukemia,
 MPO – mieloperoxidază,
 MYH – myosine heavy chaine,
 NPM1 – nucleophosmin 1,
 OMS – Organizatia Mondială a Sănătății,
 PCR – polymerase chain reaction,
 PTD – partial tandem duplication,
 RT-PCR – reverse transcriptase polymerase chain reaction,
 SMD – sindrom mielodisplazic,
 SSC – side scatter,
 t – translocatie,
 TCR – T-cell receptor,
 TdT – Terminal deoxynucleotidyl transferase,
 TKD – tyrosine kinase domain,
 WT – Wilm's tumour.

References

1. Pațiu M. Examenul citologic al frotiului sangvin. Editura Alma Mater, Cluj-Napoca 2009
2. Cucuianu A. Leucemiile acute. In Hematologie clinică- editor coordonator Petrov L. Casa Cărții de Știință. Cluj-Napoca 2009
3. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009 114: 937-951
4. Amy Heerema-McKenney, Arber DA. Acute Myeloid Leukemia. *Hematol Oncol Clin N Am* 23 2009: 633-654
5. Onciu M. Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematol Oncol Clin N Am* 2009 114: 937-951
6. Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, Dombret H, et al; European LeukemiaNet. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2010 115(3):453-74
7. Fiona E. Craig, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasm. *Blood* 2008 111: 3941-3967
8. Marie C. Béné. Biphenotypic, bilineal, ambiguous or mixed lineage: strange leukemias! *Haematologica* 2009 94(7): 891-893
9. Frattini MG, Maslak PG. Strategy for Incorporating Molecular and Cytogenetic Markers into Acute Myeloid Leukemia Therapy. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* 2008 6(10):995-1002

References

1. Pațiu M. – Examenul citologic al frotiului sangvin – Editura Alma Mater, Cluj- Napoca 2009
2. Cucuianu A. Leucemiile acute. In Hematologie clinică- editor coordonator Petrov L. Casa Cărții de Știință Cluj-Napoca 2009
3. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009 114: 937-951
4. Amy Heerema-McKenney, Arber DA. Acute Myeloid Leukemia. *Hematol Oncol Clin N Am* 23 2009: 633-654
5. Onciu M. Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematol Oncol Clin N Am* 23 2009 ;114: 937-951
6. Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, et al; European LeukemiaNet. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2010 Jan 21;115(3):453-74
7. Fiona E. Craig, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasm. *Blood* 2008; 111: 3941-3967
8. Marie C. Béné. Biphenotypic, bilineal, ambiguous or mixed lineage: strange leukemias! *Haematologica*;2009; 94(7) : 891-893
9. Frattini MG, Maslak PG. Strategy for Incorporating Molecular and Cytogenetic Markers into Acute Myeloid Leukemia Therapy. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* 2008 6(10):995-1002