

Tecniche di laboratorio di ematologia

Prof. Gian Matteo Rigolin
Ematologia

**7. Diagnostica dei
disordini leucemici**

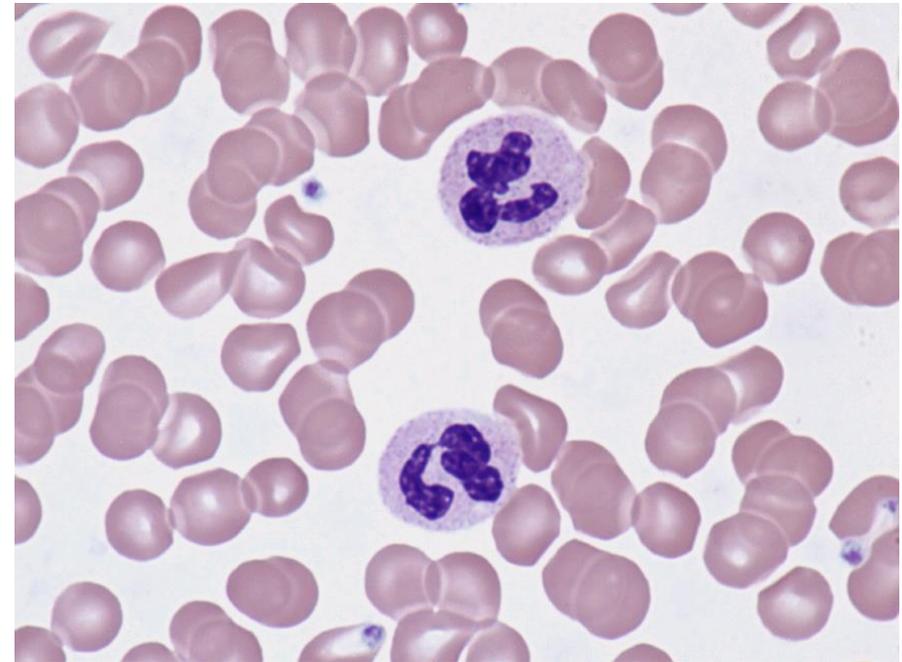


Table 4. Tests/procedures for a patient with AML

For a patient with AML

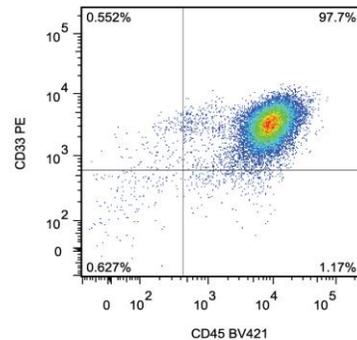
Tests to establish the diagnosis	Additional tests/procedures at diagnosis (cont'd)
Complete blood count and differential count	Analysis of comorbidities
Bone marrow aspirate	Biochemistry, coagulation tests, urine analysis**
Bone marrow trephine biopsy*	Serum pregnancy test††
Immunophenotyping	Information on oocyte and sperm cryopreservation‡‡
Genetic analyses	Eligibility assessment for allogeneic HCT (including HLA typing) ^a
Cytogenetics†	Hepatitis A, B, C; HIV-1 testing
Screening for gene mutations including‡	Chest radiograph, 12-lead electrocardiogram, and echocardiography or MUGA (on indication)
<i>NPM1, CEBPA, RUNX1, FLT3, TP53, ASXL1</i>	Lumbar puncture ^b
Screening for gene rearrangements§	Biobanking ^c
<i>PML-RARA, CBFB-MYH11, RUNX1-RUNX1T1, BCR-ABL1</i> , other fusion genes (if available)	Sensitive assessment of response by RT-qPCR or MFC^d
Additional tests/procedures at diagnosis	RT-qPCR ^{e,f} for <i>NPM1</i> mutation, <i>CBFB-MYH11</i> , <i>RUNX1-RUNX1T1</i> , <i>BCR-ABL1</i> , other fusion genes (if available) ^d
Demographics and medical history	MFC ^{f,g}
Detailed family history¶	
Patient bleeding history#	
Performance status (ECOG/WHO score)	

Integrated AML Diagnosis

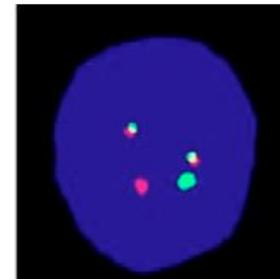
Morphology



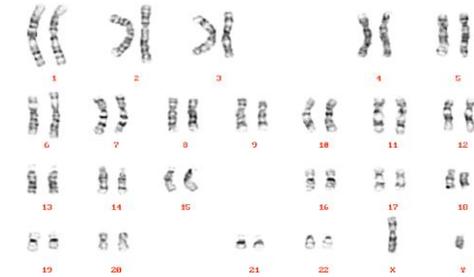
Flow Cytometry



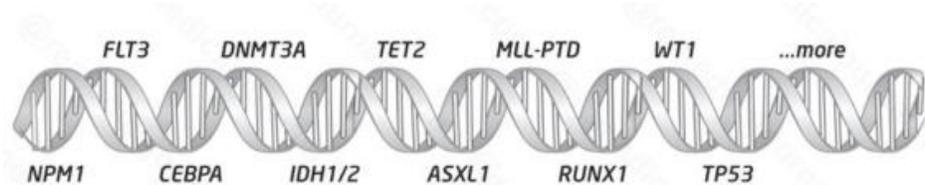
FISH



Cytogenetics

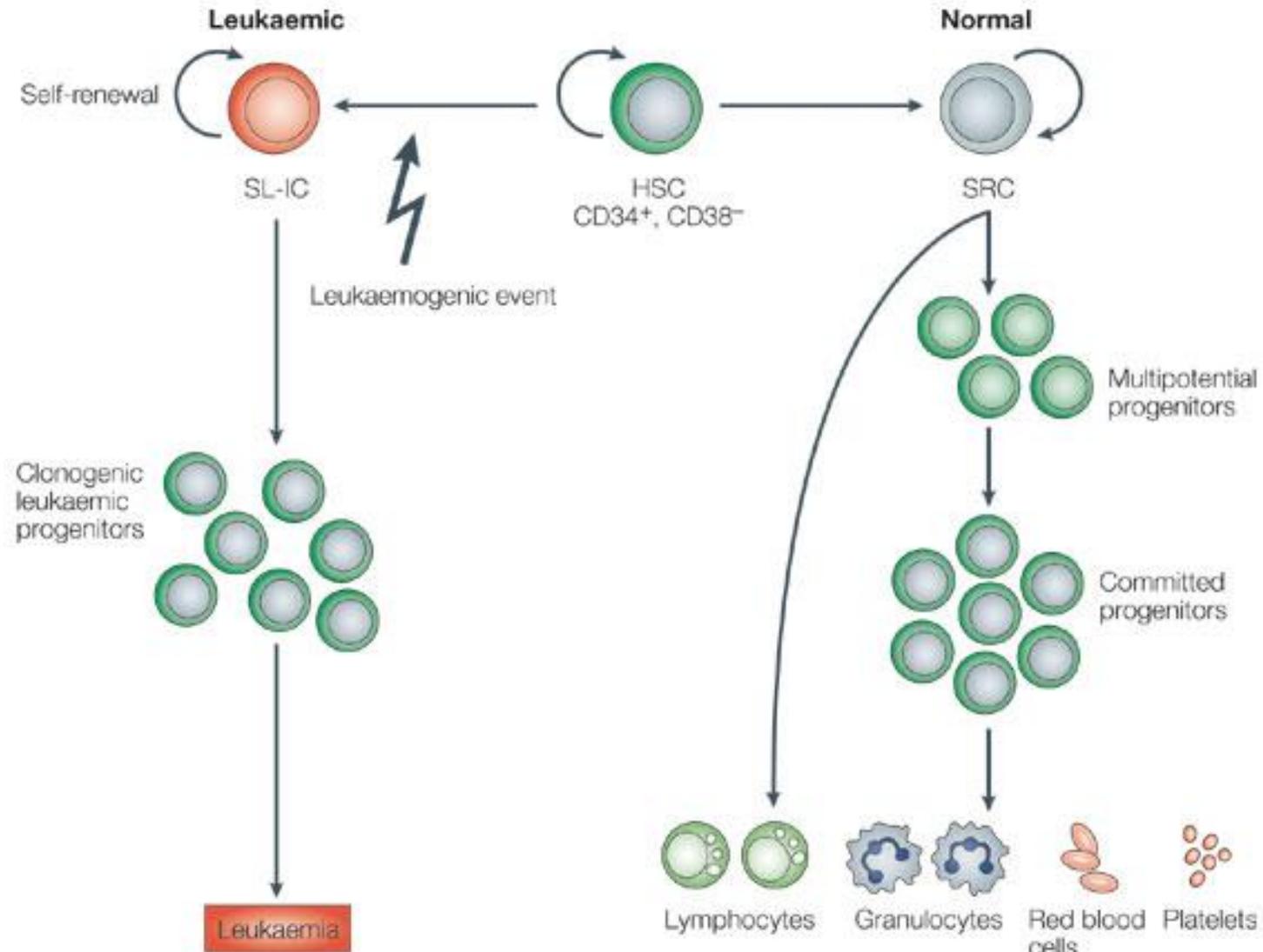


Mutation Profiling



- Risk stratification
- Drug discovery/therapeutics
- MRD monitoring

Leucemia mieloide aguda

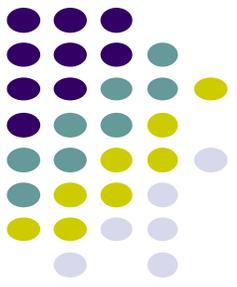




Diagnosi di LAM

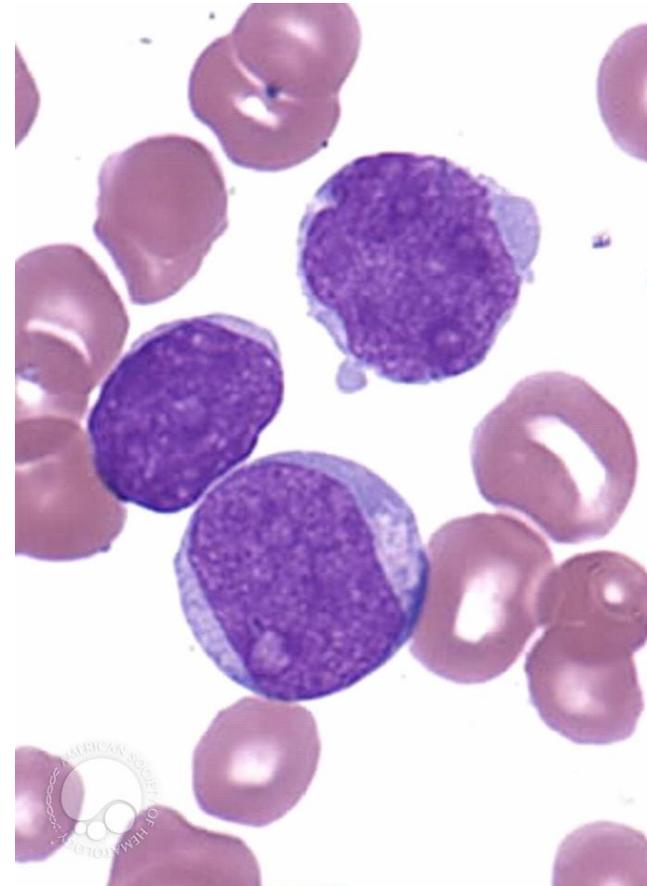
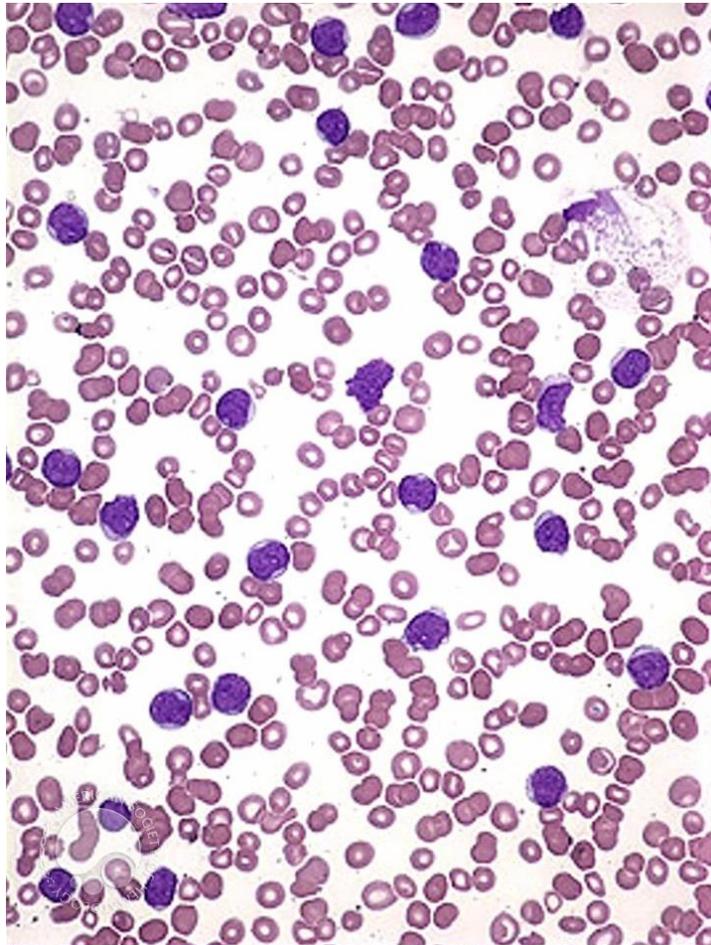
- La dimostrazione di un accumulo di blasti a livello midollare a causa di un blocco differenziativo è la principale caratteristica richiesta per la diagnosi di LAM.
- La diagnosi di LAM nella classificazione FAB, basata sulla citomorfologia e la citochimica, veniva posta in presenza di una percentuale di blasti midollari maggiore del 30%.
- L'attuale classificazione WHO ha abbassato il livello di blasti per la diagnosi di LAM al 20% includendo pertanto molti casi che precedentemente erano stati classificati come MDS.

Campioni richiesti

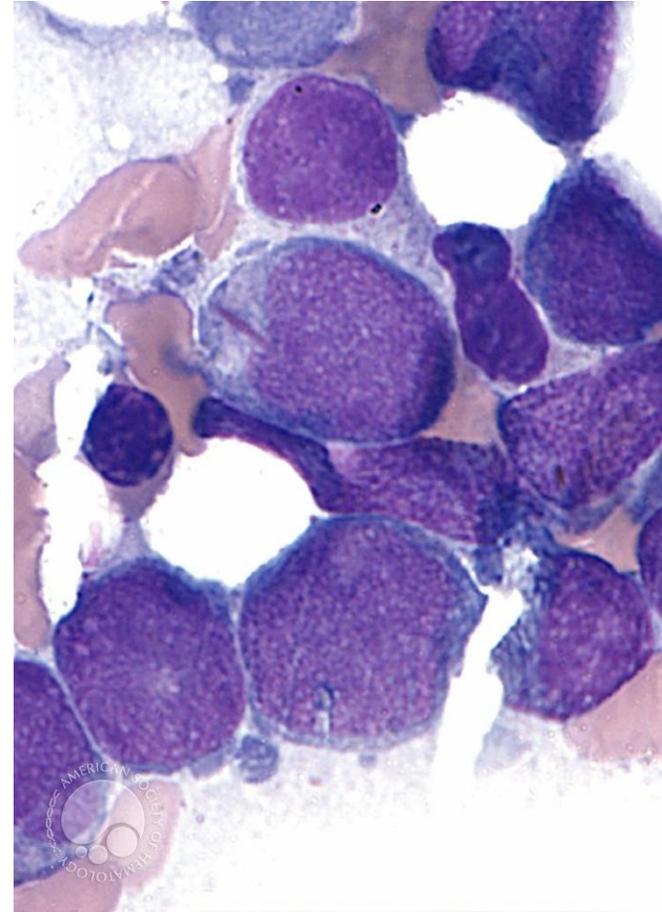
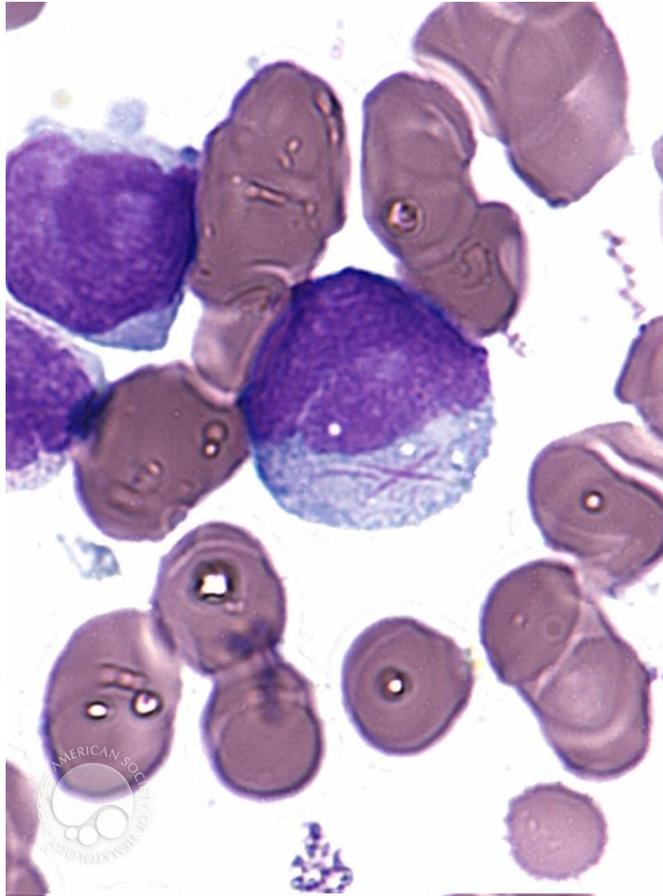


- Per poter porre diagnosi di LAM la WHO suggerisce di analizzare i seguenti materiali biologici:
 - un campione di sangue periferico e di aspirato midollare cellulato per la valutazione morfologica con colorazione di May Grumwald Giemsa o similari.
 - una biopsia ossea di almeno 1,5 cm di lunghezza ove indicato.
 - campioni di sangue midollare per lo studio citogenetico, citofluorimetrico, e molecolare da condurre in base alle informazioni fornite dai dati clinici, morfologici, immunofenotipici e citogenetici.

LAM: sangue periferico



LAM: corpi di Auer



Valutazione dei blasti



- La determinazione della % di blasti nel SP e BM viene fatta mediante **valutazione visiva**.
 - La % di blasti deve essere definita valutando, se possibile, 200 cellule nello striscio di SP e 500 cellule nucleate nell'aspirato midollare.
 - Devono essere conteggiati come blasti i mieloblasti, i monoblasti, i promonociti, i megacarioblasti (ma non i megacariociti displastici); i promielociti anomali sono da considerarsi come “blasti equivalenti” nella leucemia acuta promielocitica.
 - I proeritroblasti non devono essere considerati blasti tranne che nella eritroleucemia acuta “pura”.
- **La valutazione citofluorimetrica del CD34 non deve essere considerate come un sostituto del conteggio visivo dei blasti in quanto non tutti i blasti esprimono il CD34.**
- Se l'aspirato midollare è povero e/o se è presente fibrosi midollare è necessario effettuare una valutazione immunohistochimica sulla biopsia ossea per il CD34 perché in questi casi i blasti sono CD34+.

blasti e promielociti

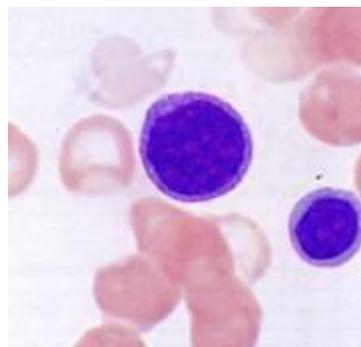


Aspetti cellulari	Blasto non granulato	Blasto granulato	Promielocito normale	Promielocito displastico
Nucleo	Centrale di forma variabile	Centrale di forma variabile	Ovale, rotondo, indentato Centrale od eccentrico	Ovale, rotondo, indentato in posizione eccentrica
Cromatina	fine	fine	Fine od intermedia	Fine o grossolana
Nucleolo	1-2	1.2	Ben riconoscibile	Ben visibile
Zona Golgi	Non evidente	Non evidente	Ben visibile	Presente ma poco sviluppata
Granuli	Non visibili	Presenti (talora corpi di Auer)	Azzurrofilo uniformemente dispersi	irregolare presenza e distribuzione
Citoplasmaa	basofilo	basofilo	basofilo	Basofilia ridotta ed irregolare

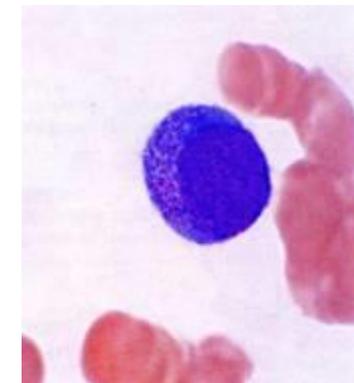
Blasto non granulato



Blasti granulati



promielocito



COLORAZIONI SPECIALI

- Le colorazioni speciali sono di 2 categorie:
 1. **Citochimiche** che usano reazioni enzimatiche della cellula per la colorazione
 2. **Immunocitochimiche** che colorano specifici epitopi cellulari con anticorpi monoclonali.
- Queste colorazioni sono molto utili per la diagnosi e caratterizzazione delle neoplasie ematologiche.

COLORAZIONI CITOCHIMICHE

- Le colorazioni citochimiche sono utili nella classificazione delle leucemie acute
- Esse permettono una corretta classificazione delle leucemie acute mieloidi rispetto a quelle linfoidi e la subclassificazione delle leucemie acute mieloidi secondo la classificazione FAB (Franco-Americana-Britannica) e/o WHO (World Health Organization).
- Le colorazioni citochimiche possono essere effettuate su sangue periferico e midollare.

MIELOPEROSSIDASI (MPO)

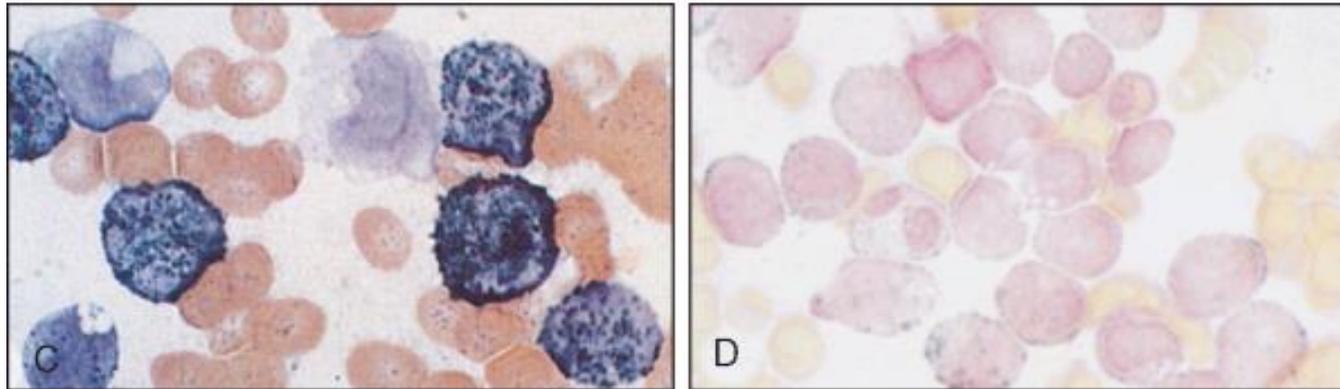
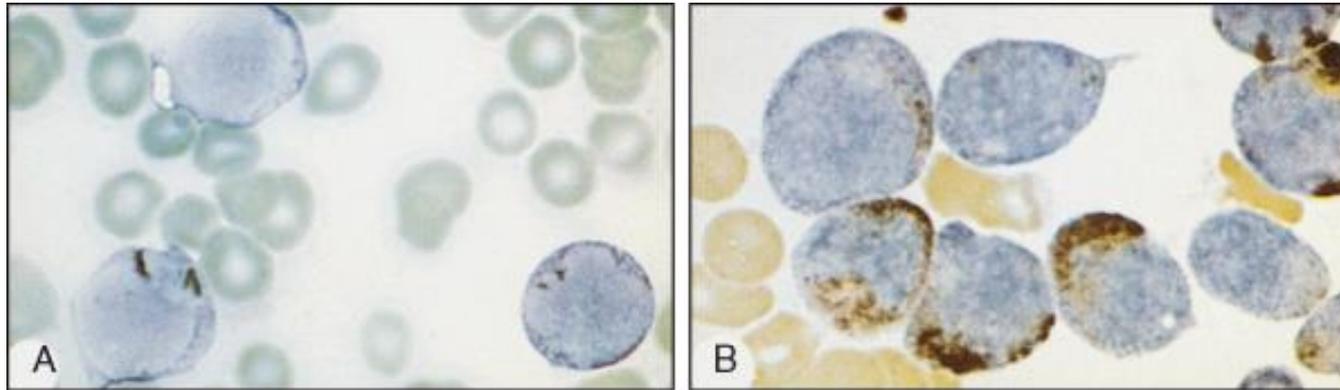
- **I granuli primari dei neutrofili e quelli secondari degli eosinofili contengono la MPO**
- I lisosomi dei monociti sono debolmente positivi.
- I linfociti e i GR sono privi di MPO.
- Originariamente la colorazione dipendeva dalla ossidazione della benzidina dal perossido di idrogeno; tuttavia poiché la benzidina è un carcinogeno, altri substrati sono possibili 3-amino-9-ethylcarbazole o 4-chloro-1-naphthol, che sono ossidati dalla MPO a formare un precipitato brunastro nelle cellule che contengono MPO.
- **La MPO è un enzima sensibile alla luce ed i vetrini dovrebbero essere colorati immediatamente o conservati al buio.**
- L'attività enzimatica diminuisce nelle cellule nel tempo e quindi non dovrebbe essere effettuata su vetrini più vecchi di 3 settimane.
- La MPO è sensibile al caldo ed al metanolo.
- Le cellule eritroidi possono colorarsi per la MPO dopo trattamento con metanolo per una interazione non enzimatica tra i reagenti della colorazione e l'Hb (*pseudoperossidasi* o *Lepehne reaction*).

SUDAN BLACK B

- Il Sudan black B colora i fosfolipidi intracellulari ed altri.
- Il pattern di colorazione è analogo alla MPO con una colorazione positiva per le cellule granulocitarie e gli eosinofili, debole colorazione per i monociti, e negatività per i linfociti, sebbene una positività può essere presente nei granuli azzurrofilari dei linfoblasti.
- Il Sudan black B ha il vantaggio rispetto alla MPO che può essere usata in preparati vecchi di sangue e midollo e che schiarisce poco nel tempo.

Leucemia mieloide aguda

(A, B) LAM M2, Sudan B Black



(C) LAM M4 Sudan B Black

(D) LAM M2, MPO

ESTERASI SPECIFICA (NAPHTHOL AS-D CHLOROACETATE)

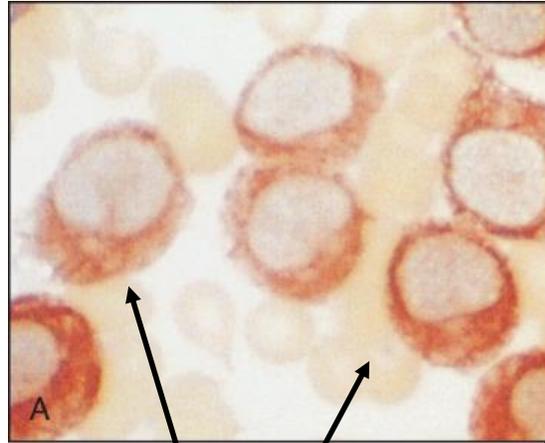
- **L'esterasi specifica (naphthol AS-D chloroacetate), è usata per identificare le cellule della serie granulocitaria.**
- **Non colora i linfociti, ed i monociti.**
- Grazie alla sua stabilità nei tessuto fissati ed inclusi in paraffina, è molto utile per identificare le cellule della serie granulocitaria e le mast cells nei tessuti.
 - È pertanto utile per identificare i tumori mieloidi extramidollari (sarcoma granulocitario e cloroma) costituiti da blasti.
- L'enzima esterasi nelle cellule idrolizza il substrato naphthol AS-D chloroacetate.
- Il prodotto di questa reazione è quindi è quindi accoppiato con un sale (dialzo salt) per formare un composto rosso-rosato nei siti di attività enzimatica.
- L'enzima è inibito dalla presenza di mercurio, soluzioni acide, calore e iodio producendo così risultati falsamente positivi.

ESTERASI NONSPECIFICHE (ALPHA-NAPHTHYL BUTYRATE OR ALPHA-NAPHTHYL ACETATE)

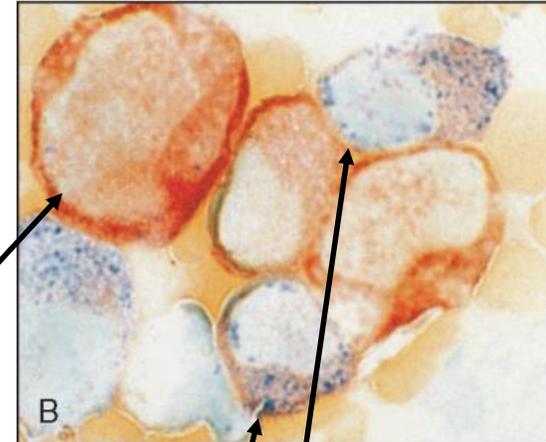
- **Le esterasi non specifiche (alpha-naphthyl butyrate or alpha-naphthyl acetate) sono usate per identificare le cellule monocitarie in cui la reazione è NaF inibibile.**
- I linfociti T maturi si colorano caratteristicamente a spot.
- Oltre ai monociti, la colorazione reagisce anche con macrofagi, istiociti, megacariociti, ed alcuni carcinomi.
- L'alpha-naphthyl butyrate è considerata più specifica, ma un po' meno sensibile della alpha-naphthyl acetate.
- I megacarioblasti non si colorano con l'alpha-naphthyl butyrate ma con l'alpha-naphthyl acetate.

esterasi

LAM M5



MONOBLASTI
esterasi non specifica positivi



MIELOBLASTI
esterasi specifica positivi

LAM M4

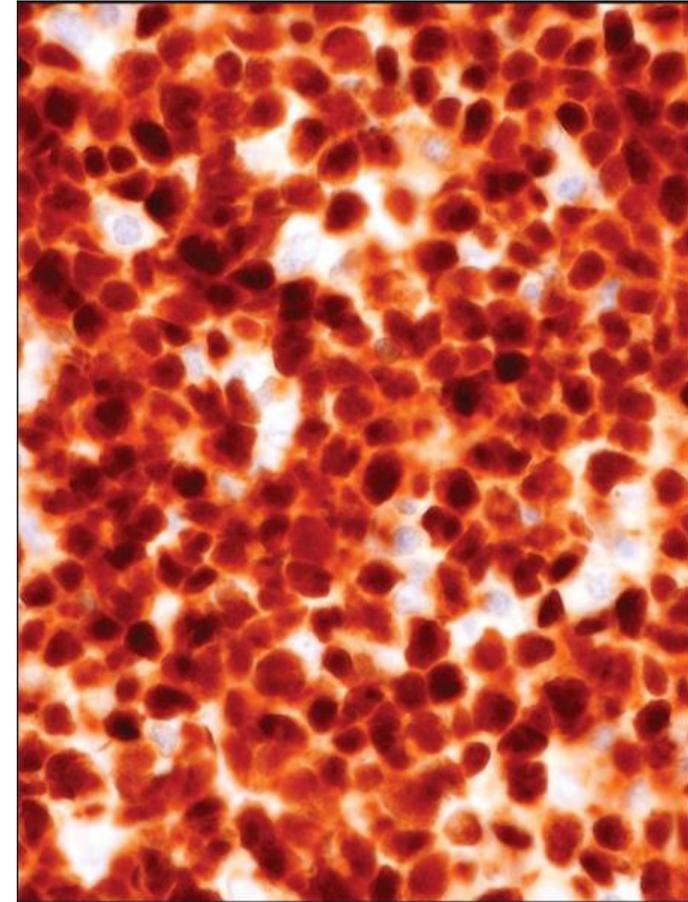
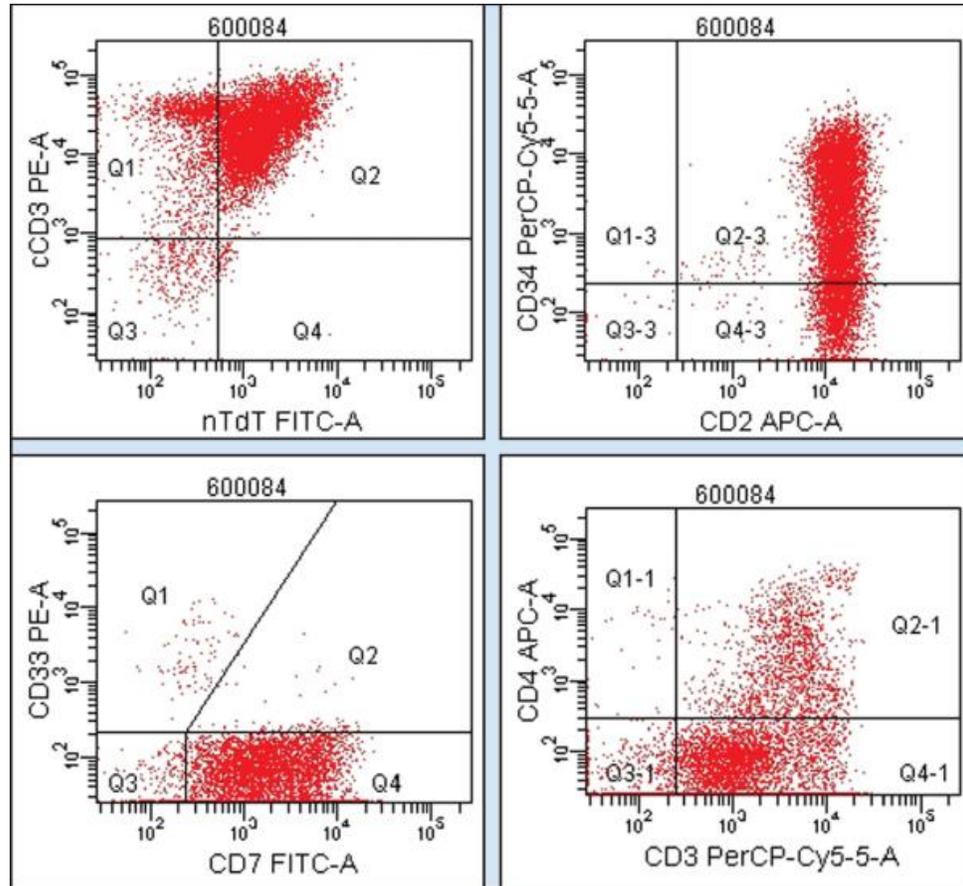
Leucemie acute: citochimica

	TALL	BALL	AML M1-M3	AML M4-M5	AML M6-M7
MPO	-	-	+ / +++	+	-
Sudan B Black	-	-	+ / +++	+	-
Esterasi non specifiche	-	-	-	++ (NaF inibibile)	+
Esterasi specifiche	-	-	+	+ (mieloidi) - (mono)	-
PAS	-	+ a granuli	+ / -	+	+
Fosfatasi Acida	+ focale	-	-	+ diffuso	+ focale

TERMINAL DEOXYNUCLEOTIDYL TRANSFERASE (TdT)

- La TdT (Terminal deoxynucleotidyl transferase) è un enzima intranucleare che catalizza l'aggiunta del deoxynucleotide trifosfato al parte terminale 3'-hydroxyl degli oligonucleotidi o polideossinucleotidi.
- La TdT si trova normalmente nel nucleo dei timociti e delle cellule linfoide immature nel midollo ma non è presente nei linfociti maturi.
- **È pertanto un marcatore utile nelle identificazione delle leucemie linfoblastiche ed in alcune leucemie mielodi acute.**
- La TdT può essere determinata con **tecnica biochimica** con colorazione citochimica con **tecnica di immunofluorescenza**, o mediante **citometria a flusso**, o **metodica immunoistochimica**.
- La tecnica di immunofluorescenza indiretta è molto sensibile e può essere utilizzata su campioni seccati all'aria dopo diverse settimane.
- Metodiche immunoistochimiche possono essere utilizzate su campioni congelati e su sezioni di tessuto paraffinato.

TdT

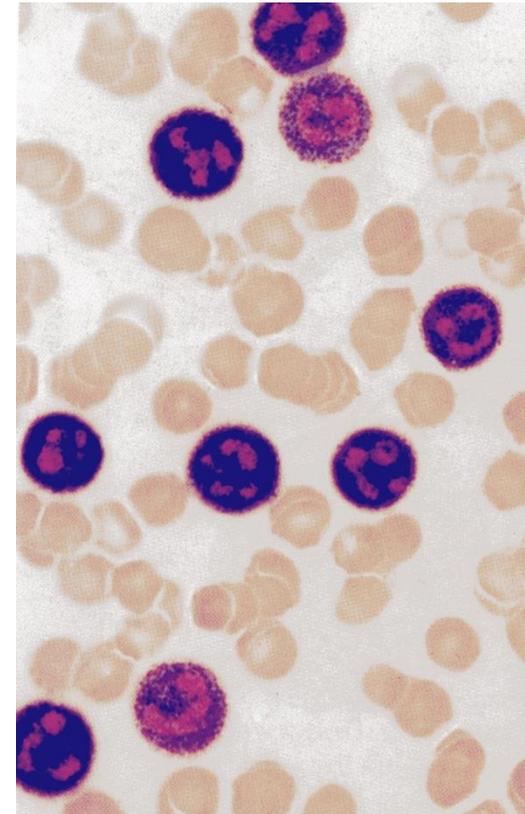
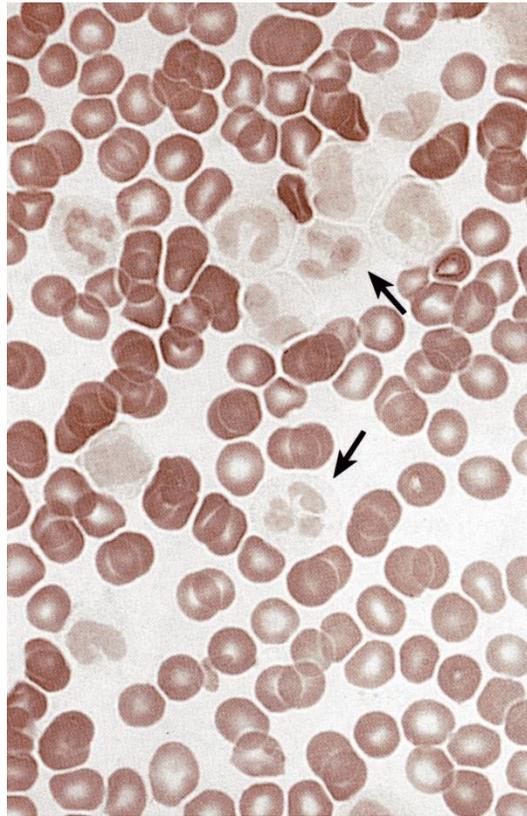


FOSFATASI ALCALINA LEUCOCITARIA (FAL)

- La FAL si trova nel citoplasma dei neutrofili, degli osteoblasti, delle cellule endoteliali vascolari, e in alcuni linfociti.
- I livelli di FAL nei neutrofili di sangue periferico sono quantificati mediante uno score che viene utilizzato per differenziare la leucemia mieloide cronica dalle reazioni leucemoidi e dagli altri disordini mieloproliferativi cronici.
- I pazienti con CML hanno score bassi.
- Nei campioni con EDTA c'è una rapida perdita di FAL.
- Il test è viene meglio effettuato su sangue fresco capillare o su sangue in eparina ed entro 48 ore.
- Gli strisci di sangue possono essere conservati in freezer per 2 - 3 settimane con poca perdita di attività.

CML: fosfatasi alcalina leucocitaria

Leucemia
mieloide
cronica



Policitemia
vera

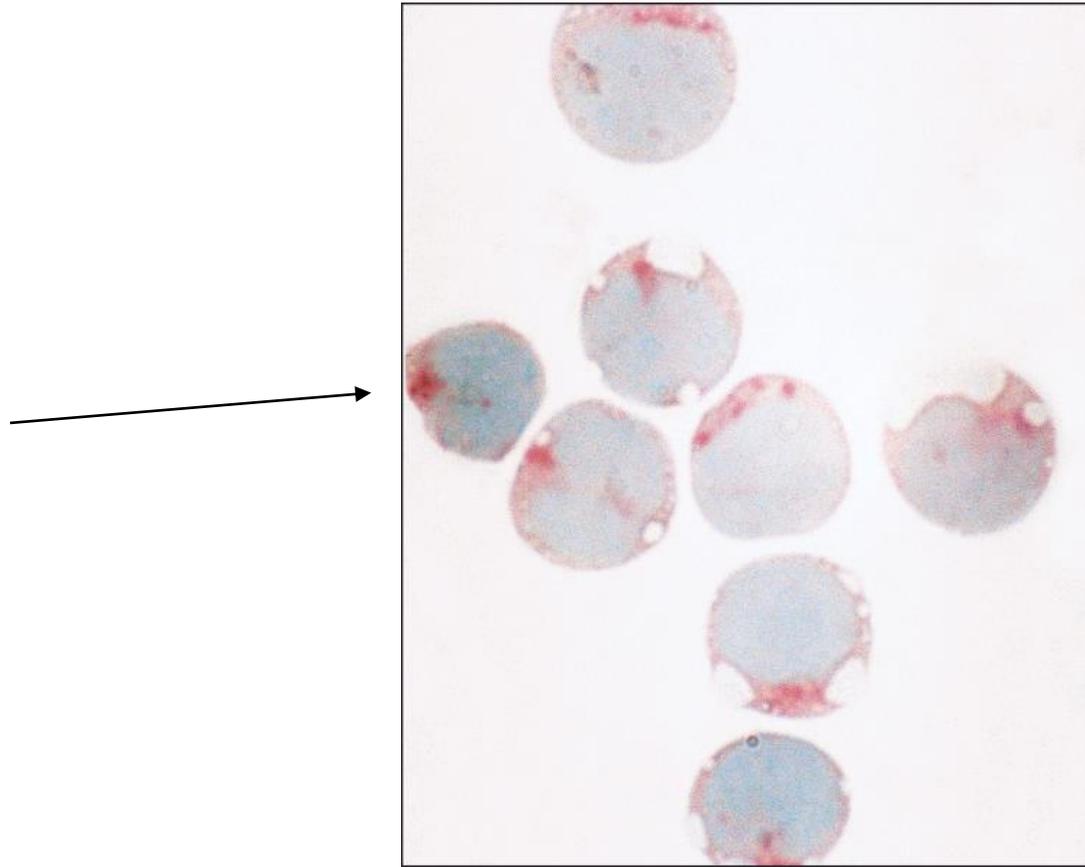
Condizioni Associate con anomali livelli di fosfatasi alcalina leucocitaria

Bassi livelli di FAL
Leucemia mieloide cronica
emoglobinuria parossistica notturna
neoplasie ematologiche (rare)
sindromi mielodisplastiche
infezioni (rare) od esposizione a tossici
Alti livelli di FAL
Infezioni
terapia con fattori di crescita
sindromi mieloproliferative croniche non LMC
quadr infiammatori
Gravidanza, contraccettivi orali
Stress
Farmaci (litio, corticosteroidi, estrogeni)

Fosfatasi acida

- Fosfatasi acida è presente nelle cellule ematopoietiche, ma i più alti livelli sono riscontrati nei macrofagi e negli osteoclasti.
- Un pattern di positività a spot si osserva in molti cellule T, ma questa positività non è sempre affidabile.
- La fosfatasi acida tartrato resistente (TRAP) è un isoenzima che si trova ad elevati livelli nella hairy cell leukemia e negli osteoclasti.
- Una TRAP positiva può talora essere osservata in alcune cellule T attivate, macrofagi, e istiociti (cellule di Gaucher).

Leucemia linfoblástica T



ACIDO PERIODICO DI SCHIFF (PAS)

- Il PAS colora il glicogeno intracellulare e i mucopolisaccaridi neutri, che sono presenti in quantità variabile nella maggior parte delle cellule ematopoietiche.
- Una positività per il PAS si ha nei blasti di leucemia acuta linfoblastica e mieloide, sebbene vi sia una certa variabilità tra i casi.
- Le eritroleucemie presentano una intensa diffusa positività citoplasmatica.
- Il PAS è inoltre utile per dimostrare l'anomalo accumulo di glucocerebrosidasi nella malattia di Gaucher.

PAS: eritroleucemia



Leucemia linfoblástica B



FERRO

- Il ferro cellulare viene identificato con la reazione di Perls o del blu di Prussia, nella quale il ferro ionico reagisce con il ferrocianuro acido che conferisce una colorazione blu.
- La colorazione del ferro è utilizzata per dimostrare il ferro negli eritroblasti (sideroblasti) e gli istiociti (ferro reticoloendoteliale).

Perinuclear Siderotic Granules



Sideroblasti

Il Working Group ha definito 3 tipi di sideroblasti:

Tipo 1: meno di 5 granuli di ferro nel citoplasma;

Tipo 2: 5 o più granuli di ferro, ma non in una distribuzione perinucleare;

Tipo 3 o sideroblasti ad anello: 5 o più granuli in posizione perinucleare, che circondano il nucleo o interessano almeno un terzo della circonferenza nucleare.

Nel conteggio dei sideroblasti ad anello, occorre valutare almeno 100 precursori eritroidi nei vari stadi maturativi.

La percentuale di sideroblasti ad anello ai fini della classificazione rimane il 15% come per la classificazione FAB e WHO.

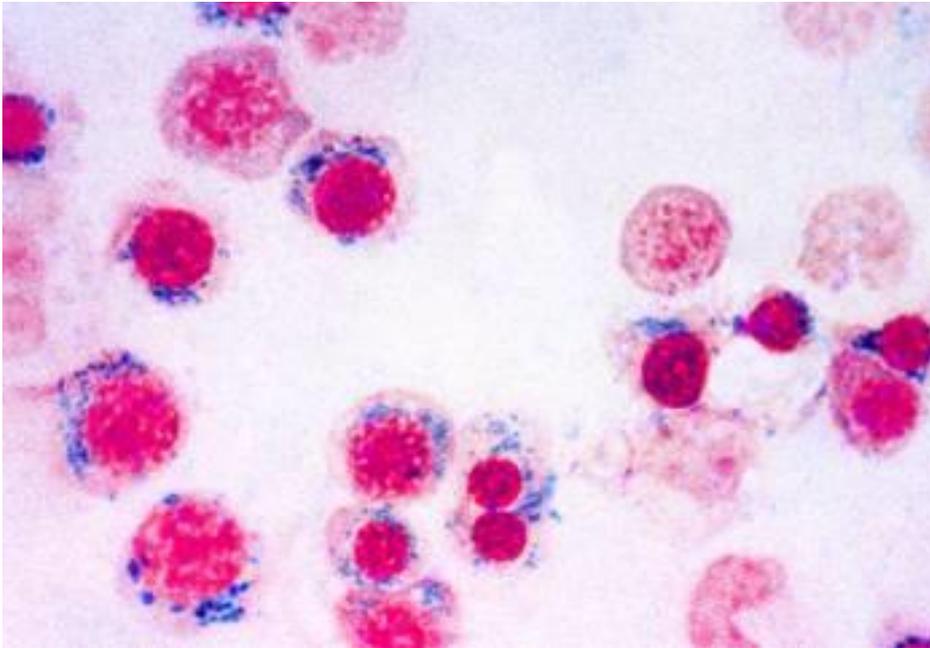


Figure 1. The presence of iron is detected by cytochemical stains and localized in the aspirate spicule

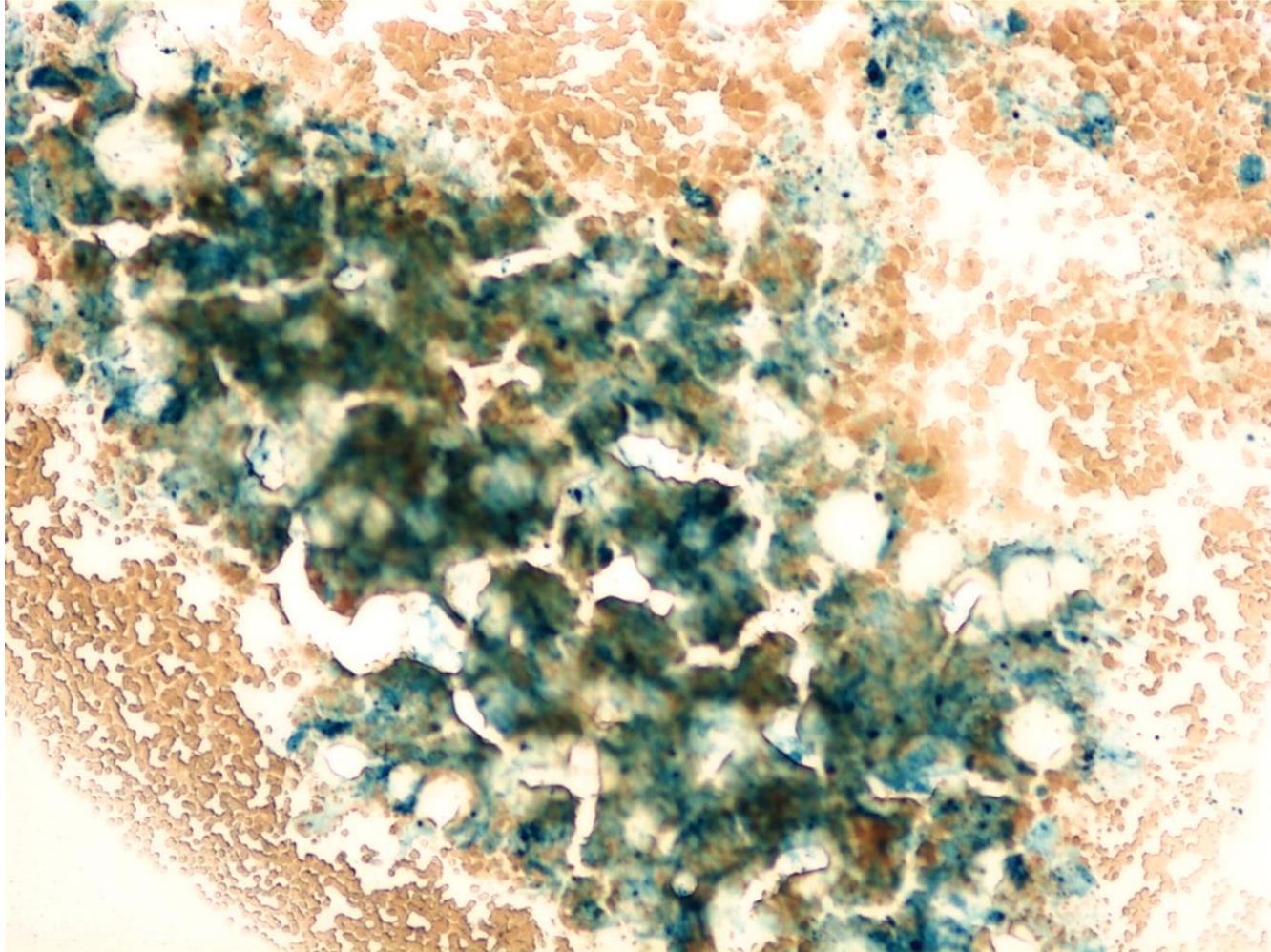
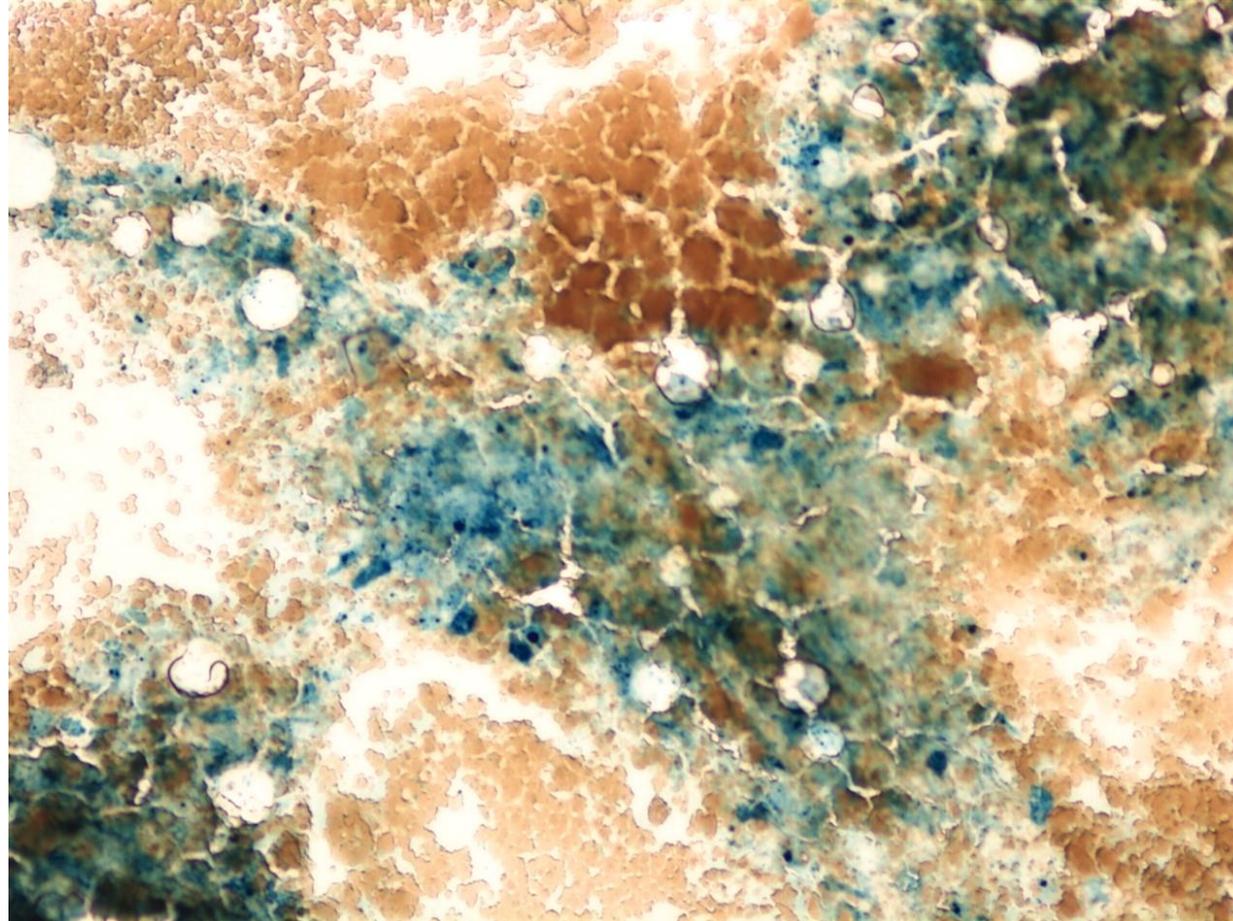


Figure 2. The iron is contained within cells of the RES system



Maslak, P. ASH Image Bank 2004;2004:101141

BLU DI TOLUIDINA

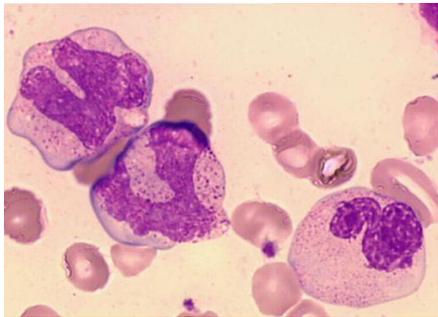
- Il blu di toluidina specificamente identifica i basofili e le mast cells reagendo con i mucopolisaccaridi acidi nei granuli cellulari per formare complessi metacromatici.
- Le mast cellule o i basofili maligni possono avere bassi livelli di mucopolisaccaridi acidi e possono non reagire alla colorazione.

Colorazioni immunocitochimiche

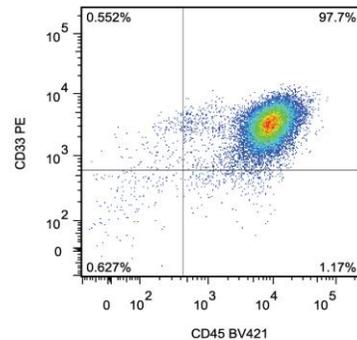
- Sono basate sull'utilizzo di anticorpi monoclonali che riconoscono specifici antigeni cellulari (di superficie ed intracellulari)
- Presentano un elevato livello di specificità, che consente una maggiore accuratezza diagnostica.
- Possono essere applicate al sangue periferico, midollo, sospensioni cellulari, tessuti.
- Alcuni anticorpi hanno sostituito le classiche tecniche citochimiche (ad esempio MPO) e possono essere utilizzati su campioni più vecchi o fissati.

Integrated AML Diagnosis

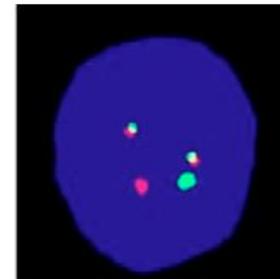
Morphology



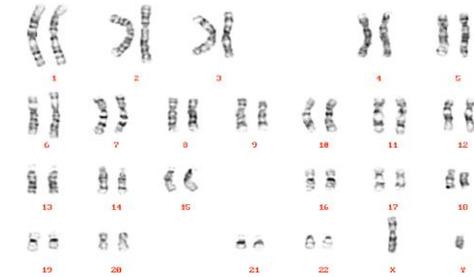
Flow Cytometry



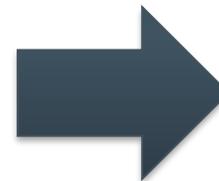
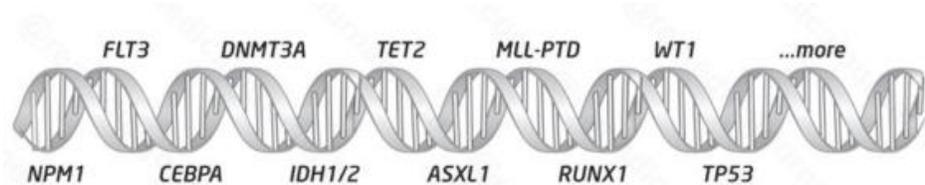
FISH



Cytogenetics

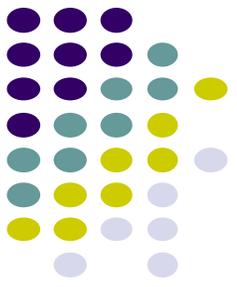


Mutation Profiling



- Risk stratification
- Drug discovery/therapeutics
- MRD monitoring

Ruolo della FCM nella diagnosi delle leucemie acute



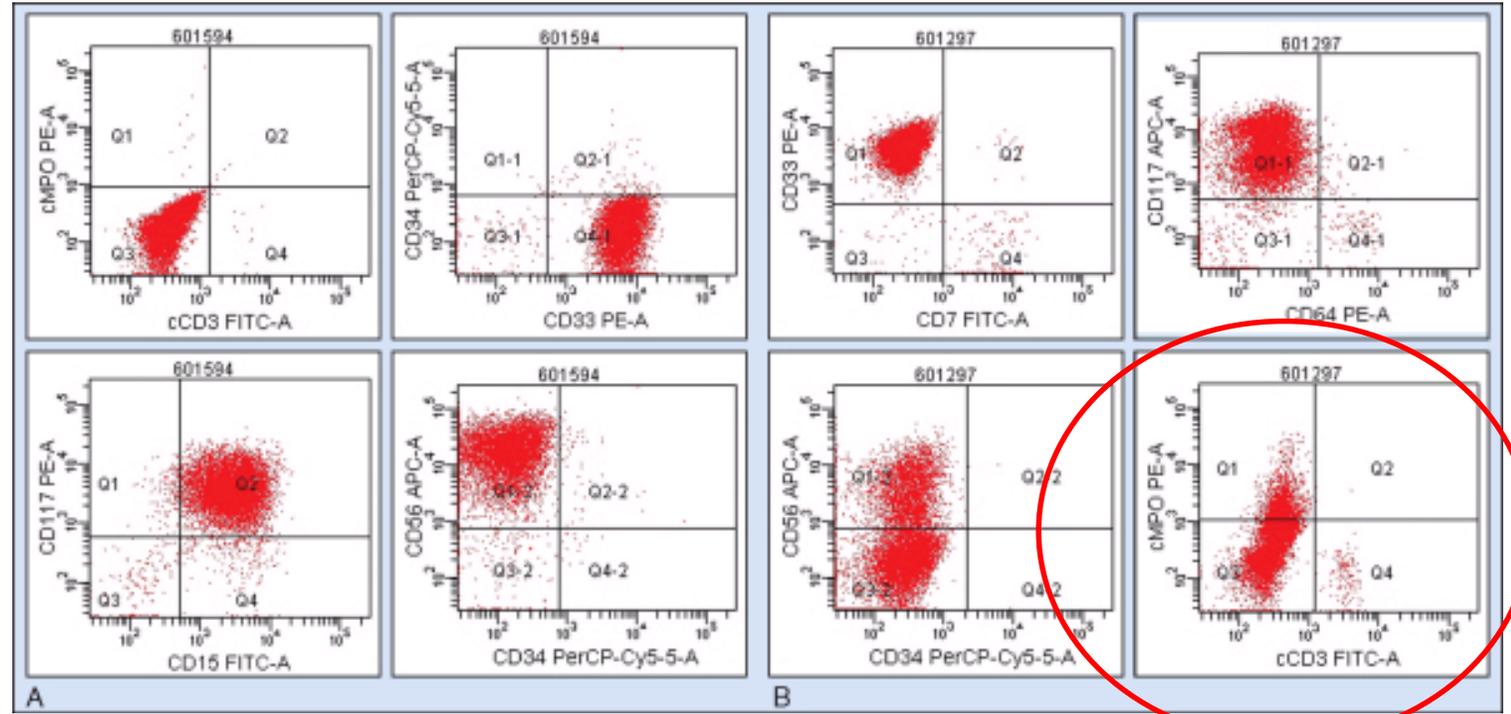
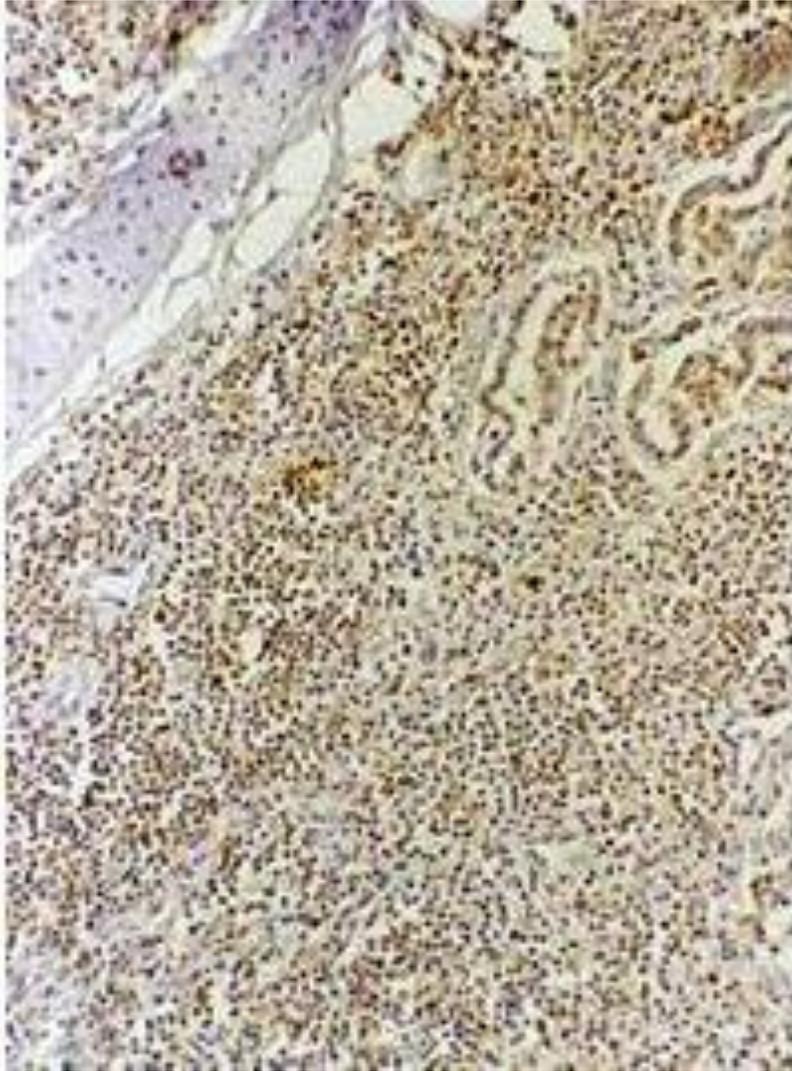
- La FCM nella diagnosi delle leucemie acute è importante per
 - Distinguere le forme linfoidei (ALL) da quelle mieloidi (AML),
 - Identificare le forme linfoidei B e T,
 - Valutare la risposta mediante lo studio della malattia minima residua

Valutazione della filiera di appartenenza dei blasti

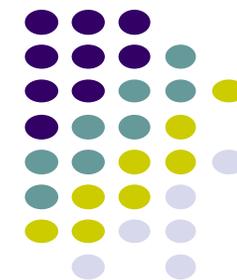


- La citofluorimetria multiparametrica è raccomandata per determinare la filiera di appartenenza come pure per definire il profilo antigenico anomalo per lo studio della malattia minima residua.
- I marcatori di filiera sono:
 - mieloide: anti-MPO,
 - monocitaria (almeno 2 dei seguenti): esterasi non specifiche, CD11c, CD14, CD64, lisozima
 - linfoide B: c μ , cCD22 e CD79a,
 - linfoide T cCD3, CD3 e anti-TCR.
- La citochimica, MPO o esterasi non specifiche, possono essere di aiuto ma non sono essenziali in tutti i casi.
- L'immunoistochimica sulla biopsia può essere di aiuto nel riconoscimento di antigeni mieloidi e linfodi.

MPO

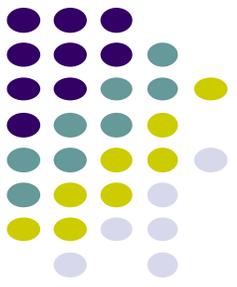


Classificazione immunologia delle leucemie acute mieloidi (EGIL 1995)



1. filiera mielomonocitaria*: anti MPO+, CD13+, CD33+, CD65+, CD117+
2. filiera eritroide (eritroide pura M6):
 - precoce/immatura: non classificabile con marcatori immunologici
 - tardiva/matura: antiglicoforina A+
3. Filiera megacariocitaria (M7): CD41+ e/o CD61+ (di membrana o citoplasmatici)
4. mieloide precoce (M0)(definito solo sulla base di marcatori immunologici): fenotipo come per le LAM mielomonocitiche ma con citochimica e marcatori linfoidi specifici negativi: CD3, CD79a, CD22)
5. LAM TdT+
6. LAM con espressione di antigeni linfoidi (LAM Ly+)

*positiva per almeno 2 marcatori mieloidi

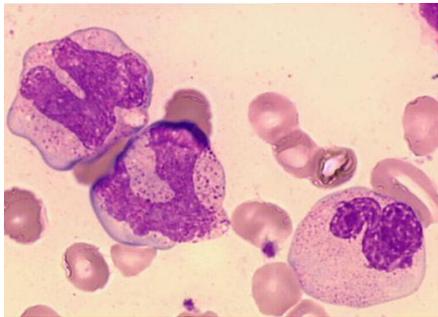


Classificazione immunologia della LAL (EGIL 1995)

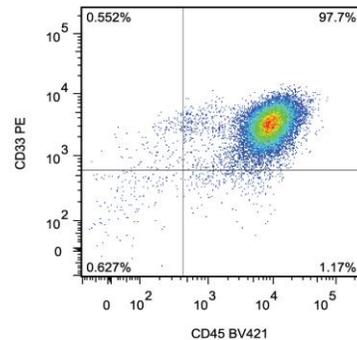
		Marcatori							
LAL filiera B	FAB	CD34	CD19	cCD22	CD79α	HLA-DR	CD10	cμ	Sig
Pro-B (B1)	L1, L2	+	+	+	+	+	-	-	-
B-comune (B2)	L1, L2	+/-	+	+	+	+	+	-	-
Pre-B (B3)	L1	-	+	+	+	+	+/-	+	-
B-matura (B4)	L3	-	+	+	+	+	-	-	+
LAL filiera T	FAB	cCD3	CD3	CD2	CD7	TdT	TcR	CD1a	CD4
Pro-T (T1)	L1, L2	+	-/+	-	+	+	+	-	-
Pre-T (T2)	L1, L2	+/-	+	+/-	+	+/-	+	-	-
T-corticale (T3)	L1, L2	-	+	+	+	-/+	+	+	+
T-matura (T4)	L1, L2	-	+	+	+	-	+	-	+

Integrated AML Diagnosis

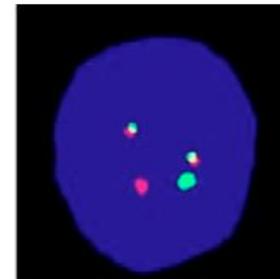
Morphology



Flow Cytometry



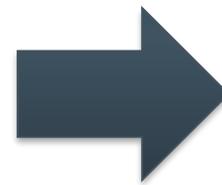
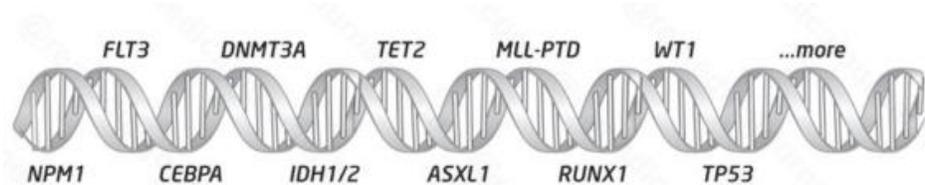
FISH



Cytogenetics

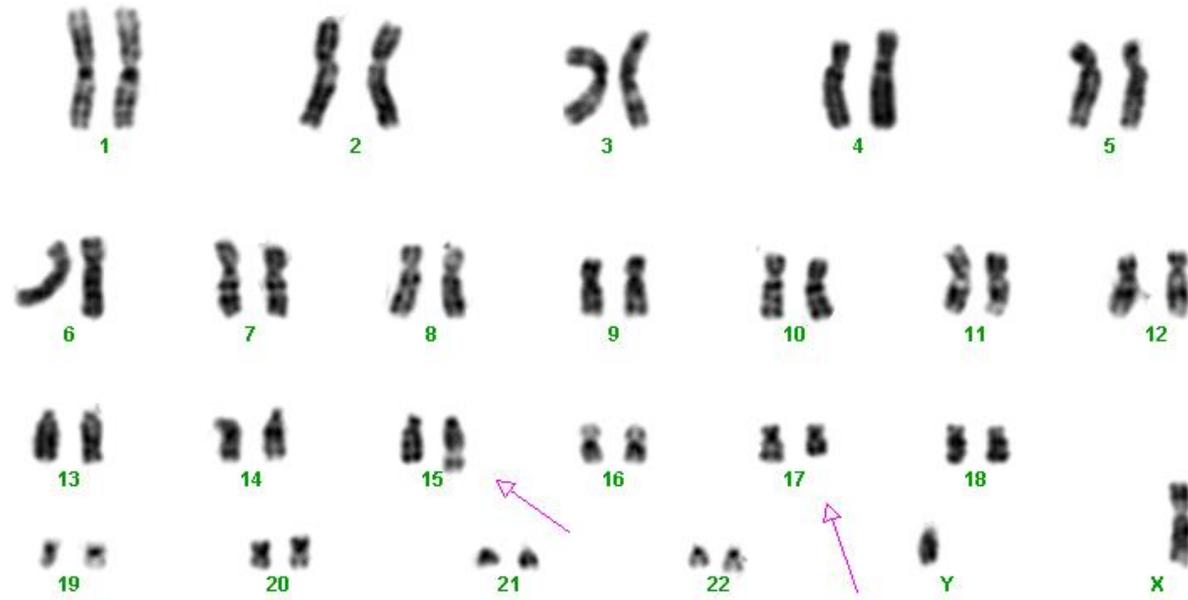


Mutation Profiling

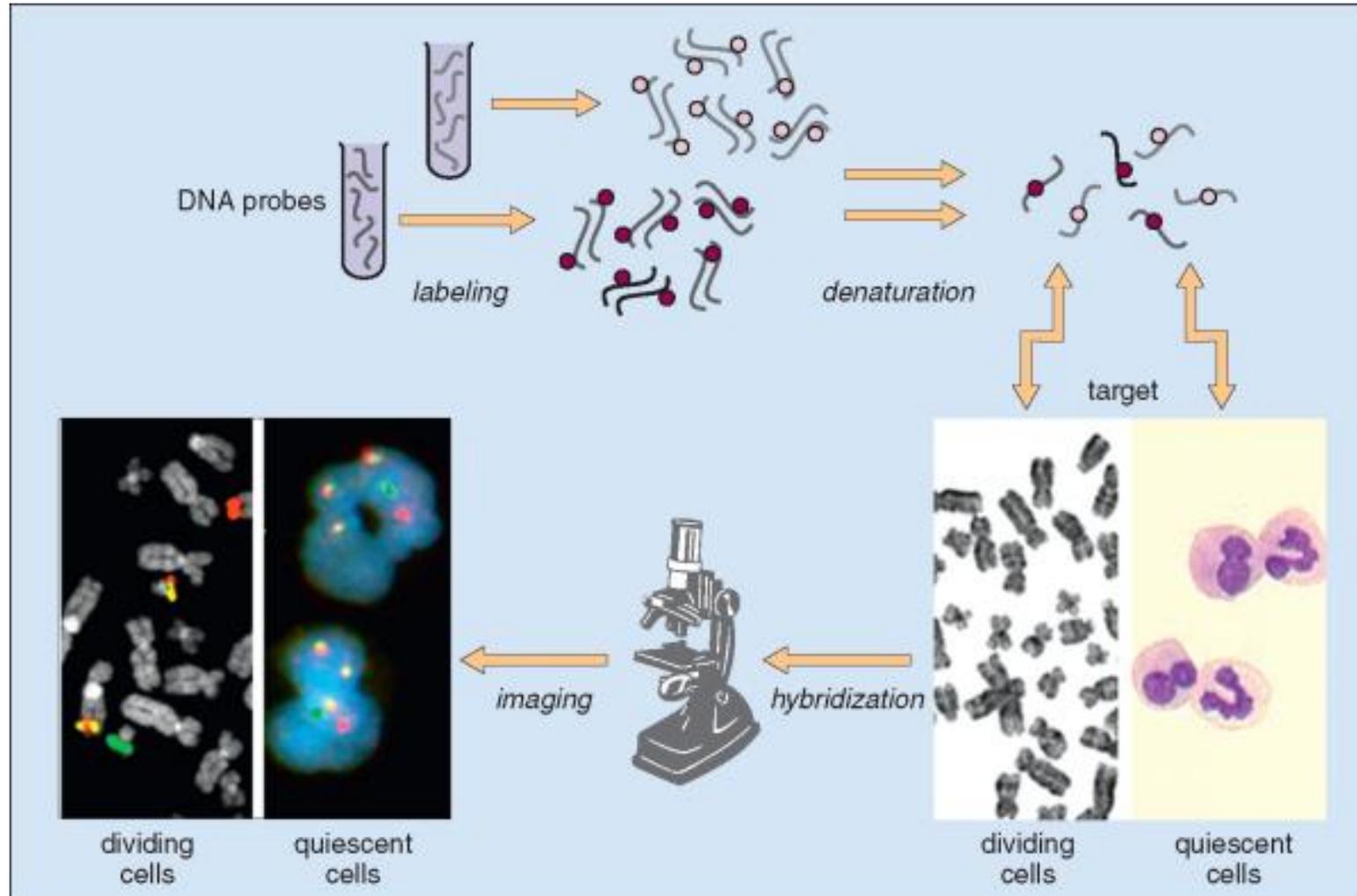


- Risk stratification
- Drug discovery/therapeutics
- MRD monitoring

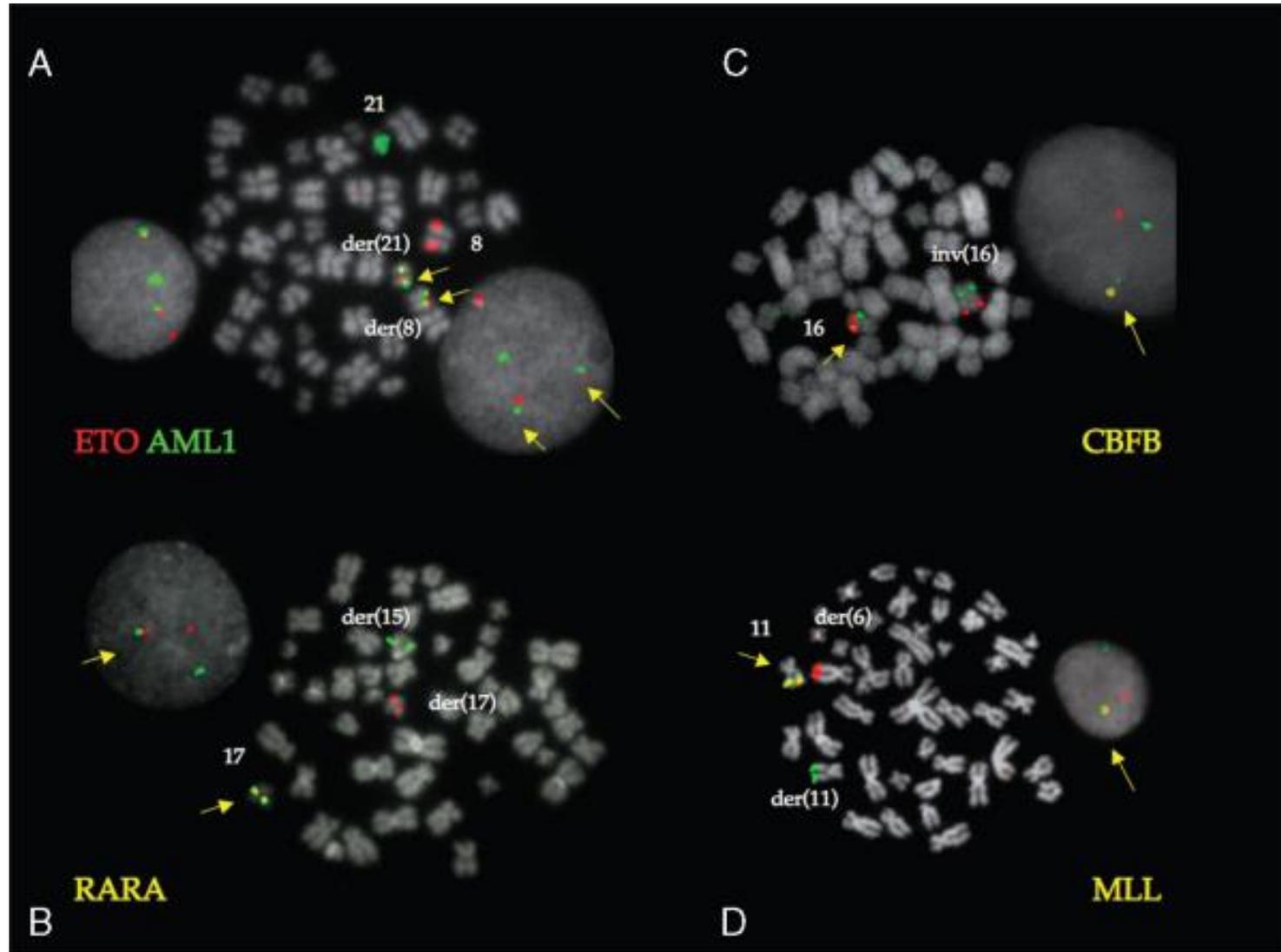
t(15;17)



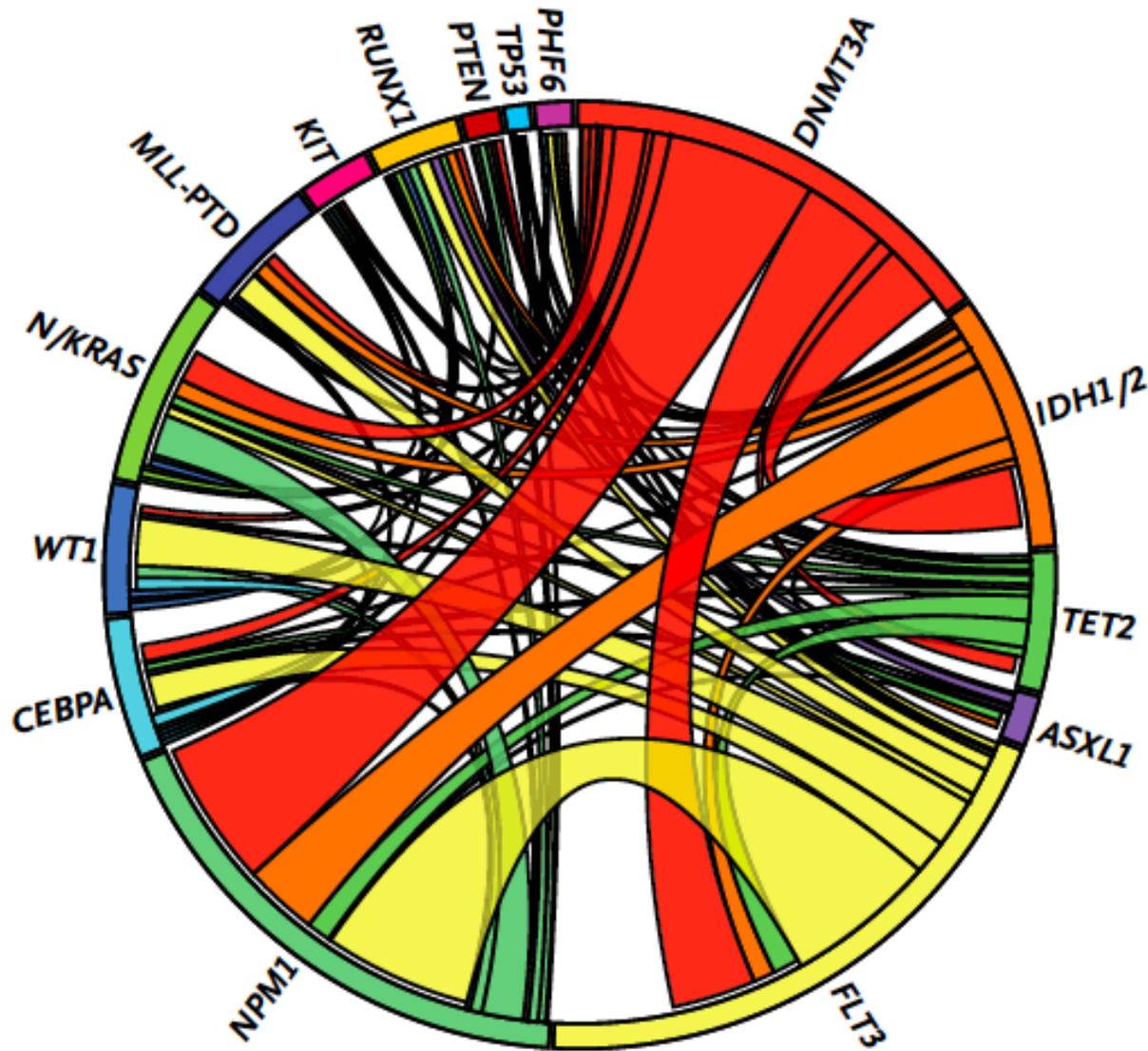
FISH



FISH



Mutational Complexity in AML



Gene	Overall Frequency, %
<i>FLT3</i> (ITD, TKD)	37 (30,7)
<i>NPM1</i>	29
<i>DNMT3A</i>	23
<i>NRAS</i>	10
<i>CEBPA</i>	9
<i>TET2</i>	8
<i>WT1</i>	8
<i>IDH2</i>	8
<i>IDH1</i>	7
<i>KIT</i>	6

Gene	Overall Frequency, %
<i>RUNX1</i>	5
<i>MLL-PTD</i>	5
<i>ASXL1</i>	3
<i>PHF6</i>	3
<i>KRAS</i>	2
<i>PTEN</i>	2
<i>TP53</i>	2
<i>HRAS</i>	0
<i>EZH2</i>	0

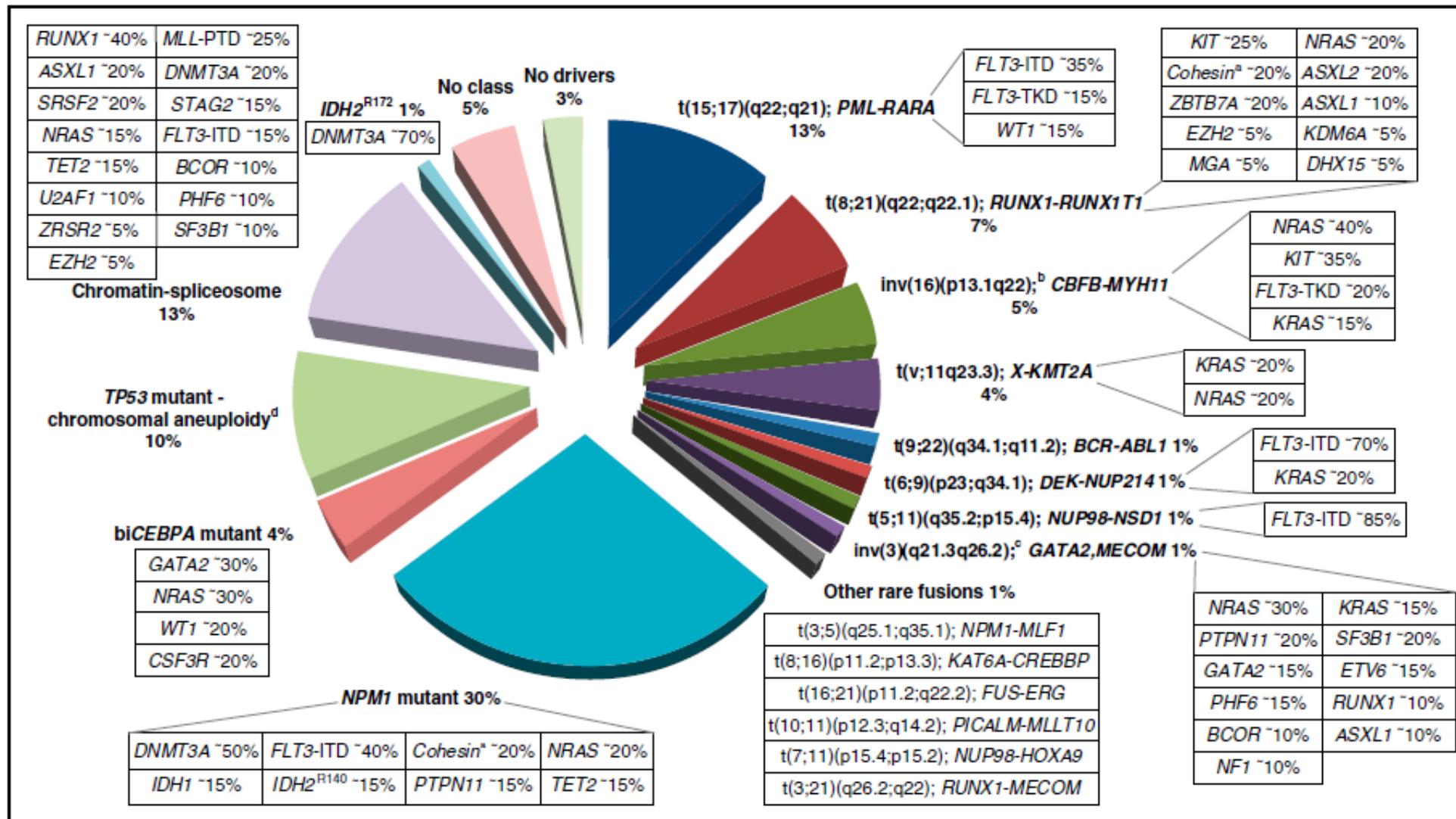
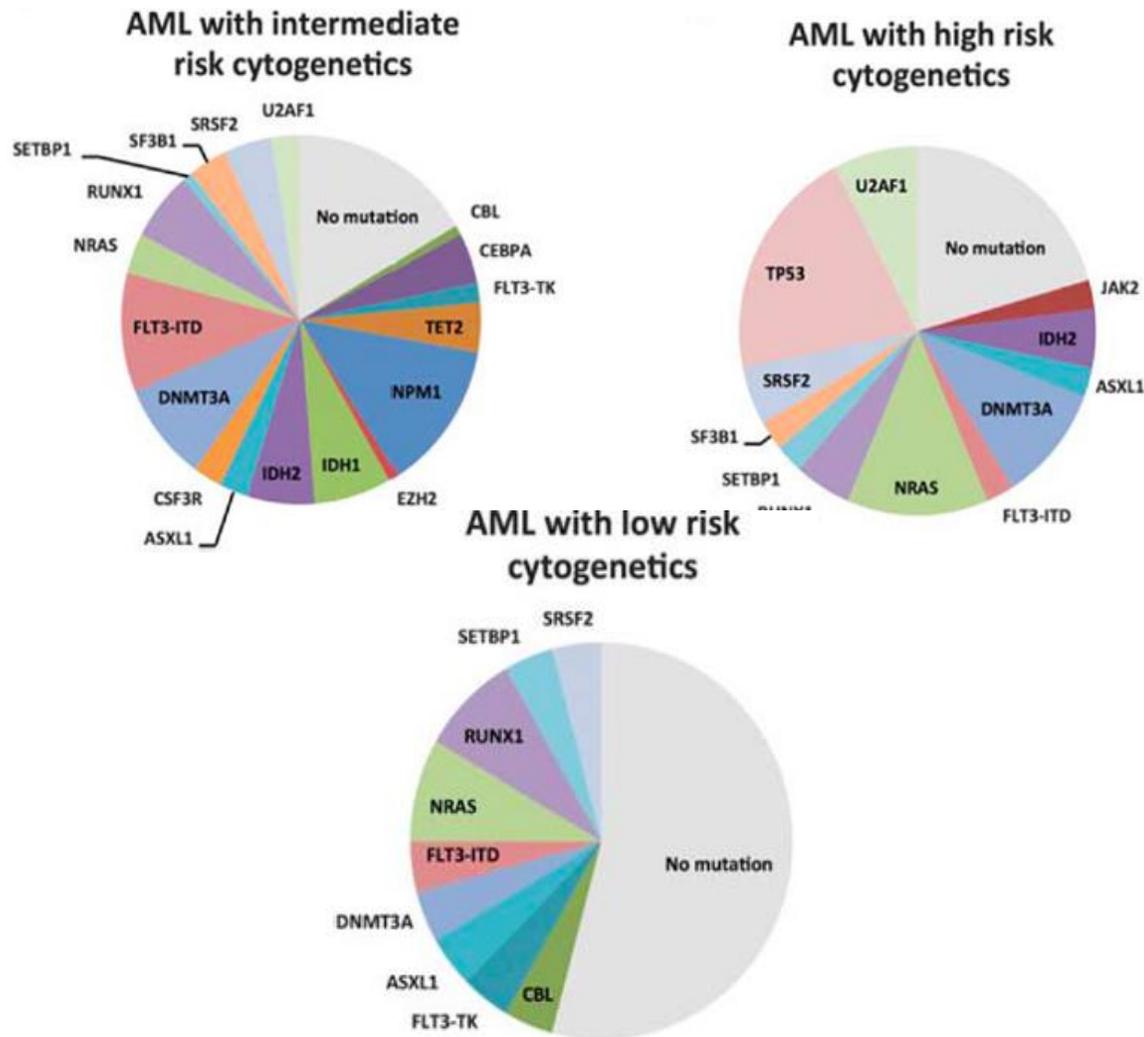


Figure 1. Molecular classes of AML and concurrent gene mutations in adult patients up to the age of ~65 years. Class definition is based on the study by Papaemmanuil et al.³⁷ For each AML class denoted in the pie chart, frequent co-occurring mutations are shown in the respective boxes. Data on the frequency of genetic lesions are compiled from the databases of the British Medical Research Council (MRC), the German-Austrian AML Study Group (AMLSG), and from selected studies.^{37,67,88,299} ^a indicates cohesin genes including *RAD21* (~10%), *SMC1A* (~5%), and *SMC3* (~5%); ^b, inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); *CBFB-MYH11*; ^c, inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); *GATA2,MECOM(EVI1)*; and ^d, *TP53* mutations are found in ~45%, and complex karyotypes in ~70% of this class. The structure of the pie chart is adapted from Grimwade et al,⁵⁰ generated by Adam Ivey (King's College London, London, United Kingdom).

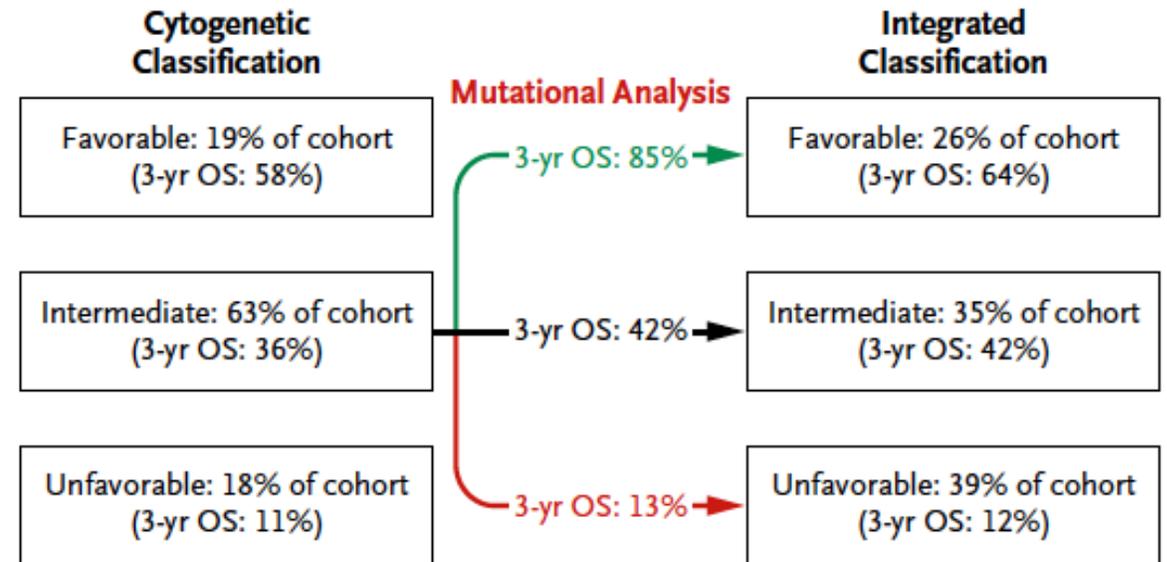
Table 1. Myeloid neoplasms with germ line predisposition, AML and related precursor neoplasms, and acute leukemias of ambiguous lineage (WHO 2016)

Myeloid neoplasms with germ line predisposition (see Table 2)	
AML and related neoplasms	AML and related neoplasms (cont'd)
AML with recurrent genetic abnormalities	Acute myelomonocytic leukemia
AML with t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>	Acute monoblastic/monocytic leukemia
AML with inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>	Pure erythroid leukemia#
Acute promyelocytic leukemia with <i>PML-RARA</i> *	Acute megakaryoblastic leukemia
AML with t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i> †	Acute basophilic leukemia
AML with t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i>	Acute panmyelosis with myelofibrosis
AML with inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2,MECOM(EVI1)</i>	Myeloid sarcoma
AML (megakaryoblastic) with t(1;22)(p13.3;q13.3); <i>RBM15-MKL1</i> ‡	Myeloid proliferations related to Down syndrome
Provisional entity: AML with <i>BCR-ABL1</i>	Transient abnormal myelopoiesis
AML with mutated <i>NPM1</i> §	Myeloid leukemia associated with Down syndrome
AML with biallelic mutations of <i>CEBPA</i> §	Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm
Provisional entity: AML with mutated <i>RUNX1</i>	Acute leukemias of ambiguous lineage
AML with myelodysplasia-related changes	Acute undifferentiated leukemia
Therapy-related myeloid neoplasms¶	MPAL with t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> ††
AML, NOS	MPAL with t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> rearranged
AML with minimal differentiation	MPAL, B/myeloid, NOS
AML without maturation	MPAL, T/myeloid, NOS
AML with maturation	

How Does Mutational Profiling Help Determine Prognosis in AML?



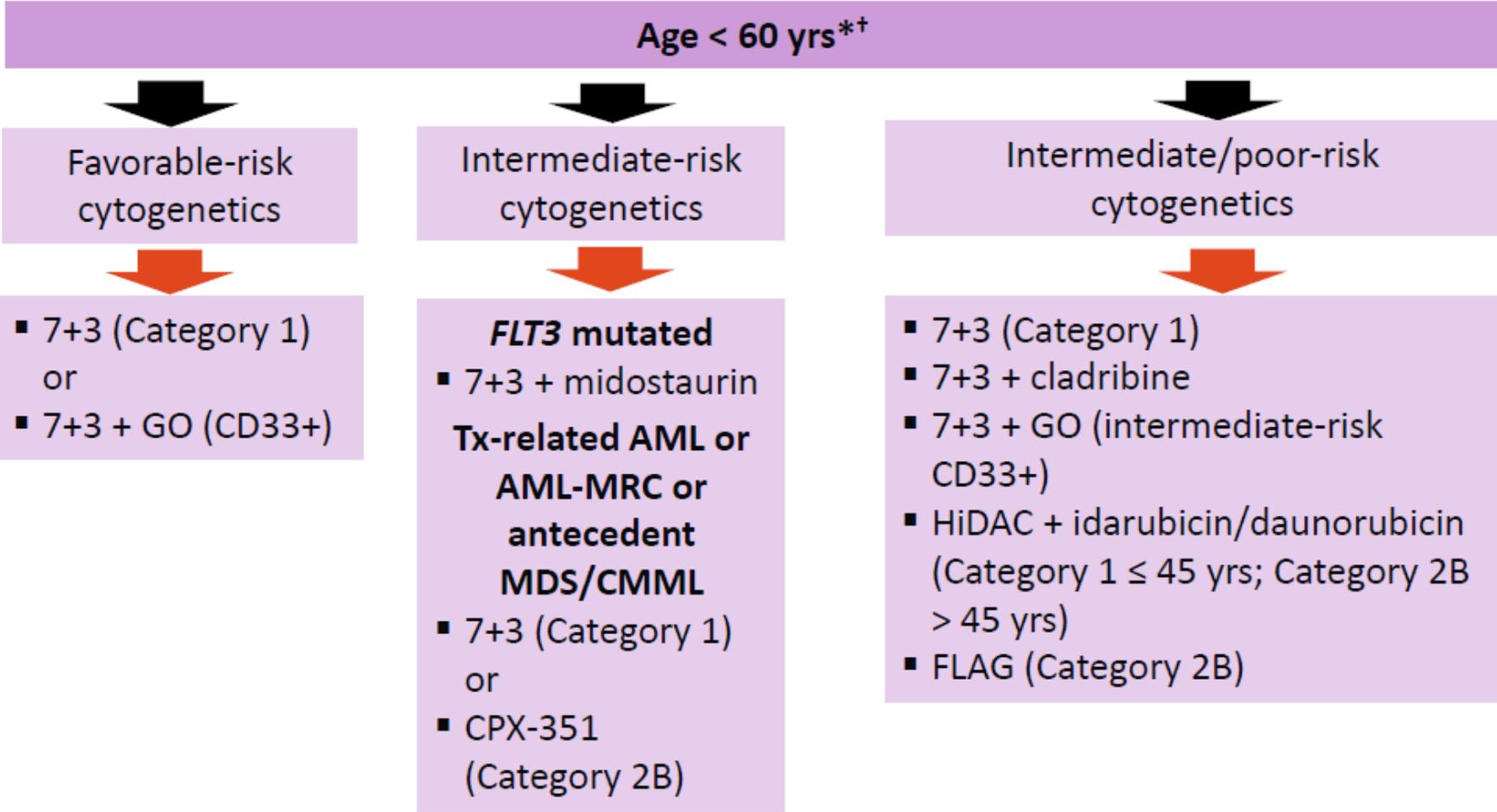
Effect of Mutational Profiling



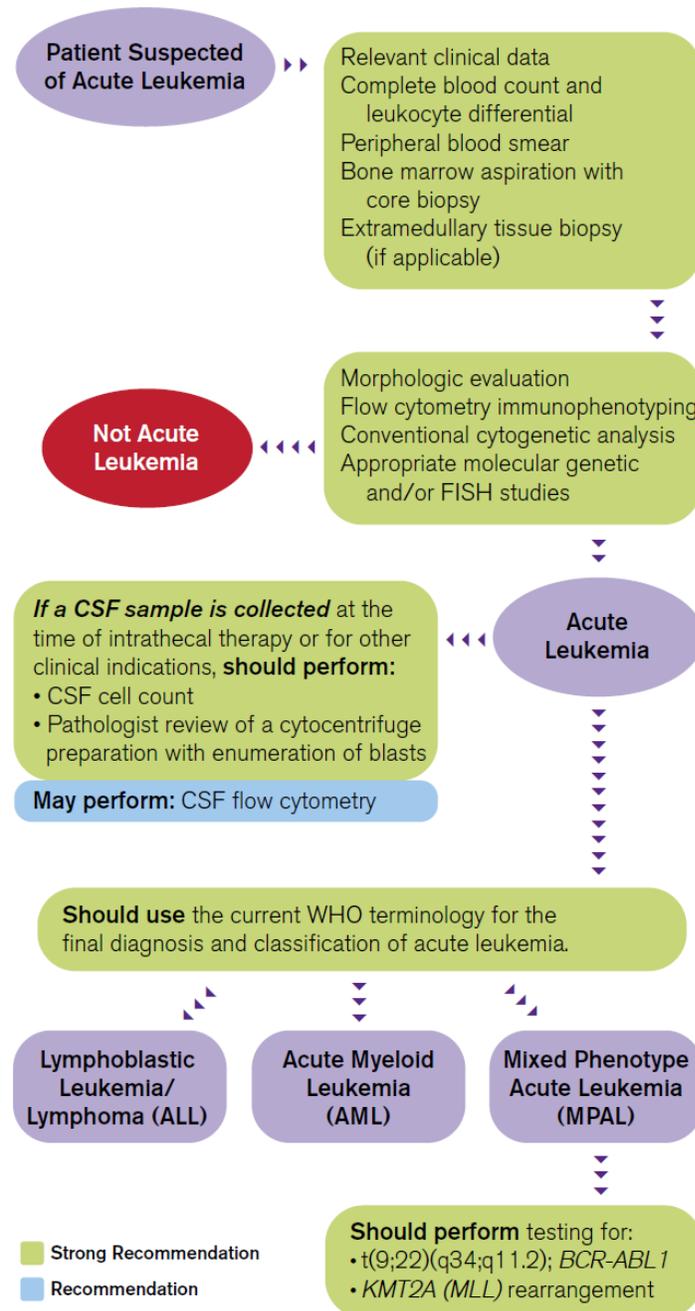
AML Risk Stratification by Cytogenetics and Mutations, per 2017 ELN Categories

Risk Status	Cytogenetics	Molecular Abnormalities
Favorable	t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>	Mutated <i>NPM1</i> without <i>FLT3</i> -ITD or with <i>FLT3</i> -ITD ^{low} or Biallelic mutated <i>CEBPA</i>
Intermediate	t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i> Cytogenetic abnormalities not classified as favorable or adverse	Mutated <i>NPM1</i> and <i>FLT3</i> -ITD ^{high} Wild-type <i>NPM1</i> without <i>FLT3</i> -ITD or with <i>FLT3</i> -ITD ^{low} (without adverse-risk genetic lesions)
Adverse	t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i> t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> rearranged t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2,MECOM(EVI1)</i> -5 or del(5q); -7; -17/abn(17p) Complex karyotype, monosomal karyotype	Wild-type <i>NPM1</i> and <i>FLT3</i> -ITD ^{high} Mutated <i>RUNX1</i> Mutated <i>ASXL1</i> Mutated <i>TP53</i>

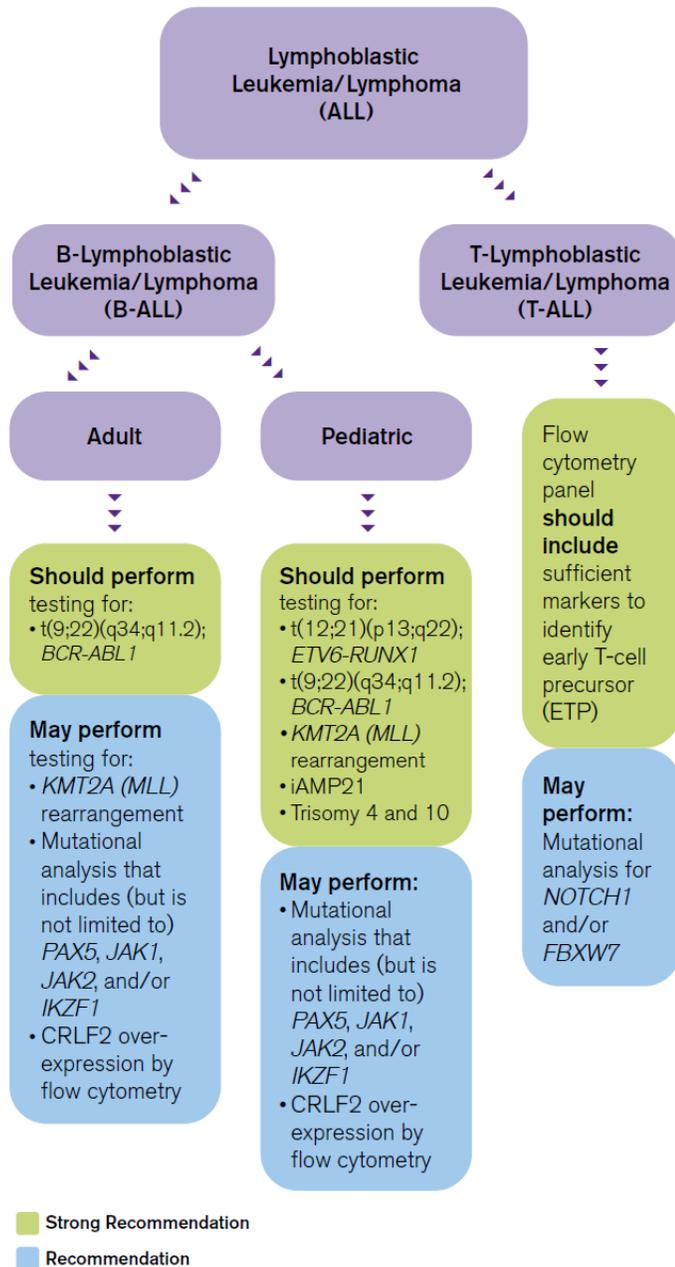
Figure 1. Treatment Algorithms for Newly Diagnosed AML^[4]



Initial Diagnostic Workup of Acute Leukemia



Initial Diagnostic Workup of Lymphoblastic Leukemia



Initial Diagnostic Workup of Acute Myeloid Leukemia

