



Estudio de concordancia entre citología convencional y citometría de flujo en la identificación de infiltración neoplásica del líquido cefalorraquídeo en pacientes con diagnóstico de leucemia aguda

SANDRA MILENA QUIJANO GÓMEZ¹, PAULA CAROLINA GUZMÁN CRUZ²,
ILIANA DE LOS REYES VALENCIA³, MARÍA ADELAIDA CÓRDOBA⁴

Cómo citar: Quijano Gómez SM, Guzmán Cruz PC, De Los Reyes Valencia I, Córdoba MA. Estudio de concordancia entre citología convencional y citometría de flujo en la identificación de infiltración neoplásica del líquido cefalorraquídeo en pacientes con diagnóstico de leucemia aguda. Univ Med. 2016;57(2):163-70. doi: <http://dx.doi.org/10.11144/Javeriana.umed57-2.eccc>

Resumen

Introducción: la leucemia aguda es el cáncer más frecuente en la infancia. Las manifestaciones clínicas son sistémicas y la infiltración al sistema nervioso central es infrecuente e impacta su tratamiento y pronóstico. Se han implementado diferentes técnicas como citometría de flujo (CMF) y citometría convencional (CC) para mejorar la eficiencia en el diagnóstico de blastos en el líquido cefalorraquídeo (LCR). **Métodos:** estudio retrospectivo de concordancia entre la CMF y CC para determinar la presencia de blastos en el LCR en pacientes pediátricos con diagnóstico

- 1 Bacterióloga. Maestría en Microbiología y Oncología. PhD en Biología y Clínica del Cáncer, Unidad de Citometría, Hospital Universitario San Ignacio. Profesora asistente del Departamento de Microbiología, Grupo de Inmunobiología y Biología Celular, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- 2 Médica pediatra, oncóloga, epidemióloga clínica, Hospital Universitario San Ignacio. Profesora, Departamento de Pediatría, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- 3 Médica pediatra, oncóloga, Hospital Universitario San Ignacio. Profesora del Departamento de Pediatría, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- 4 Médica pediatra, Hospital Universitario San Ignacio. Profesora del Departamento de Pediatría, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

Recibido: 30/07/2015

Revisado: 23/09/2015

Aceptado: 04/11/2015

de leucemia aguda. **Resultados:** se analizaron 111 muestras de 34 pacientes, de los cuales solo 6 eran de bajo riesgo (17,6%). De las 111 muestras, solo en 37 se reportaron empleando CC y CMF. La concordancia entre las dos técnicas fue satisfactoria cuando las dos pruebas eran negativas kappa (0,80 a 0,96). **Conclusiones:** el diagnóstico de infiltración al sistema nervioso central se debe optimizar, y en la actualidad contamos con dos técnicas de características operativas diferentes. A pesar de que la CMF se reporta como un método más sensible, tiene mayores costos y con el trabajo solo se demuestra buena concordancia con la CC cuando es negativa; por lo anterior, se requieren más estudios para determinar si se debe cambiar a la citología que en la actualidad es el patrón de referencia.

Palabras clave: citología, citometría, leucemia, sistema nervioso central.

Title: Concordance Study between Conventional Cytology and Flow Cytometry for Identifying Neoplastic Infiltration of the Cerebrospinal Fluid in Patients with Acute Leukemia

Abstract

Introduction: Acute leukemia is the most common childhood cancer. The clinical manifestations are systemic and infiltration to central nervous system is uncommon and impact on the treatment and prognosis. It has been implemented different techniques as CMF and CC, in order to improve efficiency in diagnosing CSF blasts. **Methods:** Retrospective study of agreement between the CPM and CC to determine the presence of blasts in the CSF in pediatric patients with a diagnosis of acute leukemia. **Results:** 111 samples from 34 patients, of whom only 6 were low risk (17.6%) were analyzed. Of the 111 samples found, only 37 concurrent CC and CPM report. The agreement between the 2 techniques was satisfactory when the 2 tests were negative kappa (0.80 to 0.96). **Conclusions:** The diagnosis

of CNS infiltration should be optimized; and today we have 2 techniques of different operating characteristics. Although the CPM is reported as a more sensitive method has higher costs and work only good agreement was shown by the CC when it is negative, the above further studies are needed to determine whether should switch to the cytology is currently the gold standard.

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

Introducción

La leucemia aguda es un trastorno linfoproliferativo clonal que afecta la médula ósea. Es también la neoplasia infantil más frecuente y representa el 30% de todos los tumores malignos de la infancia en menores de 15 años de edad. La leucemia linfoblástica aguda es cinco veces más común que la leucemia mieloide aguda [1-5].

La leucemia aguda se caracteriza por ser una proliferación de células tumorales, fundamentalmente blastos, que reemplazan las células normales en órganos y tejidos con las consecuentes manifestaciones por fallo medular e infiltración extramedular [5,6]. La implicación leucémica del sistema nervioso central en el momento del diagnóstico es un hallazgo poco común, que ocurre en menos del 5% de los pacientes [7,8]; se asocia con mal pronóstico y requiere un tratamiento específico e intensivo [9].

En la actualidad, se reconoce que el diagnóstico precoz de infiltración neo-

plásica podría contribuir a mejorar su evolución y a realizar un mejor seguimiento de los pacientes con riesgo de recaída en el sistema nervioso central [2]. Ante tal situación, en los últimos años, grupos expertos en citometría de flujo (CMF) han demostrado la utilidad de esta técnica en la identificación y en la cuantificación de células tumorales en el sistema nervioso central, en comparación con metodologías poco sensibles como la citología convencional (CC), que continúa siendo la técnica de referencia. Estos estudios se han realizado principalmente en muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con linfomas agresivos y han demostrado la elevada sensibilidad de la CMF respecto de la CC, ya que puede identificar mínimas poblaciones de células tumorales (<0,1%) en LCR, con elevado valor predictivo positivo y negativo [2,3].

Se considera que la CMF es significativamente superior, respecto de la CC, en su capacidad de detectar enfermedad leptomenígea en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda tipo B en el momento del diagnóstico o en la recaída de la enfermedad, y esto puede tener, además, una repercusión clínica en términos de mayor incidencia de recaída, lo que implicaría considerar un cambio en la terapia propuesta [10].

En nuestra institución se pueden tomar dos muestras de LCR y el servicio de citometría las analiza empleando una

metodología estandarizada que asegura su calidad en las fases preanalítica y analítica. En el momento de su obtención, las muestras de LCR se preservan con el estabilizante comercial validado en clínica TransFix™; además, se usan protocolos de marcaje en combinaciones de 6-8 fluorescencias, recomendados recientemente por el Consorcio Europeo Euroflow y por otros grupos expertos en citometría [2,11,12]. El análisis por CC se lleva a cabo en el servicio de patología de la institución.

Dado que la toma y el procesamiento de las muestras no está estandarizado en Colombia, la Asociación Colombiana de Hematología y Oncología Pediátrica, en la *Guía para la atención integral de niños con leucemia aguda* (2013), identificó la necesidad de investigar en áreas carentes de información, como lo es evaluar la afectación del sistema nervioso central de las leucemias agudas, mediante el estudio de la CMF, teniendo en cuenta que el método utilizado con frecuencia es la CC.

En nuestra institución consideramos importante saber cuál es la correlación entre estas dos pruebas diagnósticas, pues como se menciona en la *Guía nacional* hay un vacío en el conocimiento de este tema.

Materiales y métodos

Se trata de un estudio retrospectivo de concordancia entre la CMF y la CC

para determinar presencia de blastos en el LCR de pacientes pediátricos con diagnóstico de leucemia aguda, manejados en el Hospital Universitario San Ignacio. Previa definición operativa, se realizó una base de datos con las variables de interés [13].

Se tomaron los datos de los reportes definitivos de citología, que define infiltración según la clasificación de los hallazgos del fluido cerebroespinal [14]; entre tanto, los datos de reportes de citometría se basaron en la definición operativa institucional, donde la presencia de cualquier blasto se considera infiltración positiva.

Se realizó una búsqueda manual de información en las historias clínicas de todos los pacientes de 1 a 18 años de edad con diagnóstico de leucemia aguda que ingresaron al Centro Javeriano de Oncología-Hospital Universitario San Ignacio desde el 1 de enero de 2012 hasta el 1 de marzo de 2014. Se revisaron todas las historias clínicas de los pacientes que recibieron manejo y a los quienes se les realizaron estudios de LCR al inicio, durante el tratamiento y al final.

Dos investigadores analizaron la información, quienes depuraron los datos recabados en la plantilla, con el fin minimizar los errores de transcripción de la historia clínica. Así mismo, se describieron frecuencias de las variables de interés y se analizó concordancia mediante el cálculo del valor de kappa.

En este estudio se consideró como buena concordancia un valor de kappa mayor o igual a 0,8; como no significativa, los valores de kappa entre 0,6 y 0,8, y como mala concordancia valores de kappa menores a 0,6. El análisis estadístico se realizó empleando el *software* Stata 10.1.

Resultados

Se analizaron 111 muestras de 34 pacientes con edades entre 1 y 18 años. La edad promedio fue de 14,1 años (2-18 años). Respecto a la clasificación por riesgo de leucemia, no se encontró el dato en 9 pacientes, y de los otros 25 pacientes, 6 casos eran de riesgo bajo, 8 pacientes eran de riesgo alto y 11 presentaron recaída (3 en el sistema nervioso central, 7 en la médula ósea y 1 mixta). La mayoría de los pacientes no tenía alteración genética al diagnóstico (70,6%), no había dato o no se logró crecimiento en el estudio citogenético en 8 pacientes (23,5%), y solo 2 tenían documentada alguna alteración en el estudio genético (5,9%) (tabla 1).

Respecto a los resultados obtenidos en las 111 muestras analizadas, encontramos los siguientes hallazgos:

- A la mayoría de las muestras, 110 de las 111 se les hizo al menos una prueba (99,1%).
- De las 111 muestras se reportó citología positiva en 6 casos; negativa,

Tabla 1. Clasificación de riesgo de la leucemia

Clasificación por riesgo de la leucemia	Pacientes (n = 34)	Porcentaje
Riesgo bajo	6	17,6
Riesgo alto	8	23,5
Recaída	11	32,4
<i>Recaída en médula ósea</i>	7	
<i>Recaída a sistema nervioso central</i>	3	
<i>Recaída mixta</i>	1	
Sin datos	9	26,5
Alteración en estudio genético		
Sí	2	5,9
No	24	70,6
Sin dato	8	23,5

en 31 muestras, y no se encontró dato en 73 muestras.

- Respecto a los datos obtenidos en las muestras de CMF, se reportaron 16 muestras positivas, 93 muestras negativas y no se encontró reporte del dato en un caso (tabla 2).

A efectos de determinar la concordancia entre el estudio del LCR por CC y CMF, se calculó el valor de kappa. Para esto se excluyeron 74 muestras, dado que no se había tomado citología y citometría de LCR de forma simultánea en la misma muestra. El análisis de las 37 muestras de LCR, en las cuales encontramos datos de citometría y citología se muestra en la tabla 3.

Tabla 2. Resultados de la citología convencional/citometría de flujo en el total de muestras analizadas

	Muestras de LCR (n = 111)	Porcentaje
Citología		
Positiva	6	5,5
Negativa	31	28,2
Sin datos	73	66,4
Citometría		
Positiva	16	14,5
Negativa	93	84,5
Sin datos	1	0,9

Tabla 3. Resultados de la citología convencional/citometría de flujo con base a la concordancia (n = 37)

Citología de LCR	Citometría de LCR		Total
	Positiva	Negativa	
Positiva	5	1	6 (16,2%)
Negativa	6	25	31 (83,8%)
Total	11 (29,7%)	26 (70,3%)	

De las 11 muestras con citometría de LCR positiva, 6 tenían citología negativa ($\kappa = 0,45$) que evidenciaban mala concordancia. Esto se puede asociar con las características operativas de la prueba, pues es conocido que aun cuando la citología es el patrón de referencia en la actualidad, la citometría tiene una sensibilidad superior en la detección de células neoplásicas de origen hematológico [2,11,12]. Por el contrario, cuando se realiza el análisis con las muestras de citometría negativa y citología negativa o positiva los valores de kappa encontrados están entre 0,80 y 0,96, lo que muestra buena concordancia.

Discusión

La mayoría de los niños con leucemia aguda de nuevo diagnóstico se tratan con protocolos de investigación basados en indicadores pronósticos de riesgo, a fin de reducir la toxicidad para los pacientes de bajo riesgo y ofrecer una terapia más agresiva en los de alto riesgo de recaída [14]. En este estudio es llamativo el gran porcentaje de pacientes sin clasificación

de riesgo; sin embargo, el porcentaje de alto riesgo (23,5%) y de los que recaen (32,4%) fue similar a lo reportado en la literatura. Aunque las tasas de curación se aproximan al 80% en muchos estudios [15], sigue habiendo retos importantes, sobre todo para los niños con indicadores pronósticos adversos, como la presencia de anomalías cromosómicas [16] que fueron identificadas en el 5,9% de nuestros pacientes, similar a lo reportado en la literatura.

La implicación leucémica al sistema nervioso central es una manifestación extramedular poco frecuente y ocurre en menos del 5% de los pacientes, y si bien no hace parte de los factores de la clasificación de riesgo, la presentación al diagnóstico le da un comportamiento diferente a la enfermedad con la necesidad de una terapia específica para erradicar las células tumorales del LCR [1]. El diagnóstico de la leucemia al sistema nervioso central requiere confirmación citológica de los blastos en LCR. Han demostrado ser más sensibles otras pruebas de utilidad diagnóstica, como la citometría [2,3].

En las muestras analizadas encontramos que solo el 5,5% por CC y el 14,5% por CMF tenían afectación del sistema nervioso central, con una mala concordancia en este escenario ($\kappa = 0,45$).

A pesar de que distintos trabajos han demostrado la utilidad de la CMF en la identificación y cuantificación de células tumorales en el sistema nervioso central, en comparación con metodologías poco sensibles como CC, esta última técnica continúa siendo el patrón de referencia. La demostración de infiltración meníngea por esta técnica puede impactar en la incidencia de recaídas en el sistema nervioso central [2,10]. Sin embargo, a pesar de la sensibilidad superior reportada para la CMF en comparación con la CC, aún no existe un consenso sobre el uso exclusivo de la CMF en la detección de enfermedad leptomeníngea o el uso combinado de la CMF y la CC.

Conclusión

Aunque la mayoría de leucemias agudas no tienen afectación de LCR, el diagnóstico se debe optimizar. Para esto contamos en la actualidad con dos técnicas (CC y CMF), con características operativas diferentes.

A pesar de que la CMF se reporta como un método más sensible, tiene mayores costos y con el trabajo no se demuestra buena concordancia con la CC cuando es positiva; por lo anterior,

se requieren más estudios para determinar si aunque se incrementen los costos se debe cambiar a la citología, que en la actualidad es el patrón de referencia.

Agradecimientos

A Martha Patricia Vizcaíno Valderrama, hematooncóloga pediatra del Hospital Universitario San Ignacio.

Referencias

1. Bleyer WA. Central nervous system leukemia. *Pediatr Clin North Am.* 1998;35:789-814.
2. Quijano S, López A, Manuel SJ, Panizo C, et al. Identification of leptomeningeal disease in aggressive B-cell non-Hodgkin's lymphoma: improved sensitivity of flow cytometry. *J Clin Oncol.* 2009;27:1462-9.
3. Sancho J, Orfao A, Quijano S, et al. Clinical significance of occult cerebrospinal fluid involvement assessed by flow cytometry in non-Hodgkin's lymphoma patients at high risk of central nervous system disease in the rituximab era. *Eur J Haematol.* 2010;85:321-8.
4. Ward E, DeSantis C, Robbins A, et al. Childhood and adolescent cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin.* 2014;64:83-103.
5. Margolin J, Steuber P, Poplack D. Acute lymphoblastic leukemia. En: Pizzo PA, Poplack DC, editores. *Principles and practices of pediatric oncology.* 5a ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2006. p. 538-90.
6. Piñeros M, Pardo C, Otero J, Vizcaíno M, et al. Protocolo de Vigilancia Centinela en Salud Pública en Leucemias Agudas

Pediátricas. Bogotá: Instituto Nacional de Salud, Instituto Nacional de Cancerología. Ministerio de Protección Social de Colombia; 2008.

7. Bleyer WA. Central nervous system leukemia. *Pediatr Clin North Am.* 1988;35:789.
8. Levinsen M, Taskinen M, Abrahamsson J, et al. Clinical features and early treatment response of central nervous system involvement in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer.* 2014;61:1416.
9. Ahluwalia MS, Wallace PK, Peereboom DM. Flow cytometry as a diagnostic tool in lymphomatous or leukemic meningitis: Ready for prime time? *Cancer.* 2012;118:1747-53.
10. Ranta S, Nilsson F, Harila-Saari A, et al. Detection of central nervous system involvement in childhood acute lymphoblastic leukemia by cytomorphology and flow cytometry of the cerebrospinal fluid. *Pediatr Blood Cancer.* 2015;62(6):951-6.
11. Kraan J, Gratama JW, Haioun C, et al. Flow cytometric immunophenotyping of cerebrospinal fluid. *Current Protocols in Cytometry.* 2008; Suppl 45:6.25.16.25.16.
12. Van Dongen JJM, Lhermitte L, Bottcher S, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia.* 2012;26:1908-75.
13. Gaviria A, Ruiz F, Muñoz NJ, et al. Guía de práctica clínica para la detección oportuna, diagnóstico, tratamiento y seguimiento de leucemia linfocítica aguda y leucemia mieloide aguda en niños, niñas y adolescentes. Bogotá: Ministerio de Salud y Protección Social; 2013.
14. Smith M, Arthur D, Camitra B, et al. Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol.* 1996;14:18-24.
15. Hunger SP, Lu X, Devidas M, et al. Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: A report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol.* 2012;30:1663-9.
16. Pui CH, Crist WM, Look AT. Biology and clinical significance of cytogenetic abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 1990;76:1449-63.

Correspondencia

Sandra Milena Quijano Gómez
 Departamento de Microbiología
 Pontificia Universidad Javeriana
 Carrera 7 # 43-82, edificio 50,
 oficina 307
 Bogotá, Colombia
squijano@javeriana.edu.co

Iliana de los Reyes Valencia
 Centro Javeriano de Oncología
 Hospital Universitario San Ignacio
 Carrera 7 # 40-62, oficina 719
 Bogotá, Colombia
ilianadelosreyesoncol@yahoo.com
