

ARTÍCULO ORIGINAL

Comparación entre el análisis citológico convencional y citometría de flujo para el diagnóstico de infiltración del sistema nervioso central en pacientes con leucemias y linfomas

Ceres, Verónica Luján^{1*}; Giménez, Cintia Lorena²; Aut, Mariangeles³; Altube, Alejandra³; Rocher, Adriana²

¹Hospital de Clínicas José de San Martín, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

²Laboratorio de Citología, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

³Hospital de Clínicas José de San Martín, Área Citometría de flujo, División Hematología, Universidad Nacional de Buenos Aires. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

*Contacto: Ceres, Verónica Luján, Hospital de Clínicas José de San Martín, Av. Córdoba 2351 [C1121ABJ], CABA, Argentina; veronica_ceres@hotmail.com.

Resumen

Introducción: la infiltración del sistema nervioso central (SNC) es una complicación muy frecuente en aquellos pacientes que presentan leucemias o linfomas agresivos. Impacta negativamente no sólo en la evolución de la patología sino también en la calidad de vida de los pacientes. Es por ello que la detección de células patológicas en el líquido cefalorraquídeo (LCR) es de suma importancia para instaurar una terapéutica rápida. Entre las técnicas propuestas para mejorar la eficiencia en el análisis del líquido cefalorraquídeo, se encuentran la citología convencional (CC) y la citometría de flujo (CMF). **Objetivos:** comparar la sensibilidad y especificidad diagnóstica y el grado de concordancia de la CC con la de la CMF para la detección de células patológicas en LCR de pacientes con diagnóstico de leucemia o linfoma. **Materiales y métodos:** se llevó a cabo un estudio retrospectivo donde se comparó la sensibilidad y especificidad de la CC y la CMF en 28 muestras de LCR de pacientes con diagnóstico de leucemia o linfoma derivadas a ambos servicios del Hospital de Clínicas José de San Martín, durante el período comprendido entre Octubre de 2017 y Abril de 2019. **Resultados:** la sensibilidad y especificidad diagnóstica de la infiltración del SNC fue significativamente menor por CC (20 % y 85 %, respectivamente) que por CMF. **Conclusiones:** el estudio del LCR es sumamente complicado, debido a que representa una muestra con muy escasa celularidad. Es por ello que se sugiere emplear tanto la citomorfología como la CMF de forma complementaria para poder optimizar su análisis, ya que ambas técnicas aportan información necesaria para el diagnóstico de infiltración neuromeníngea. Esto no sólo aportaría mayor información sino también mejoraría la detección de células neoplásicas en LCR y disminuiría la tasa de falsos negativos.

Palabras clave: citología, citometría de flujo, leucemia, linfoma, sistema nervioso central.

Comparison of conventional cytology and flow cytometry for detection of central nervous system infiltration in leukemia and lymphoma.

Abstract

Introduction: Infiltration of the central nervous system (CNS) is a common complication in patients with diagnosis of leukemia or aggressive lymphoma. This complication has a negative impact not only on the patients' outcome but also on their lifestyle. Detection of pathological cells is important to implement a rapid therapy. To improve the effectiveness of cerebrospinal fluid (CSF) analysis, conventional cytology (CC) and flow cytometry (FC) have been proposed to be the best methods if used in a complementary way. **Objective:** To compare the diagnostic sensitivity and specificity of CC to FC for detection of pathological cells in CSF of patients with diagnosis of leukemia or lymphoma. **Materials and methods:** Retrospective study to compare the sensitivity and specificity of CC and FC. A total of 28 samples of CSF from patients with diagnosis of leukemia or lymphoma were analyzed by CC and FC between October 2017 and April 2019. **Results:** CC showed lower sensitivity and specificity (20% and 85%, respectively) than FC. **Conclusion:** CSF study is difficult, due to poor cellularity. Using CC and FC in a complementary way improves the analysis, because both techniques contribute to the diagnosis of neuromeningeal infiltration.

Key words: cytology, flow cytometry, leukemia, central nervous system, lymphoma.

Introducción

Las neoplasias hematológicas constituyen un grupo de enfermedades malignas que se generan como resultado de la expansión clonal de células hematopoyéticas. El estado de diferenciación de la transformación celular determina el fenotipo de la enfermedad [1].

La infiltración del SNC en pacientes con leucemia o linfomas agresivos suele ocurrir en un 5-15 % de los casos [2], lo cual reporta un mal pronóstico y afecta la calidad de vida de los pacientes, no sólo debido a la propia infiltración neuromeníngea sino también a la toxicidad derivada de los tratamientos dirigidos contra el SNC [3]. Se considera como diagnóstico de infiltración meníngea la presencia de células patológicas en LCR, independientemente de si el recuento leucocitario es o no patológico. El diagnóstico de la afectación neuromeníngea es sumamente complejo, debido a la escasa celularidad del LCR. Es por ello que, frente a la negatividad de una única muestra o resultados discordantes, podría ser necesario el análisis de nuevas muestras o el empleo de técnicas de diagnóstico más sensibles, particularmente en aquellos casos donde existe una elevada sospecha de infiltración del SNC [4].

El estudio citológico del LCR es considerado como la técnica *gold standard*, aunque su baja sensibilidad podría llevar a un retraso en el diagnóstico y la instauración de un correcto tratamiento. Por esta razón, han surgido metodologías con mayor sensibilidad, como la citometría de flujo (CMF), cuyo empleo para el diagnóstico de la infiltración neuromeníngea es recomendado de forma complementaria con la citología convencional (CC), según *National Comprehensive Cancer Network* [5, 6].

El objetivo de este estudio fue comparar el grado de concordancia y la sensibilidad y especificidad diagnóstica de la CC respecto de la CMF para la detección de infiltración del SNC en pacientes con diagnóstico de leucemia o linfoma.

Materiales y métodos

Se realizó un estudio retrospectivo en el que se compararon muestras de LCR de pacientes con diagnóstico de leucemia o linfoma, que habían sido enviadas tanto al laboratorio de Citología como al de Citometría de flujo del Hospital de Clínicas José de San Martín, durante el período comprendido entre octubre de 2017 y abril de 2019, todos ellos con la sospecha de infiltración del SNC. Para ello, se realizó una búsqueda manual de los infor-

Tabla I. Comparación de resultados obtenidos por citología y citometría de flujo.

	Positivos	Negativos
Citología	1 (4 %)	27 (96 %)
Citometría de flujo	5 (18 %)	23 (82 %)
Citometría de flujo		
	Positivo	Negativo
Citología	Positivo	1
	Negativo	4

mes definitivos correspondientes a ambas secciones.

Para el análisis comparativo, se excluyeron 36 muestras de LCR por no haber sido derivadas para el estudio mediante CMF.

Para el análisis citológico, se realizó la centrifugación de un volumen mínimo de 0,3 mL de muestra a 1500 rpm, durante 5 minutos, en citocentrífuga (Cytospin Hanill Science Industrial). Se obtuvo una monocapa celular concentrada en un área de 6 mm de diámetro, donde se evaluó la celularidad y se realizó el recuento diferencial, utilizando la coloración de May-Grünwald Giemsa. El recuento celular total se realizó en cámara de Neubauer. Los recuentos se efectuaron por duplicado.

Para el estudio por CMF, las muestras fueron recogidas con una solución estabilizante de membrana (TransFix™). Al total de la muestra se le agregaron 3 - 5 mL de PBS-albúmina y se centrifugó durante 8 minutos a 500g. El sobrenadante se aspiró y el pellet fue nuevamente suspendido con 300 uL de PBS-albúmina. Se procedió a la marcación de una alícuota de 100 uL, según el protocolo de marcación recomendado por el Consorcio Europeo Euroflow. Se agregaron 2 mL de PBS-albúmina y se volvió a centrifugar 5 minutos a 500 g. Para el análisis, se empleó un citómetro de flujo Navios™ (Beckman Coulter), utilizando el software de análisis Infinicyt 2.0.

Resultados

Se compararon 28 muestras de LCR de pacientes con diagnóstico de leucemia o linfoma (13 leucemias y 15 linfomas), que fueron analizadas tanto por citología convencional con citocentrífugación como por citometría de flujo.

En 5 muestras analizadas por citometría de flujo, se detectaron blastos o células patológicas; 3 de los casos correspondieron a leucemia linfoblástica aguda y 2, a linfoma, mientras que por citología, solo 1 de las 28 muestras demostró presencia de células inmaduras (Tabla I).

Tomando como *gold standard* el empleo de CMF, la sensibilidad y especificidad diagnóstica de CC fue significativamente baja (Tabla II).

Además, se evaluó el grado de concordancia entre ambas técnicas y se obtuvo un índice *kappa* bajo, lo cual indica un grado de concordancia débil entre ambas técnicas (Tabla III).

Realizando la evaluación de la distribución etaria de las muestras que se incluyeron en el estudio comparativo, se observó que correspondían principalmente a pacientes adultos y que sólo dos de las 28 muestras analizadas pertenecían a pacientes pediátricos, mientras que las 36 muestras que habían sido excluidas del estudio comparativo por no haber sido derivadas al Laboratorio de Citometría de flujo correspondían, en su mayoría, a pacientes menores de 18 años (Tabla IV).

Tabla II. Sensibilidad y especificidad del análisis citomorfológico respecto del empleo de CMF.

	Citología	Citometría de flujo
Sensibilidad	20 %	100 %
Especificidad	85 %	100 %

Tabla III. Grado de concordancia entre citología convencional y citometría de flujo.

Índice Kappa	Error estándar	IC 95 %	Fuerza de concordancia
0,291	0,328	[0,352 - 0,943]	Débil

Discusión

En general, el LCR contiene una escasa celularidad, lo cual hace que la sensibilidad del análisis de una única muestra sea de alrededor del 50 % y que se incremente a un 85 - 90 %, cuando se realizan nuevas punciones [?].

Los datos de sensibilidad y especificidad (20 % y 85 %, respectivamente) del análisis de muestras de LCR por CC obtenidos en el estudio comparativo fueron significativamente menores que los que se encuentran reportados en la bibliografía, donde alcanzan valores de sensibilidad del 50 % y de especificidad mayores a 95 %, cuando el análisis es realizado por un citólogo capacitado [8].

A pesar de que la evaluación mediante citología con citocentrifugación demostró una sensibilidad y especificidad baja, presenta la ventaja de aportar información acerca de la morfología de las células.

Algunos autores concluyen que la utilización de CMF y CC en conjunto incrementa la detección de células patológicas en LCR en un 50 %, respecto de la utilización de citología solamente [9, 10]. Además, incrementa la especificidad a valores cercanos al 100 %, disminuyendo significativamente la aparición de falsos negativos [11], por lo que se sugiere la utilización de CC y CMF de manera complementaria.

La Sociedad Argentina de Hematología (SAH) establece que el diagnóstico de afectación neuromeníngea en adultos se realice empleando ambas técnicas, mientras que recomienda la evaluación del estatus de afectación neuromeníngea en pacientes pediátricos mediante citología convencional con *cytospin* junto con otros criterios, como: estudio de imágenes, fondo de ojos y evaluación clínica del paciente. Es por ello que la mayoría de las muestras que se habían excluido del análisis comparativo, por no haber sido derivadas para la evaluación por citometría de flujo, correspondían a población pediátrica [12].

En las *Guías de diagnóstico y tratamiento* de 2019 redactadas por la SAH, se establece que no existe una clara evidencia de ventaja clínica del empleo de CMF por sobre CC, por lo que surge la necesidad de obtener información adicional para determinar la importancia clínica de la CMF positiva en ausencia de células patológicas morfológicamente evidentes [13]. Evaluando los resultados obtenidos en este trabajo, podemos observar que en la mayoría de los casos donde por CMF se evidenció infiltración neuromeníngea, por CC la prueba fue negativa, lo cual destaca la necesidad del empleo de metodologías más sensibles para arribar al diagnóstico correcto.

Como conclusión de este trabajo, teniendo en cuenta la importancia tanto en el pronóstico como en la terapéutica atribuida al compromiso del SNC en pacientes con neoplasias hemat-

Tabla IV. Muestras analizadas por citología y/o citometría de flujo.

	Pediátricas [N]	Adultos [N]
Citología	28	36
Citometría de flujo	2	26
Citología y citometría de flujo	2	26

lógicas, observamos que es de suma importancia poder contar con estrategias que permitan aumentar la capacidad de identificar la presencia de células patológicas en LCR.

Se debería analizar si, a pesar del mayor costo, se debe complementar la CC con CMF, en todos los casos de sospecha de infiltración neuromeníngea. Esto no sólo aportaría mayor información sino también mejoraría la detección de células neoplásicas en LCR y disminuiría la tasa de falsos negativos.

Referencias bibliográficas

- [1]. Rodríguez, DRI. Neoplasias hematológicas. En: Tratado de geriatría para residentes, Sociedad Española de Geriatría y gerontología. Pp. 667. International Marketing Communication.
- [2]. Chamberlain, MC. Carcinomatous Meningitis. Arch Neurol 1997; 54(1):16-17.
- [3]. Sancho, JMC. Avances en el diagnóstico y tratamiento, y significado pronóstico de la infiltración neuromeníngea en leucemias agudas y linfomas agresivos, in Facultad de Medicina 2011, Universidad Autónoma de Barcelona.: Barcelona. p. 23-24.
- [4]. Chamberlain, MC. Neoplastic Meningitis. J Clin Oncol 2005; 23(15): 3605-13.
- [5]. Pui CH, Thiel E. Central nervous system disease in hematologic malignancies: historical perspective and practical applications. Semin Oncol 2009; 36(4):S2-S16.
- [6]. Brem, SS, Bierman, PJ, Brem, H, Butowski, N, Chamberlain, MC, Chiocca, EA, Wen, PY. Central Nervous System Cancers J Natl Compr Can Netw 2011; 9(4): 352-400.
- [7]. Thomas JE, Falls E, Velasco ME, Zaher A. Diagnostic value of immunocytochemistry in leptomeningeal tumor dissemination. Arch Pathol Lab Med 2000; 124:759-61.
- [8]. Chamberlain MC, Glantz M, Groves MD, Wilson WH. Diagnostic Tools for Neoplastic Meningitis: Detecting Disease, Identifying Patient Risk, and Determining Benefit of Treatment. Seminars in Oncology 2011; 36: S35-S45.
- [9]. French CA, Dorfmann DM, Shaheen G, Cibas ES. Diagnosing lymphoproliferative disorders involving the cerebrospinal fluid: increased sensitivity using flow cytometric analysis. Diagn Cytopathol 2000; 23: 369-374.
- [10]. Roma AA, Garcia A, Avagnina A, Rescia C, Elsner, B. Lymphoid and myeloid neoplasms involving cerebrospinal fluid: Comparison of morphologic examination and immunophenotyping by flow cytometry. Diagn Cytopathol

- 2002; 27(5): 271-75.
- [11]. Ahluwalia, MS, Wallace, PK, Peereboom, DM. Flow cytometry as a diagnostic tool in lymphomatous or leukemic meningitis. *Cancer* 2011; 118(?): 1747-53.
- [12]. Sociedad Argentina de Hematología. Leucemias agudas. En: Guías de Diagnóstico y Tratamiento: Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Sociedad Argentina de Hematología; 2017; 342-49.
- [13]. Sociedad Argentina de Hematología. Leucemias agudas. En: Guías de Diagnóstico y Tratamiento: Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Sociedad Argentina de Hematología; 2019; 383.