

# Evaluación de la utilidad diagnóstica de la citometría de flujo y la citología para estudio de compromiso de líquido cefalorraquídeo en leucemias agudas en un hospital público chileno

Eduardo Fernández<sup>2</sup>, Carlos Vásquez<sup>1</sup>, Luis Urrutia<sup>1</sup>, Casandra Jara<sup>3,a</sup>, Carlos Veas<sup>3,a</sup>, Mauricio Chandía<sup>3,4\*</sup>.

Assessment of the Diagnostic Utility of Cerebrospinal Fluid Flow Cytometry Immunophenotyping and Cytology in Acute Leukemias at a Public Chilean Hospital

## RESUMEN

El diagnóstico de la presencia de blastos en el líquido cefalorraquídeo (LCR) en leucemias agudas (LA) se realiza mediante técnicas como la citometría de flujo (CMF) y la citología convencional (CC). El objetivo del presente trabajo es evaluar la frecuencia de compromiso de LCR en LA por ambas técnicas en nuestro centro.

**Métodos:** Se analizaron 308 muestras de LCR pertenecientes a 175 pacientes, 57% de sexo masculino, con una mediana de edad de 46 años (1-70 años). Los diagnósticos fueron leucemia aguda linfoblástica B (LLA-B, 84%), leucemia aguda linfoblástica T (LLA-T, 5%), leucemia aguda mieloblástica (LMA, 11%). El inmunofenotipo se realizó con panel de 8 colores adaptado al diagnóstico.

**Resultados:** La proporción de muestras de LCR no valorables en LA fue mayor para CC (46%) que para CMF (4%) ( $p < 0,05$ ). Globalmente, se encontró infiltración en 78/308 muestras por CMF (25,3%) y en 8/77 por CC (10,4%) ( $p < 0,0001$ ). En LLA-B 70/259 muestras fueron positivas (27%) y LMA 6/34 (17%). No hubo casos CC+ en LMA ni LLA-T. Las muestras que fueron CMF+/CC+ tuvieron infiltración mayor (59,5%) en relación a las CMF+/CC- (30%) ( $p < 0,0001$ ). **Conclusiones:** La CMF detecta más del doble de casos positivos para blastos en LCR en LA que la CC y por lo tanto es un complemento adecuado para su uso de rutina junto con esta técnica.

**Palabras clave:** Citología; Citometría de Flujo; Leucemia; Líquido Cefalorraquídeo.

<sup>1</sup>Departamento de Pediatría, Facultad de Medicina, Universidad de Concepción. Concepción, Chile.

<sup>2</sup>Residente de Pediatría, Facultad de Medicina, Universidad de Concepción. Concepción, Chile.

<sup>3</sup>Unidad de Anatomía Patológica, Hospital Guillermo Grant Benavente. Concepción, Chile.

<sup>4</sup>Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Concepción. Concepción, Chile.

<sup>a</sup>Bioquímico, MSc.

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

Fuente apoyo financiero:  
Proyecto VRID (216.088.027-10),  
Universidad de Concepción.

Recibido: 12 de marzo de 2023.  
Aceptado: 11 de julio de 2024.

**ABSTRACT**

*The diagnosis of blast cell presence in cerebrospinal fluid (CSF) in acute leukemias (AL) is made using techniques such as flow cytometry (FCM) and conventional cytology (CC). This study aims to evaluate CSF blast cell presence frequency in LA using both techniques (CC and FCM) in our center. **Methods:** We analyzed three hundred and eight CSF samples belonging to 175 patients, 57% male, with a median age of 46 years (1-70 years) were analyzed. Diagnoses were acute B lymphoblastic leukemia (B-ALL, 84%), acute T lymphoblastic leukemia (T-ALL 5%), acute myeloblastic leukemia (AML, 11%). The immunophenotype was performed with an 8-color panel adapted to the diagnosis. **Results:** The proportion of non-assessable CSF samples in LA was higher for CC (46%) than FCM (4%) ( $p < 0.05$ ). Overall, infiltration was found in 78/308 samples by FCM (25.3%) and in 8/77 by CC (10.4%) ( $p < 0.0001$ ). Seventy of 259 samples were positive in B-ALL (27%) and 6/34 in AML (17%). There were no CC+ cases in AML or T-ALL. The samples that were FCM+/CC+ had more significant infiltration (59.5%) than CMF+/CC- ones (30%) ( $p < 0.0001$ ). **Conclusions:** CMF detects more than twice as many CSF blast-positive cases in LA as CC and is, therefore, suitable for routine use along with CC.*

**Keywords:** Cerebrospinal fluid; Cytology; Flow cytometry; Leukemia.

En pacientes con leucemias agudas (LA), el compromiso del sistema nervioso central (SNC) puede producirse al diagnóstico o a la recaída y está asociado a un pronóstico adverso<sup>1</sup>. La frecuencia reportada al diagnóstico en adultos varía según el tipo de LA, siendo más frecuente en leucemia aguda linfoblástica (LLA, 4-7%) en comparación con leucemia aguda mieloblástica (LMA, 1-3%)<sup>2</sup>. Los factores de riesgo de aparición son múltiples y se asocian a fenotipo linfóide T, presencia de cromosoma Philadelphia en LLA-B, hiperleucocitosis, expresión de CD56 y diferenciación monocítica y mielomonocítica en LMA, entre otros<sup>3</sup>. Puede presentarse en pacientes asintomáticos, o producir síntomas relacionados a compromiso de pares craneanos u otras manifestaciones neurológicas. La terapia de esta complicación se realiza con administración sistémica e intratecal de drogas con penetración en SNC (ej: metotrexato o citarabina) y/o radioterapia del SNC, con lo cual se logra disminuir en forma significativa la frecuencia de recaída

en SNC en LLA-B de 30% a menos del 10%<sup>4,5</sup>.

El diagnóstico de compromiso de SNC en LA se estudia en muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) obtenidas habitualmente por punción lumbar (PL), con técnicas como la citología convencional (CC) y la citometría de flujo (CMF), asociado a otras técnicas de imágenes como la resonancia magnética<sup>2</sup>. La CC está ampliamente disponible, puede complementarse con inmuno-histoquímica y tiene menor coste, sin embargo, tiene menos sensibilidad que la CMF y reporta con mayor frecuencia muestras acelulares o no valorables y su interpretación es compleja en presencia de linfocitos reactivos. La CMF favorece la adquisición de una mayor cantidad de eventos y permite el análisis simultáneo de una mayor cantidad de parámetros, lo que aumenta su sensibilidad<sup>6</sup>.

En este trabajo nos propusimos revisar la contribución de ambas técnicas en el diagnóstico de diseminación meníngea de pacientes con LA en nuestra institución.

## Material y Métodos

Se realizó un estudio descriptivo, observacional y retrospectivo. Se buscó en la base de datos del laboratorio de citometría de flujo del Hospital "Dr. Guillermo Grant Benavente" (HGGB) muestras de LCR en pacientes con diagnóstico de leucemia aguda en el periodo comprendido entre enero de 2014 a diciembre de 2018 atendidos en el HGGB. Las muestras fueron obtenidas mediante punción lumbar en tubos acondicionados con EDTA y estabilizante celular (Transfix®). En el caso de la LLA el estudio se realizó en todos los pacientes al diagnóstico y durante el seguimiento de acuerdo a lo señalado en el protocolo de quimioterapia y en los pacientes con LMA de acuerdo a indicación del médico tratante al final de la inducción. Se registraron variables relacionadas a características demográficas (sexo, edad, diagnóstico de referencia) y técnicas relacionadas con la muestra (aptitud para evaluación, tipos de poblaciones celulares identificadas, presencia de infiltración por blastos leucémicos, porcentaje de infiltración en los casos que fueron positivos).

El inmunofenotipo por citometría de flujo se realizó con panel de 8 colores, siguiendo el protocolo publicado por el consorcio EuroFlow<sup>7</sup>. En todos los casos se incluyó CD45 V500, CD14 (APC o APC-H7) para identificación de monocitos y CD3 (APC o APC-H7) para la identificación de linfocitos T y CD34 PerCP-Cy5.5. En LLA-B se agregó CD10 PE, CD19 PE-Cy7 y CD38 APC-H7. En LLA-T se agregó CD3 citoplasmático en V450 y en LMA HLA-DR V450, siendo el resto de las posiciones ocupadas por anticuerpos seleccionados de acuerdo al fenotipo del diagnóstico. Se consideró como población a la agrupación definida de al menos 5 eventos con fenotipo similar. La adquisición se realizó en citómetro FACSCantoII® mediante software DIVA (BD Biosciences, San José, California). El análisis de citometría se realizó por software Infinicyt® (Cytognos, Salamanca, España). En 77 muestras se realizó en forma simultánea CMF y CC, siendo de ellas 36 consideradas como no valorables o acelulares. La citología se realizó

de acuerdo a método convencional en el laboratorio de anatomía patológica del HGGB. 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  $\chi^2$  para analizar diferencias entre variables categóricas y t de Student y U de Mann-Whitney para variables numéricas. El análisis estadístico se realizó con software estadístico SPSS, considerando significativa una  $p < 0,05$ .

## Resultados

Se obtuvo en total 308 muestras de LCR pertenecientes a 175 pacientes. Cincuenta y tres por ciento fueron de sexo masculino, con una mediana de edad de 16 años (1-70). Los diagnósticos fueron LLA-B (259/308, 84%), LLA-T (15/308, 5%) y LMA (36/308, 11%).

De las muestras analizadas por CMF, sólo un 4% fueron no valorables, mientras que por CC 46% ( $p < 0,05$ ). En las muestras analizadas por CMF, en la gran mayoría se observaron monocitos (94%) y linfocitos T (98%).

Globalmente, se encontró infiltración en 78/308 muestras analizadas por CMF (25,3%) y en 8/77 analizadas por CC (10,4%) ( $p < 0,0001$ ). En LLA-B hubo 70/259 muestras que fueron positivas (27%) y en LMA 6/34 (17%). Por medio únicamente de CC no se pudo identificar casos positivos o sugerentes de infiltración meníngea en LLA-T ni en LMA (Tabla 1).

Del total de muestras analizadas por CMF y CC ( $n = 77$ ), 41 fueron consideradas valorables por ambos métodos, observándose 13/41 muestras positivas por CMF (32%) y 7/41 muestras positivas para CC (17%) ( $p < 0,0001$ ) (Tabla 2). En los casos positivos hubo algunos sólo diagnosticados por CMF (8/13) y otros sólo por CC (2/7) (Tabla 2). Las muestras que fueron positivas por ambas técnicas tuvieron un promedio de infiltración mayor (59,5%) en relación a las positivas sólo por CMF (30%) ( $p < 0,0001$ ) (Figura 1).

**Tabla 1.** Diagnóstico clínico de los pacientes estudiados de acuerdo al resultado del estudio de LCR por citometría de flujo y citología convencional.

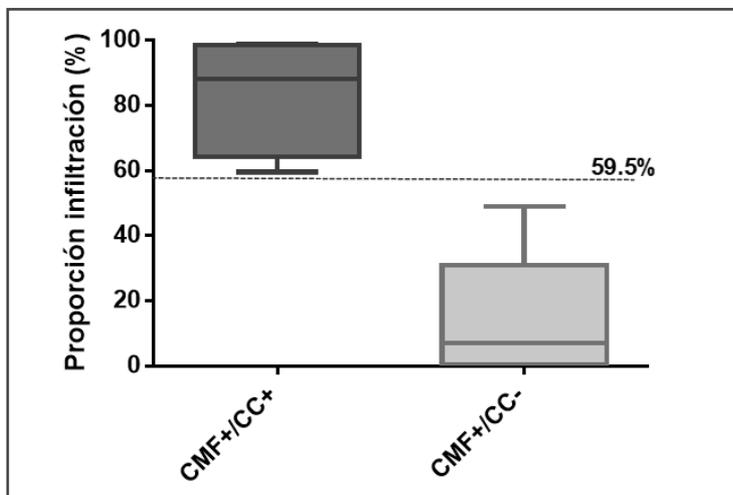
Diagnósticos	n	Muestras positivas	
		CMF+ n (%)	CC+ n (%)
LLA-B	259	62 (24)	8 (3)
LLA-T	15	10 (66)	0 (0)
LMA	34	6 (17)	0 (0)
Total	308	78/308 (25,3%)	8/77 (10,4%)

CMF: citometría de flujo; CC: citología convencional; LLA-B: leucemia aguda linfoblástica B; LLA-T: leucemia aguda linfoblástica T; LMA: leucemia aguda mieloblástica.

**Tabla 2.** Comparación de resultados de muestras de LCR estudiadas simultáneamente por citometría de flujo y citología convencional, considerando sólo las que fueron valorables (n= 41).

	CMF+	CMF-	
CC+	5	2	7/41 (17%)
CC-	8	26	34/41 (83%)
	13/41 (32%)	28/41 (68%)	

CMF: citometría de flujo; CC: citología convencional.



**Figura 1:** Proporción de infiltración por células tumorales respecto a la celularidad total en muestras de LCR positivas por citometría de flujo y citología convencional (CMF+/CC+) en relación a las positivas solo por CMF (CMF+/CC-). CMF: citometría de flujo; CC: citología convencional.

## Discusión

El presente estudio demuestra que la CMF es más sensible que la CC para el diagnóstico de infiltración por blastos en LCR de pacientes con LA. En nuestra serie la CMF demostró más del doble de casos positivos respecto de la CC, similar a lo reportado por otros autores<sup>8,5,9</sup>. La CMF puede evidenciar hasta 0,01% de células malignas, permitiendo la detección de enfermedad silente, o sea aquella que ocurre en pacientes CMF+/CC<sup>-2</sup>. La principal desventaja de la CMF se produce por la escasa viabilidad de la muestra una vez extraída, lo cual puede falsamente disminuir los recuentos celulares y la sensibilidad del ensayo. La CC sigue siendo la técnica de elección recomendada en las guías CAP-ASH, recomendándose la CMF para los casos en que exista un informe dudoso de la CC<sup>10</sup>. La CC posee una alta especificidad (>95%), adoleciendo de menor sensibilidad, con aproximadamente 45% de muestras negativas en pacientes con LA y sospecha de compromiso del SNC<sup>8,9</sup>.

La detección de células tumorales en el LCR puede ser complejo debido a factores como la escasez de células de la muestra, contaminación con sangre periférica, el escaso volumen obtenido y la mala viabilidad del LCR, como se señaló anteriormente<sup>10</sup>. La cantidad de células de la muestra puede ser variable, reportándose hasta un 50% de casos de pacientes con recuento celular normal en hemopatías malignas<sup>11</sup>. Está demostrado que a media hora de extraído el LCR pierde cerca de un 50% de su viabilidad, lo que puede optimizarse con el empleo de estabilizante celular (e.g. Transfix<sup>®</sup>), que ha demostrado evitar pérdida de poblaciones celulares incluso después de 18 h de almacenamiento del LCR<sup>12,13</sup>. En nuestro reporte, el empleo rutinario de Transfix<sup>®</sup> asociado a los tubos de EDTA permitió obtener una alta frecuencia de muestras de LCR en LA valorables para análisis (94%).

La frecuencia de detección de blastos en LCR reportada por CMF en LLA-B es 20-30% y por CC 6-15%<sup>2,8,14</sup>. En nuestro estudio, la infiltración global fue 25,3% por CMF y 10,4% por CC, similares a las descritas en la literatura, correspondiendo en su mayoría a casos de LLA-B. En LMA existe menor

cantidad de información reportada respecto de la frecuencia de infiltración de SNC. Del Principe, et al. encontraron 33/103 muestras positivas ya sea por CC o CMF y de estas, 21 solo por CMF en una cohorte de pacientes con LMA en los cuales a todos se realizó PL al momento del diagnóstico<sup>15</sup>. En nuestro reporte, la frecuencia de infiltración por CMF (17%) provino de una muestra de pacientes seleccionados de acuerdo al riesgo. La CC no permitió la detección de blastos en LCR de LMA en nuestra serie.

El valor pronóstico de la infiltración en LCR está mejor establecido para las LLA, existiendo un pronóstico más adverso de sobrevida global y riesgo de recaída, incluso en casos de enfermedad oculta<sup>1,14</sup>. Por este motivo el tratamiento profiláctico de infiltración de SNC por blastos está contemplado en todos los pacientes con LLA, en quienes hay una mayor posibilidad de compromiso del SNC y de enfermedad silente en caso de utilizarse sólo CC. En el caso de las LMA no ocurre lo mismo, no habiéndose demostrado en todos los casos un mayor riesgo de recaída en SNC o sistémica<sup>15,16</sup>.

En los últimos años, nuevos avances en la CMF como la Chipcytometry y la citometría espectral han comenzado a reportar evidencia favorable para su futura incorporación en el estudio de LCR<sup>2</sup>. En el estudio morfológico, el empleo de contadores automatizados con visión digital para la identificación de blastos (Cellavision<sup>®</sup>) en LCR han demostrado tener una buena correlación con la microscopía convencional<sup>16</sup>.

Entre las limitaciones de nuestro reporte se encuentran su carácter retrospectivo y unicéntrico, lo que puede no reflejar la realidad de todos los hospitales públicos del país. Por otro lado, la indicación de la PL no fue consensuada con criterios preestablecidos en el caso de la LMA.

## Conclusiones

En este reporte hemos demostrado que, en nuestro medio, la CMF es más sensible que la CC para el diagnóstico de infiltración por blastos en el LCR de pacientes con leucemias agudas, constituyendo la técnica de elección como complemento a la CC en LA. Asimismo, el uso de preservante celular permite obtener una mayor cantidad de

muestras valorables por CMF. Estos factores permitirían el desarrollo de un protocolo de envío de muestras desde otros centros hacia laboratorios de referencia, con el fin de ampliar la cobertura para estudio de esta complicación por CMF.

### Agradecimientos

Se agradece apoyo recibido desde Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo de la Universidad de Concepción y al personal del laboratorio de citometría de flujo del Hospital Regional de Concepción.

### Referencias

- Córdova-Serrano RD, Almanza-Huante E, Fernández-Sánchez E, Hernández-Alcántara A, Espinosa-Bautista K. Central nervous system (CNS) involvement has an adverse impact on survival in newly diagnosed adult acute lymphoblastic leukemia (ALL) assessed by flow cytometry. *Leuk Lymphoma*. 2021; 62(13): 3264-3270. doi:10.1080/10428194.2021.1957872
- Frater JL, Shirai CL, Brestoff JR. Technological features of blast identification in the cerebrospinal fluid: A systematic review of flow cytometry and laboratory haematology methods. *Int J Lab Hematol*. 2022; 44(S1): 45-53. doi:10.1111/ijlh.13869
- Wu SY, Short NJ, Nasr L, Dabaja BS, Fang PQ. Central Nervous System Prophylaxis and Treatment in Acute Leukemias. *Curr Treat Options Oncol*. 2022; 23(12): 1829-1844. doi:10.1007/s11864-022-01032-5
- Law IP, Blom J. Adult acute leukemia: frequency of central system involvement in long term survivors. *Cancer*. 1977; 40(3): 1304-1306. doi:10.1002/1097-0142(197709)40:3<1304:aid-cnrcr2820400346>3.0.co;2-v
- Kantarjian H, Thomas D, O'Brien S, et al. Long-term follow-up results of hyperfractionated cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin, and dexamethasone (Hyper-CVAD), a dose-intensive regimen, in adult acute lymphocytic leukemia. *Cancer*. 2004; 101(12): 2788-2801. doi:10.1002/cncr.20668
- Ahluwalia MS, Wallace PK, Peereboom DM. Flow cytometry as a diagnostic tool in lymphomatous or leukemic meningitis. *Cancer*. 2012; 118(7): 1747-1753. doi:10.1002/cncr.26335
- van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, 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
- Dass J, Dayama A, Mishra PC, et al. Higher rate of central nervous system involvement by flow cytometry than morphology in acute lymphoblastic leukemia. *Int J Lab Hematol*. 2017; 39(5): 546-551. doi:10.1111/ijlh.12694
- Del Principe MI, Buzzatti E, Piciocchi A, Forghieri F, Bonifacio M, Lessi F, et al. Clinical significance of occult central nervous system disease in adult acute lymphoblastic leukemia. A multicenter report from the Campus ALL Network. *Haematologica* 2021; 106(1): 39-4553.
- de Haas V, Ismaila N, Advani A, et al. Initial Diagnostic Work-Up of Acute Leukemia: ASCO Clinical Practice Guideline Endorsement of the College of American Pathologists and American Society of Hematology Guideline. *J Clin Oncol*. 2019; 37(3): 239-253. doi:10.1200/JCO.18.01468
- Bromberg JEC, Breems DA, Kraan J, 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
- Dux R, Kindler-Röhrborn A, Annas M, Faustmann P, Lennartz K, Zimmermann CW. A standardized protocol for flow cytometric analysis of cells isolated from cerebrospinal fluid. *J Neurol Sci*. 1994; 121(1): 74-78. doi:10.1016/0022-510X(94)90159-7
- de Jongste AH, Kraan J, van den Broek PD, et al. Use of TransFix™ cerebrospinal fluid storage tubes prevents cellular loss and enhances flow cytometric detection of malignant hematological cells after 18 hours of storage: Transfix™ for CSF Flow Cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*. 2014; 86(4): 272-279. doi:10.1002/cyto.b.21097
- García KLA, Cherian S, Stevenson PA, et al. Cerebrospinal fluid flow cytometry and risk of central nervous system relapse after hyperCVAD in adults with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*. 2022; 128(7): 1411-1417. doi:10.1002/cncr.34073
- Del Principe MI, Buccisano F, Soddu S, 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
- Riedl JA, Dinkelaar RB, van Gelder W. Automated morphological analysis of cells in body fluids by the digital microscopy system DM96. *J Clin Pathol*. 2010; 63(6): 538-543. doi:10.1136/jcp.2009.072975