

La citometría de flujo aumenta la proporción de muestras valorables en líquido cefalorraquídeo con recuento celular normal en hemopatías malignas

CASANDRA JARA^{2,a}, CARLOS VEAS^{2,a}, CAROLINA DELGADO^{1,2},
CLAUDIA CABEZAS¹, MAURICIO CHANDÍA^{2,3}

¹Departamento de Especialidades,
Facultad de Medicina,
Universidad de Concepción.
Concepción, Chile.

²Unidad de Anatomía Patológica,
Hospital Guillermo Grant
Benavente. Concepción, Chile.

³Departamento de Medicina,
Facultad de Medicina,
Universidad de Concepción.
Concepción, Chile.

^aBioquímico, MSC

Fuente apoyo financiero:
Proyecto VRID (215.085.035-10),
Universidad de Concepción.

Recibido el 14 de octubre de
2022, aceptado el 13 de marzo
de 2023.

Correspondencia a:
Dr. Mauricio Chandía Cabas
Laboratorio de Citometría de
Flujo Hospital Guillermo Grant
Benavente, San Martín 1436,
Concepción, Chile.
mchcabas@gmail.com

Flow cytometry increases the proportion of valuable samples in cerebrospinal fluid with normal cell count in malignant blood diseases

Background: The alteration of cerebrospinal fluid (CSF) in hematologic neoplasms is a poor prognostic marker. The characteristics of CSF are usually analyzed by flow cytometry or cytology. However, paucicellular CSF samples (≤ 5 cells/dL) can sometimes be considered unsuitable for analysis due to the low number of events. **Objective:** To evaluate the proportion of samples reported as suitable for analysis obtained by cytometry (FCM) and cytology in paucicellular CSF samples. **Material and Methods:** 169 samples of paucicellular CSF corresponding to 115 patients with hematologic neoplasms were selected. The samples were obtained by lumbar puncture in tubes conditioned with EDTA and Transfix®. We characterized the immunophenotype of CSF samples with an 8-color panel, and 55 samples (32%) were in a small sample tube (SST). In all cases, monocytes were identified by CD14 labeling and T lymphocytes by CD3 labeling. The acquisition was carried out in a FACSCantoII® cytometer, and the analysis was performed using Infinicyt® software. **Results:** The proportion of samples suitable for analysis was higher in FCM compared to cytology (98% vs 61%, $p < 0.000$). We identified the presence of T lymphocytes and/or monocytes in most samples (98% and 90%, respectively). In the SST samples, the number of events recorded in low-volume samples (< 1 mL) was lower than in samples with higher volume (140 vs 556, $p < 0.001$), with a median of identification of 3 cell populations. **Conclusion:** FCM allows the analysis of a higher proportion of paucicellular CSF samples than cytology in hematologic neoplasms study.

(Rev Med Chile 2023; 151: 560-564)

Key words: Cerebrospinal Fluid; Flow Cytometry; Hematologic Diseases.

RESUMEN

Introducción: El compromiso del líquido cefalorraquídeo (LCR) en hemopatías malignas es un marcador de mal pronóstico y es habitualmente estudiado por citometría de flujo o citología. Ocasionalmente, las muestras de LCR oligocelulares (≤ 5 céls/dL) pueden ser consideradas como no aptas para diagnóstico por la baja cantidad de eventos. **Objetivo:** Evaluar la proporción de

muestras reportadas como valorables para diagnóstico obtenidas por citometría y citología en muestras de LCR oligocelular. **Material y Métodos:** Se seleccionaron 169 muestras de LCR oligocelular correspondientes a 115 pacientes con hemopatías malignas. Las muestras fueron obtenidas mediante punción lumbar en tubos acondicionados con EDTA y preservante celular (Transfix®). El inmunofenotipo se realizó con panel de 8 colores, 55 (32%) de las cuales se hizo con panel para pequeñas muestras (SST). En todos los casos se incluyó CD14 para identificación de monocitos y CD3 para linfocitos T. La adquisición se realizó en citómetro FACSCantoII® y el análisis en software Infinicyt®. **Resultados:** La proporción de muestras valorables fue mayor en citometría en comparación con la citología (98% vs 61%, $p < 0,000$). En la mayoría se identificaron linfocitos T (98%) y/o monocitos (90%). En las muestras con SST, la cantidad de eventos obtenida fue menor en muestras con < 1 mL (140 vs 556, $p < 0,001$) y se logró identificar una mediana de 3 poblaciones celulares. **Conclusión:** La citometría proporciona una mayor cantidad de muestras valorables en los LCR paucicelulares en relación con la citología en muestras de LCR enviadas para estudio de compromiso de LCR por hemopatías malignas.

Palabras clave: Citometría de Flujo; Enfermedades Hematológicas; Líquido Cefalorraquídeo.

El compromiso del líquido cefalorraquídeo (LCR) en hemopatías malignas es un marcador de mal pronóstico y además tiene implicancias terapéuticas. El diagnóstico de la invasión de células tumorales en el LCR puede ser complejo debido a la escasez de células de la muestra y a la presencia de linfocitos reactivos^{1,2}. Las neoplasias malignas con compromiso del LCR pueden originar pleocitosis, pero también pueden presentarse con recuentos celulares totales normales (≤ 5 células/mm³) en cerca de la mitad de los casos³.

Las técnicas más utilizadas para el estudio de compromiso por hemopatías malignas en LCR son la citología convencional (CC) y la citometría de flujo (CMF)³. La CC posee menor complejidad técnica, puede complementarse con inmunohistoquímica y tiene menor coste, sin embargo pierde sensibilidad especialmente en las muestras con menor cantidad de eventos⁴. La CMF multiparamétrica favorece la adquisición de una mayor cantidad de células, lo que permite considerar como valorables una mayor proporción de muestras al demostrar la existencia de poblaciones celulares diferentes². Las poblaciones más frecuentemente encontradas en LCR por CMF son los monocitos y los linfocitos T y se recomienda en todos los estudios identificarlas para poder establecer un punto de referencia válido para el

análisis del resto de los marcadores^{5,4}.

En este trabajo nos propusimos revisar la proporción de muestras valorables a partir de una serie de muestras de LCR oligocelulares estudiadas por CC y CMF y enviadas por sospecha de compromiso de LCR por hemopatías malignas.

Material y Métodos

Se obtuvo de la base de datos del laboratorio de citometría de flujo del Hospital "Dr. Guillermo Grant Benavente" (HGGB) información de 169 muestras de LCR consideradas como oligocelulares (≤ 5 céls/dL de acuerdo al recuento realizado en el laboratorio central del HGGB), correspondientes a 115 pacientes ingresados en el período comprendido entre agosto de 2013 y diciembre de 2016. Las muestras fueron obtenidas mediante punción lumbar en tubos acondicionados con EDTA y estabilizante celular (Transfix®)⁶. El inmunofenotipo por citometría de flujo se realizó con panel de 8 colores, siguiendo el protocolo publicado por el consorcio EuroFlow. En 55 muestras (32%) se realizó el panel SST (*Small Sample Screening Tube*) diseñado por el consorcio EuroFlow y en el resto de las muestras se adaptaron los marcadores a los diagnósticos conocidos de referencia⁷. En todos los casos se incluyó CD14 en

APC o APC-H7 para identificación de monocitos y CD3 en APC o APC-H7 para la identificación de linfocitos T. La citología se realizó según indicación médica, en 71 muestras en la unidad de anatomía patológica del HGGB. No se realizaron Se definió como no valorables a las muestras con muy mala viabilidad o menos de 5 eventos agrupados de características similares que definan una población única y por CC aquellas informadas como acelulares o no evaluables cualitativamente a juicio del patólogo informante⁸. La adquisición se realizó en citómetro FACSCantoII® mediante software DIVA (BD Biosciences, San José, California). El análisis de citometría se realizó mediante software Infinicyt® v 1.6 (Cytognos, Salamanca, España) y el estadístico en software SPSS. El estudio contó con la aprobación del comité de ética del Servicio de Salud Concepción.

Análisis estadístico

Los datos categóricos fueron presentados como mediana, n y porcentajes y los datos numéricos como mediana y rango. Se utilizó la prueba de χ^2 para analizar diferencias entre variables categóricas y t de Student y U de Mann-Whitney para variables numéricas. Para medir la fuerza de asociación entre variables categóricas se estimó la V de Cramer y para variables continuas se empleó la correlación de Pearson. El análisis estadístico se realizó con *software* estadístico SPSS, considerando significativa una $p < 0,05$.

Resultados

El 64% de los pacientes fueron de sexo masculino, con una mediana de edad de 29 años (0,1-77). Los diagnósticos de referencia fueron linfoma no Hodgkin (36%), leucemia aguda (60%) y misceláneos (4%). En la mayoría de las muestras analizadas por CMF se encontró linfocitos T (98%), monocitos (90%) o ambos (88%) y en menor frecuencia linfocitos B (32%), células NK (29%) y neutrófilos (15%) (Figura 1). En el subgrupo de muestras marcadas con tubo SST se encontró similar frecuencia de poblaciones (Figura 2).

En la población total de muestras no se observó una relación claramente directa entre el volumen y la cantidad de eventos analizables

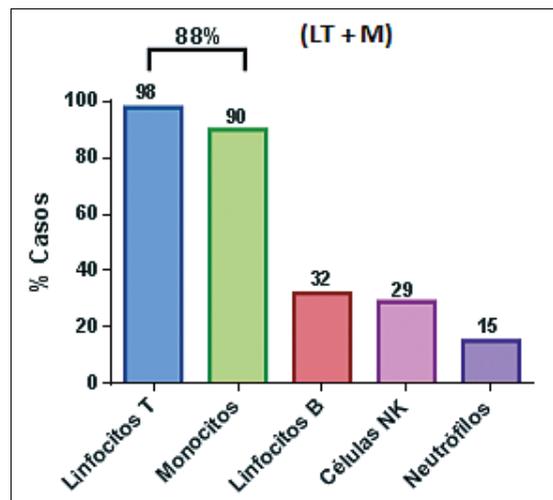


Figura 1. Distribución de subpoblaciones celulares en las muestras. LT: linfocitos T; M: monocitos; LT + M: proporción de muestras con ambas poblaciones.

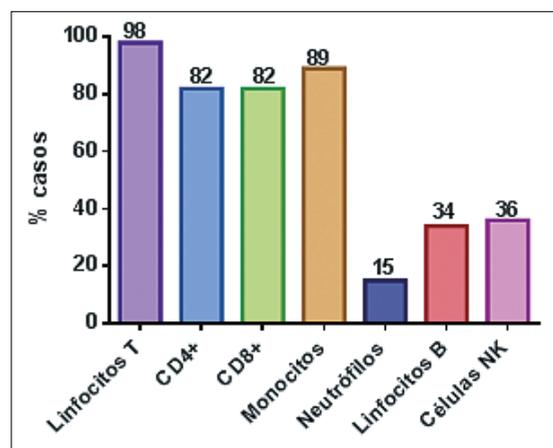


Figura 2. Distribución de poblaciones celulares obtenidas en 55 muestras analizadas utilizando panel SST (*small simple tube*).

obtenida ($r^2 = 0,014$) (Figura 3). Sin embargo, en el subgrupo de muestras analizadas con panel SST que tenían un volumen $> 1.000 \mu\text{L}$ se observó una cantidad de eventos analizables (560) mayor que en aquellas muestras con un volumen $< 1.000 \mu\text{L}$ (140), lo que fue estadísticamente significativo ($p < 0,05$), a pesar de observarse una mediana de número de poblaciones celulares (3) similar en ambos grupos.

En las muestras analizadas por CMF se encon-

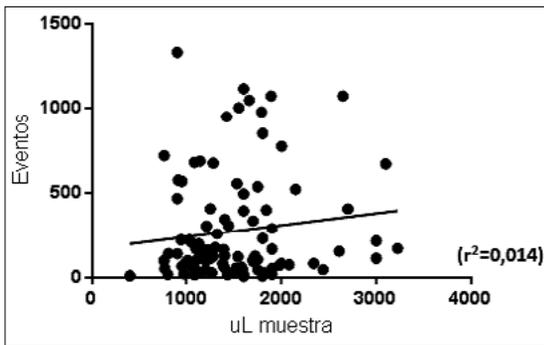


Figura 3. Relación entre volumen de muestra y cantidad de eventos.

tró una mayor proporción de estudios valorables (165/169, 98%) en comparación con la CC (43/71, 61%), lo que fue estadísticamente significativo ($p < 0,000$) con una fuerza de asociación moderada (V de Cramer: 0,498) (Tabla 1).

Discusión

El presente estudio demuestra que en el contexto de exploración de invasión leptomeníngea por hemopatías malignas, la citometría de flujo proporciona una cantidad de muestras valorables mayor que la obtenida por la citología convencional en muestras de LCR oligocelulares. La proporción de muestras no valorables por citometría reportada en la literatura es de 8%, lo cual es mayor a lo obtenido en nuestro estudio (2%), probablemente por diferencias en la preparación de la muestra y el uso de una mayor cantidad de fluorocromos en forma simultánea². La CMF al adquirir una mayor cantidad de eventos, mejora la sensibilidad del estudio de las muestras de LCR en relación a la CC, como ha sido demostrado en la literatura⁴.

En nuestra serie, la CMF permitió la identificación en la mayoría de los casos de poblaciones

estables de células del LCR, como linfocitos T y monocitos. Esto es similar a lo descrito por DeGraaf et al, quienes en una población de LCR normal encontraron similar distribución de poblaciones celulares⁵. Asimismo, este hecho justifica la inclusión de CD3 y CD14 en todos los paneles para identificar estos grupos celulares, independientemente del diagnóstico de base, lo que fue sugerido por el consorcio EuroFlow para el tubo SST. Por otro lado, la obtención de las muestras en tubos con EDTA acondicionados con Transfix[®] ha demostrado ser fundamental para la conservación de la viabilidad celular⁶.

Considerando el total de muestras procesadas por CMF no se pudo demostrar que el volumen de la misma influya directamente en la cantidad de eventos obtenidos para análisis. Sin embargo, cuando se observa el subgrupo de muestras marcadas con SST, se encuentra que aquellas en las cuales hay un volumen $> 1.000 \mu\text{L}$ hubo una cantidad de eventos analizables significativamente mayor. Esto puede ser debido a que, siendo el SST un panel estandarizado, las diferencias en el procesamiento de la muestra no influyen en la cantidad de eventos obtenidos y se observa esta relación en forma más clara.

Entre las limitaciones de nuestro reporte se encuentran el carácter retrospectivo y unicéntrico del estudio lo que puede no reflejar la realidad de todos los hospitales públicos del país y la definición empleada para designar una muestra estudiada por CMF como no valorable basada en la cantidad de eventos para definir una población única y la viabilidad de la muestra. Al respecto no existe un consenso acerca de lo que se considera en una muestra de LCR para calificarla como valorable así como tampoco hay acuerdo acerca del número mínimo de eventos analizables que definen una población celular, lo cual a su vez puede variar con el tipo de procesamiento de la muestra y el número de colores empleado en el panel de CMF. Subirá et al definieron experimentalmente

Tabla 1. Proporción de muestras valorables y no valorables en muestras analizadas por citometría de flujo y citología convencional

Muestras	n (%)		p
	Citometría de flujo	Citología convencional	
Valorables	165 (98)	43 (61)	NS
No valorables/acelulares	4 (2)	28 (39)	$< 0,05$

que más de 13 eventos agrupados con similares características representan una población celular con alta probabilidad, mientras que lo contrario ocurre con menos de 5 eventos⁸. Quijano et al y Del Principe han definido más de 10 eventos utilizando CMF de 6-8 colores, mientras que otros autores como DeGraaf han definido umbrales más altos como 15-25 eventos^{4,5,9}. En concordancia con nuestra práctica, muchos de estos estudios han incluido muestras oligocelulares de LCR, lo que no avala la práctica establecida en algunos centros de restringir el estudio por citometría solo a las muestras que se presenten con recuentos > 5 células/ μ L.

Conclusiones

En el estudio de la diseminación leptomeníngea de las hemopatías malignas, la CMF facilita la obtención de una mayor cantidad de muestras valorables para análisis en relación con la CC, independientemente del recuento celular del LCR. Es recomendable en cada muestra lograr un volumen de al menos de 1 ml en tubo con preservante celular (Transfix[®]) y EDTA, lo que aumentará la cantidad de eventos. Para el inmunofenotipo se recomienda utilizar paneles de 8 colores, que pueden ser diseñados de acuerdo a la patología en estudio, incorporando siempre marcadores de referencia para identificación de las poblaciones celulares estables (linfocitos T y monocitos).

Agradecimientos: Se agradece apoyo recibido desde Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo de la Universidad de Concepción.

Referencias

1. Stacchini A, Demurtas A, Aliberti S. Immunophenotyping of Paucicellular Samples. *Curr Protoc Cytom.* 2014;68(1). doi:10.1002/0471142956.cy0946s68
2. Craig FE, Ohori NP, Gorrill TS, Swerdlow SH. Flow Cytometric Immunophenotyping of Cerebrospinal Fluid Specimens. *Am J Clin Pathol.* 2011;135(1):22-34. doi:10.1309/AJCPANA7ER1ABMZI
3. Bromberg JEC, Breems DA, Kraan J, Bikker G, van der Holt B, Sivellis Smitt P, et al. CSF flow cytometry greatly improves diagnostic accuracy in CNS hematologic malignancies. *Neurology.* 2007;68(20):1674-1679. doi:10.1212/01.wnl.0000261909.28915.83
4. Quijano S, López A, Sancho JM, Panizo C, Debén G, Castilla C, et al. Identification of Leptomeningeal Disease in Aggressive B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma: Improved Sensitivity of Flow Cytometry. *J Clin Oncol.* 2009;27(9):1462-1469. doi:10.1200/JCO.2008.17.7089
5. de Graaf MT, de Jongste AHC, Kraan J, Boonstra JG, Smitt PAES, Gratama JW. Flow cytometric characterization of cerebrospinal fluid cells. *Cytometry B Clin Cytom.* 2011;80B(5):271-281. doi:10.1002/cyto.b.20603
6. de Jongste AH, Kraan J, van den Broek PD, Brooimans R, Bromberg JE, van Montfort KA, et al. Use of TransFixTM cerebrospinal fluid storage tubes prevents cellular loss and enhances flow cytometric detection of malignant hematological cells after 18 hours of storage: TransfixTM for CSF Flow Cytometry. *Cytometry B Clin Cytom.* 2014;86(4):272-279. doi:10.1002/cyto.b.21097
7. van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, Almeida J, van der Velden VHJ, Flores-Montero J, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia.* 2012;26(9):1908-1975. doi:10.1038/leu.2012.120
8. Subirá D, Castañón S, Aceituno E, Hernández J, Jiménez-Garófano C, Jiménez A, et al. Flow Cytometric Analysis of Cerebrospinal Fluid Samples and Its Usefulness in Routine Clinical Practice. *Am J Clin Pathol.* 2002;117(6):952-958. doi:10.1309/123P-CE6V-WYAK-BB1F
9. Del Principe MI, Buccisano F, Soddu S, Maurillo L, Cefalo M, Piciocchi A, et al. Involvement of central nervous system in adult patients with acute myeloid leukemia: Incidence and impact on outcome. *Semin Hematol.* 2018;55(4):209-214. doi:10.1053/j.seminhematol.2018.02.006