



## Original

# Diseño de un protocolo de actuación para la detección de células neoplásicas no hematológicas en líquidos biológicos por citometría de flujo

## *Design of an action protocol for the detection of non-hematological neoplastic cells in biological fluid by flow cytometry*

*Sara Fernández-Landázuri, Leticia Thomlimson Alonso, Cristina Elvira Royo, Silvia Gutiérrez Orio, Isabel de Miguel Alonso, Tamara Zudaire Fuertes, Adrián Fontán Abad, Tamara Navajas Jalón, María Pilar Sanz Izquierdo*

Hospital San Pedro. Logroño

**Recibido:** 14/11/2021  
**Aceptado:** 22/04/2021

**Correspondencia:** Sara Fernández-Landázuri. Hospital San Pedro. C/ Piqueras, 98. 26006 Logroño  
e-mail: sflandazuri@riojasalud.es

### Palabras clave:

Neoplasias no hematológicas. Derrames.  
Citometría de flujo. Inmunocitoquímica.  
EpCAM.

### RESUMEN

**Introducción:** los tumores metastásicos pueden provocar derrames pleurales y ascíticos. El objetivo de este trabajo es evaluar el rendimiento de la citometría de flujo como herramienta diagnóstica en la detección de células epiteliales neoplásicas a través de la expresión de la molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM).

**Métodos:** se realizó la observación citológica y el estudio de inmunofenotipo por citometría de flujo en 33 líquidos pleurales o ascíticos (22 y 11, respectivamente) que presentaban un aumento de la celularidad en el estudio inicial. Se estudiaron variables demográficas y referentes a los resultados de los líquidos (recuento, bioquímica, citología e inmunofenotipo), se analizaron la sensibilidad, la especificidad, la eficiencia diagnóstica, el valor predictivo positivo y el negativo en los grupos de malignidad (sí/no) y se calculó la capacidad de discriminar entre malignidad o no de la expresión de EpCAM mediante el empleo de curvas ROC.

**Conflicto de intereses:** los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

DOI: 10.20960/revmedlab.00112

Fernández-Landázuri S, Thomlimson Alonso L, Royo CE, Gutiérrez Orio S, de Miguel Alonso I, Zudaire Fuertes T, Fontán Abad A, Navajas Jalón T, Sanz Izquierdo MP. Diseño de un protocolo de actuación para la detección de células neoplásicas no hematológicas en líquidos biológicos por citometría de flujo. Rev Med Lab 2022;3(1):12-20

**Resultados:** el nivel de expresión de la molécula EpCAM es superior en la población oncológica respecto a la población sin afectación tumoral: 6,52 % frente al 0,25 % del total celular ( $p = 0,003$ ); 40,1 % frente al 1,37 % ( $p = 0,03$ ) sobre la población no leucocitaria (CD45/CD14).

**Conclusiones:** la citometría de flujo permite identificar y caracterizar células neoplásicas no hematológicas. La citometría de flujo puede utilizarse como una prueba de cribado y de apoyo en la observación citológica y el estudio inmunocitoquímico.

**Keywords:**

Nonhematopoietic neoplasms. Effusion. Flow cytometry. Immunocytochemistry. EpCAM.

**ABSTRACT**

**Introduction:** metastatic tumors can cause pleural and ascitic effusions. The objective of this work is to evaluate the performance of flow cytometry as a diagnostic tool in the detection of neoplastic epithelial cells, through the expression of the epithelial cell adhesion molecule (EpCAM).

**Methods:** cytological observation and immunophenotype study by flow cytometry were performed in 33 pleural or ascitic fluids (22 and 11, respectively) that presented increased cellularity in the initial study. Demographic variables and references to fluid results (count, biochemistry, cytology, immunophenotyping) were studied, sensitivity, specificity, diagnostic efficiency, positive and negative predictive value in the malignancy groups (yes/no) were analyzed, and the ability to discriminate between malignancy or not of EpCAM expression by using ROC curves.

**Results:** the level of expression of the EpCAM molecule is higher in the oncological population with respect to the population without tumor involvement: 6.52 % versus 0.25 % of the total cell ( $p = 0.003$ ); 40.1 % versus 1.37 % ( $p = 0.03$ ) on the non-leukocyte population (CD45/CD14).

**Conclusions:** flow cytometry allows the identification and characterization of non-hematological neoplastic cells. The response time of flow cytometry is shorter than the immunocytochemical study, so it can be used as a screening test and to support the observation of cytology and the immunocytochemical study.

**INTRODUCCIÓN**

El manejo de los derrames pleurales y ascíticos supone un desafío para el laboratorio clínico debido al impacto de los resultados en la práctica clínica. El acúmulo de líquido en las cavidades se debe al aumento de la permeabilidad capilar o a la presión hidrostática, al descenso de la presión coloidosmótica o a la obstrucción del drenaje linfático (1). Atendiendo a los criterios propuestos por el Dr. Light en 1972, pueden clasificarse en trasudados o exudados (2). Los tumores metastásicos causan frecuentemente exudados. Suponen el 15-35 % de los derrames pleurales y el 10 % de los ascíticos (3,4). Las células neoplásicas más predominantes en los derrames pleurales son las que se derivan de las neoplasias de pulmón y de mama, mientras que en los derrames ascíticos son las correspondientes a las neoplasias del tracto gastrointestinal y del ovario (5). Se estima que el derrame es la primera manifestación de la enfermedad o de su recurrencia. Afecta al 40 % de los pacientes. Asimismo, el desarrollo de derrames se asocia a una peor pronóstico (6,7).

La invasión del tejido pleural o ascítico por células malignas puede detectarse en la biopsia o en la citología del líquido biológico. Actualmente, el estudio inmunocitoquímico es una técnica de referencia en el diagnóstico de derrames malignos. Sin embargo, no está exento de limitaciones derivadas de la sensibilidad de la técnica, de la experiencia de los evaluadores, de la calidad de la preparación, del tipo histológico de la neoplasia maligna o del tiempo de respuesta (8,9). El empleo de nuevas técnicas diagnósticas puede aportar valor añadido al proceso asistencial del paciente. En este contexto se encuentra la citometría de flujo (CMF). Se trata de una técnica necesaria y consolidada en el diagnóstico de neoplasias hematológicas, incluso para la detección de bajos niveles de expresión, como en la enfermedad mínima residual (10), y su uso está siendo prometedora en neoplasias no hematológicas (11).

Entre los biomarcadores investigados en la literatura, destaca la molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM). Esta molécula se expresa en células epiteliales normales. Su expresión es superior en la mayoría de las neoplasias epiteliales y está ausente en células

hematopoyéticas y mesoteliales (12). Esta diferencia en la expresión de EpCAM es la que ayuda a caracterizar las células neoplásicas de las células mesoteliales en los casos en los que la citología no es capaz. La evidencia científica correlaciona la formación de metástasis con el nivel de expresión de EpCAM. Sin embargo, el resultado clínico es complejo y puede variar dependiendo no solo del origen del tumor, sino de su estadio de progresión (13). La sensibilidad y la especificidad de la inmunocitoquímica y de la CMF para analizar la expresión de EpCAM son similares, aunque dos ventajas de la CMF son el tiempo de respuesta en la emisión del resultado y el número de células analizadas (hasta un millón de células por CMF frente a 100 o 200 por citología) (14,15).

La CMF es una tecnología con potencial para el diagnóstico en la detección de células epiteliales neoplásicas. Sin embargo, no es común encontrarla en la práctica clínica. El objetivo de este trabajo es analizar el papel de la CMF en la caracterización de células neoplásicas no hematológicas en los derrames pleurales y ascíticos y su posible implantación en el protocolo de análisis de los derrames.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio prospectivo en el que se evaluaron los resultados de los líquidos pleurales y ascíticos recibidos entre marzo y junio de 2021. Se diseñó de acuerdo a la declaración de Helsinki y fue aprobado por el comité de ética de investigación de nuestro centro.

Criterios de inclusión: líquidos de pacientes con más de 18 años de edad atendidos en urgencias, hospitalización o consultas externas y que presentaban un aumento de la celularidad definida como la presencia de al menos uno de los siguientes criterios (16,17):

1. Más de 250 leucocitos/ $\mu$ L.
2. Más de 5 células de alta fluorescencia (HF-BF) / 100 leucocitos.
3. Más de 67 HF-BF /  $\mu$ L en pleurales.
4. Más de 17 HF-BF /  $\mu$ L en ascíticos.

Criterios de exclusión: líquidos de pacientes con menos de 18 años de edad y líquidos de lavado broncoalveolar o peritoneal. Se excluyeron los lavados bronqueoalveolares y peritoneales, ya que, al contener epitelio normal, expresan la molécula EpCAM y, como consecuencia, no es posible diferenciar entre las células epiteliales normales y las neoplásicas (11).

## Protocolo de actuación

Los líquidos pleurales y ascíticos se recogieron y se procesaron en el laboratorio de urgencias de nuestro centro hospitalario, que atiende a una población de 320 000 habitantes.

El líquido pleural se obtiene por toracocentesis y el ascítico, por paracentesis. Ambos se recogieron en tu-

bos cónicos de polipropileno sin anticoagulante. Para valorar la utilidad de la CMF se amplió este estudio a todos los que cumplieran criterios de inclusión según celularidad (Fig. 1).

## Diseño del estudio

De los líquidos incluidos en el estudio se recogieron y se analizaron las siguientes variables:

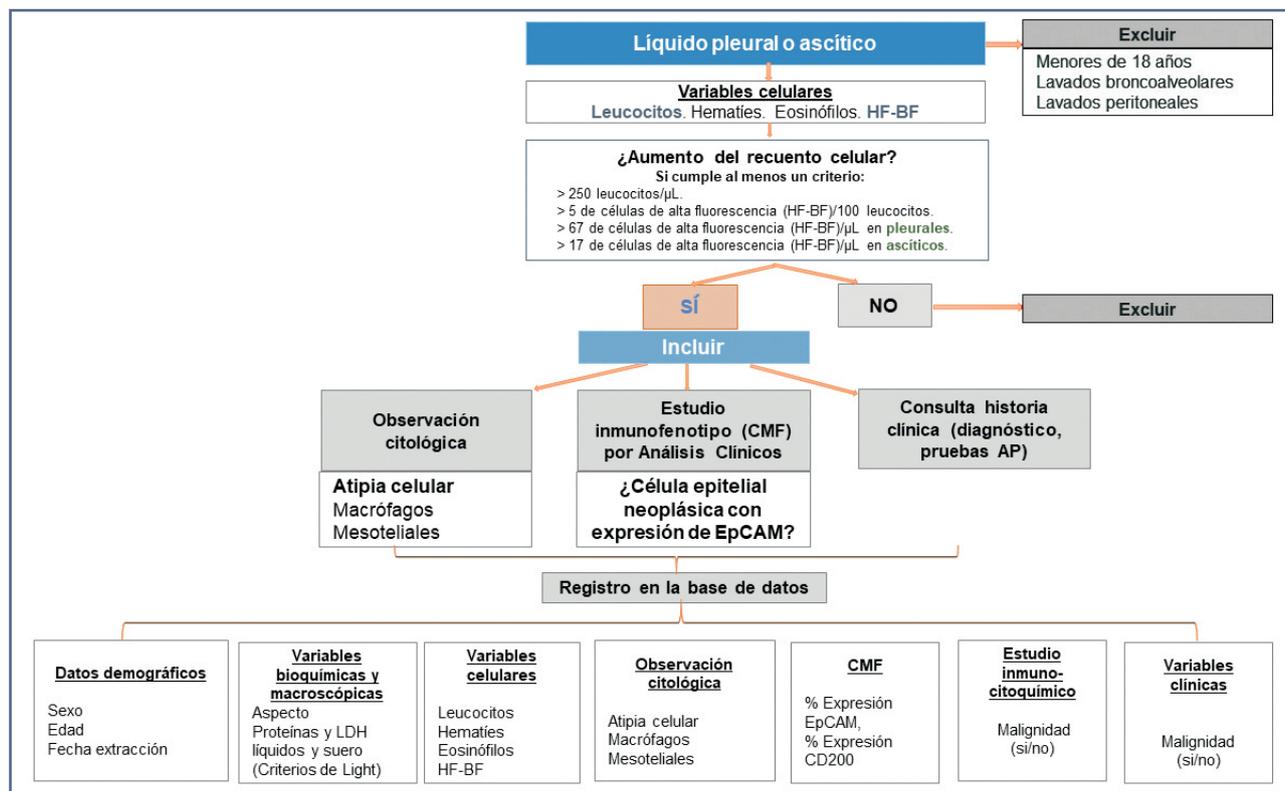
- Variables demográficas del paciente y del proceso asistencial: edad, sexo y fecha de extracción del líquido.
- Variables macroscópicas y bioquímicas: turbidez y color del líquido, resultado de proteínas y lactato deshidrogenasa (LDH) del líquido biológico y del suero realizados en el analizador Cobas 6000 (Roche Diagnostics). En aquellos pacientes a los que se les realizó la determinación de proteínas y LDH en suero en las 24 horas anteriores o posteriores a la obtención del líquido biológico se calculó el ratio para categorizar el líquido como exudado o trasudado según los criterios de Light (2). Se consideró exudado si cumplía al menos uno de los siguientes:
  - Relación proteínas del líquido / suero, superior a 0,5.
  - Relación LDH líquido / suero, superior a 0,5.
  - Valor de LDH líquido superior a dos tercios de LDH en suero.

- Recuento celular. Se realizó en el analizador XN-1000 (Sysmex). Se recogieron los resultados de los siguientes parámetros: leucocitos/ $\mu$ L (número absoluto), hematíes/ $\mu$ L (número absoluto), leucocitos mononucleares (porcentaje), leucocitos polimorfonucleares (porcentaje), células de alta fluorescencia (HF-BF)/ $\mu$ L (número absoluto), células HF-BF/ 100 leucocitos y eosinófilos (porcentaje).
- Estudio citológico. Se realizó tras la centrifugación y la tinción de May-Grünwald Giemsa.

Se consideraron valores normales en líquidos pleurales: macrófagos: 65-80 %; linfocitos: 2-30 %; células mesoteliales: 0-2 % y neutrófilos: < 1 %. Se consideraron valores normales en líquidos ascíticos: macrófagos y linfocitos: 60-80 % y eosinófilos: 0-7 %.

Las características de atipia celular se basaron en monomorfismo, gran tamaño, intensa basofilia, alta relación núcleo/citoplasma, contorno nuclear irregular, cromatina laxa e inmadura, presencia de múltiples y prominentes nucléolos, vacuolación polarizada en el citoplasma, mitosis anómala, tendencia a formar nidos o sincitios al perder la individualidad celular, células en anillo de sello y signos de canibalismo. Se realizó el recuento de células atípicas en 100 células nucleadas (5), que se clasificaron en tres categorías:

1. Ausencia de células atípicas y de células mesoteliales.
2. Presencia de células mesoteliales o de macrófagos.



**Figura 1** – Diseño del estudio prospectivo para la óptima caracterización de los derrames pleurales y ascíticos. AP: anatomía patológica; CMF: citometría de flujo; HF-BF: células de alta fluorescencia. LDH: lactato-deshidrogenasa.

### 3. Presencia de células atípicas.

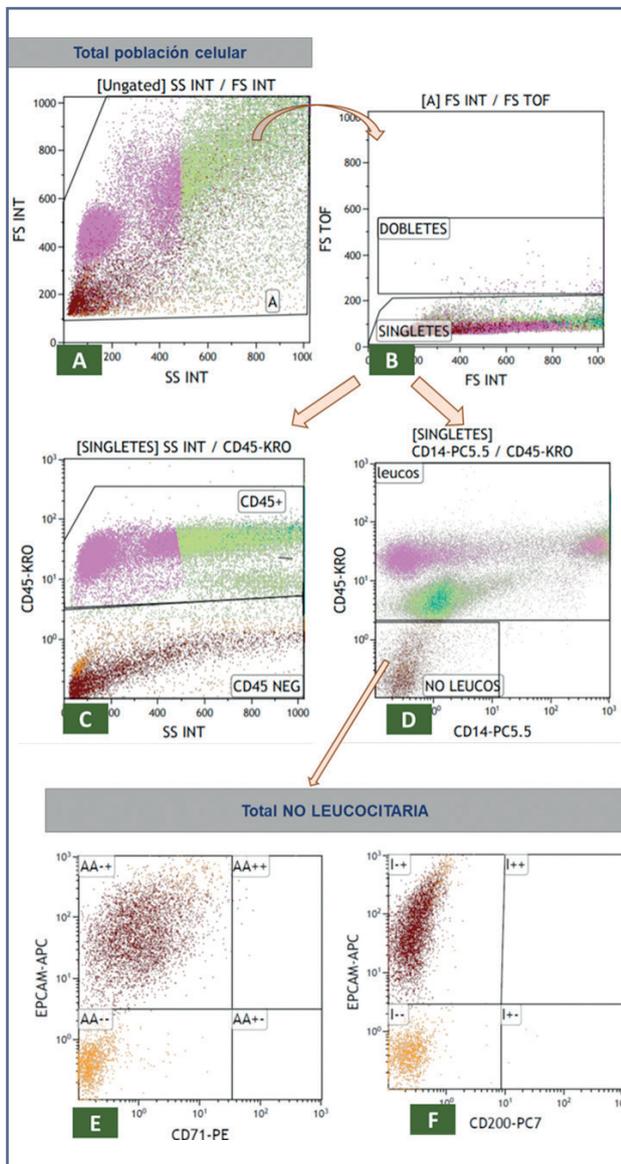
— CMF: los líquidos pleurales y ascíticos que se recogieron en el laboratorio de urgencias en horario de 8:00 a 14:00 de lunes a viernes se procesaron en el mismo día por el laboratorio de CMF. Fuera de dicho horario se almacenaron refrigerados hasta su procesamiento. En aquellas situaciones en las que no pudieron procesarse antes de las 48 horas posteriores a la extracción se conservaron refrigerados con Transfix™ (1000 µL de líquido con 200 µL de Transfix™).

Se mezclaron 100 µL del líquido a estudio con los anticuerpos conjugados con moléculas fluorescentes para la detección de los antígenos. Los anticuerpos empleados fueron: CD71-FITC (clon: YDJ1.2.2), CD14-PC5.5 (clon: RMO52), CD200-PC7 (clon OX-104), CD326 (EpCAM)-APC (clon: VU1D9), CD20-PC (clon: B9E9) y CD45-KrO (clon: J33) (Beckman Coulter). Tras una incubación de 15 minutos a oscuras, se lisaron las células con 500 µL de *lysing solution* (Optilase) durante 10 minutos y se lavaron con 3 mL de solución PBA (solución de tampón fosfato salino con albúmina). Se centrifugaron a 400 g durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado con 200 µL de tampón fosfato salino (PBS). Se analizaron en el citómetro de flujo Navios EX (Beckman Coulter) usando el *software* de análisis Kaluza (Beckman Coulter).

La estrategia de análisis empleada para detectar células neoplásicas no hematológicas en los derrames se basó en la propuesta por Pillai y Acosta (11,15). Inicialmente se realizó la selección (gateo) de la población empleando el escatergrama con los parámetros de dispersión de luz, que reflejan tamaño frente a complejidad (FSC frente a SSC), y se eliminaron los dobletes celulares a través del escatergrama FSC lineal de altura y de amplitud (Fig. 2). Sobre los singletes se seleccionaron las células no hematológicas, caracterizadas por la ausencia de expresión de los marcadores celulares CD45 y CD14. En esa población celular no leucocitaria se determinaron la expresión de la molécula EpCAM y CD200 para discernir entre células epiteliales neoplásicas y mesoteliales. Adicionalmente, se valoró la expresión de CD71. El CD20 se empleó para definir mejor la población leucocitaria (marcador linfocitario) en la población excluida del análisis.

Para valorar la positividad de este biomarcador se utilizó el punto de corte del 2 % de las células que expresaban EpCAM en la población no leucocitaria (CD45/CD14-) propuesto por Sahu (18). Adicionalmente, se calculó el punto de corte, que obtuvo mejor resultado en nuestro estudio a través de las curvas ROC.

— Estudio inmunocitoquímico, así como resultado positivo o negativo para malignidad en la citología y fecha de emisión de informe en aquellos casos en los que se solicitó por el médico peticionario.



**Figura 2** – Caracterización celular por citometría de flujo. A. Total de la población celular analizada por el citómetro. B. Eliminación de agregados celulares y selección de los singletes. C. Distribución celular en función de la expresión de CD45 en la población de singletes. D. Selección de la población no leucocitaria (CD45/CD14). E. Caracterización de células epiteliales neoplásicas en la población no leucocitaria a través de la expresión de EpCAM junto a la de CD71. F. Discriminación de células epiteliales neoplásicas (EpCAM<sup>+</sup>) y células mesoteliales (CD200<sup>+</sup>) en la población no leucocitaria.

- Variables clínicas: diagnóstico del paciente.
- Variable de malignidad. Se definió resultado positivo para malignidad por la presencia de neoplasia detectada por estudio inmunocitoquímico o pruebas de imagen: tomografía por emisión de positrones (PET) o tomografía computarizada (TC).

## Estudio estadístico

Las variables estudiadas cuantitativas (edad, leucocitos, hematíes, leucocitos mononucleares, leucocitos polimorfonucleares, HF-BF/ $\mu\text{L}$ , HF-BF/100 leucocitos, eosinófilos y expresión de EpCAM) se exploraron con la prueba de conformidad de Shapiro-Wilk. Se calcularon indicadores de tendencia central (mediana) y de dispersión (percentiles) para las variables no paramétricas.

Se calculó la sensibilidad, la especificidad, la eficiencia diagnóstica (ED) y el valor predictivo positivo (VPP) y el negativo (VPN) para las variables cuantitativas *recuento celular leucocitario* ( $n.^{\circ}/\mu\text{L}$ ), *células de alta fluorescencia* ( $n.^{\circ}/\mu\text{L}$ ,  $n.^{\circ}/100$  leucocitos) y *células no leucocitarias (CD45/CD14) con expresión de EpCAM* (%) en los grupos de diagnóstico final de malignidad (sí/no). Se definió ED como el porcentaje de personas clasificadas correctamente en la prueba como enfermas (presencia de malignidad) o sanas (ausencia de malignidad). Se compararon los dos grupos (sí/no malignidad) mediante U de Mann-Whitney para variables no paramétricas. Se consideró estadísticamente significativa  $p < 0,001$ .

Se calculó la sensibilidad, la especificidad, VPP, VPN y ED para las variables cualitativas, presencia de exudado (sí/no), células atípicas en citología (sí/no), resultado del inmunofenotipo (ausencia/presencia EpCAM) y el resultado del estudio inmunocitoquímico (positivo/negativo) para los grupos de diagnóstico final de malignidad (sí/no). Se calculó también la razón de proporciones.

Se calculó la capacidad discriminadora de la expresión de EpCAM para discriminar malignidad (sí/no) a través de curvas ROC. Se comparó el punto de corte obtenido en nuestro estudio con el establecido por Sahu (2 % de células que expresaban EpCAM en la población no leucocitaria) (18).

Los datos se recogieron y se analizaron en el programa estadístico IMB SPSS Statistics versión 20 (SPSS Inc., Chicago, IL, Estados Unidos).

## RESULTADOS

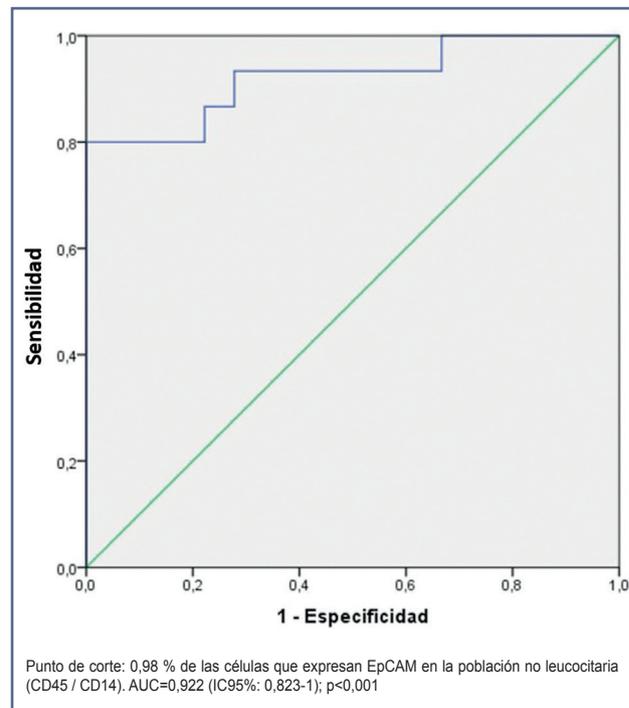
En el periodo establecido se solicitó el recuento celular a 97 líquidos pleurales y a 92 ascíticos de 76 y 44 pacientes, respectivamente. Se seleccionaron, según los criterios de inclusión, 33 líquidos (22 pleurales y 11 ascíticos) pertenecientes a 33 pacientes a cargo de los siguientes servicios: neumología (12), medicina interna (7), digestivo (6), cirugía torácica (5), oncología (1), unidad de cuidados intensivos (1) y ginecología (1). La mediana de edad fue de 70 años (rango intercuartílico: 65-82,5) y el 58 % eran mujeres. La población se clasificó en dos categorías en función de si existía afectación neoplásica o no. Entre los pacientes a los que se les solicitó el líquido pleural, 12 presentaron afectación tumoral,

mientras que en la población a estudio con líquidos ascíticos únicamente 3 pacientes tuvieron diagnóstico de neoplasia. El 53 % de los diagnósticos de neoplasia se establecieron en el proceso asistencial en el que se obtuvo el líquido biológico.

La valoración del aspecto macroscópico en función del diagnóstico final (sí/no malignidad) no proporcionó suficiente información para tipificarlo. En cuanto a la solicitud de pruebas bioquímicas en suero con el objetivo de ayudar en la clasificación de exudado o trasudado, se solicitó en el 73 % de los líquidos y tan solo en el 12 % de los casos se detalló esta información explícitamente en las historias clínicas. En nuestra cohorte, los criterios de Light (exudado/trasudado) no muestran una buena concordancia con el diagnóstico final (sí/no malignidad),  $\chi^2 = 0,657$ .

Atendiendo al recuento celular, excepto en los valores de células HF-BF, no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Los pacientes oncológicos presentaron cifras más elevadas (media: 341 células HF-BF/ $\mu$ L; media: 43 células HF-BF/100 leucocitos) con respecto a los pacientes sin afectación tumoral (media: 108 células HF-BF /  $\mu$ L [p = 0,024]; media: 10 células HF-BF / 100 leucocitos [p < 0,001]).

El 88 % de los diagnósticos de malignidad se basaron en dichos resultados de la inmunocitoquímica, considerada como técnica de referencia; el resto se estableció por pruebas de imagen. El estudio citológico alcanzó una sensibilidad del 73,3 %. La sensibilidad que se obtuvo por CMF fue superior, sobre todo cuando se combinaron (Tabla I). La sensibilidad de la CMF empleando el punto de corte del 2 % propuesto por Sahu (18) de las células que expresaban EpCAM en la población no leucocitaria (CD45-/CD14-) (18) fue del 80 % y empleando el punto de corte de 0,98 %, que obtuvimos mediante curva ROC, fue del 93,3 % (Fig. 3). La pue-



**Figura 3** – Curva ROC de la expresión de EPCAM en población no leucocitaria por inmunofenotipo. Punto de corte: 0,98 % de las células que expresaron EpCAM en la población no leucocitaria (CD45-/CD14-). AUC = 0,922 (IC 95 %: 0,823-1); p < 0,001.

ba diagnóstica que obtuvo mayor VPP, seguida de la inmunocitoquímica, fue el inmunofenotipo empleando como punto de corte el 2 % de células con expresión de EpCAM en la población no leucocitaria (CD45-/CD14-).

Tabla I. Características de las pruebas diagnósticas para diferenciar malignidad de no malignidad						
	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)	ED (%)	Tiempo de respuesta (días)
Citología	73,3	81,2	78,6	76,5	77,4	1
CMF*	80,0	83,3	80,0	83,3	81,8	1 (1-3)
CMF†	93,3	72,2	73,7	92,9	81,8	1 (1-3)
Observación citológica + CMF*	86,7	72,2	72,2	86,7	78,8	1 (1-3)
Observación citológica + CMF†	93,3	61,1	66,7	91,7	75,7	1 (1-3)
IC	91,7	100,0	100,0	94,4	96,5	4 (1-10)

\*CMF: citometría de flujo empleando el punto de corte del 2 % de expresión de EpCAM en células no leucocitarias (CD45-/CD14-). †CMF: citometría de flujo empleando el punto de corte del 0,98 % de expresión de EpCAM en células no leucocitarias (CD45-/CD14-). IC: inmunocitoquímica. E: especificidad. S: sensibilidad. VPP: valor predictivo positivo. VPN: valor predictivo negativo. ED: eficiencia diagnóstica.

El estudio inmunocitoquímico mostró tiempos de respuesta más dilatados que la observación citológica y la CMF (4 días de media frente a 1 día, respectivamente). El nivel de expresión de la molécula EpCAM fue superior en la población oncológica respecto a la población sin afectación tumoral: 6,52 % frente al 0,25 % del total celular ( $p = 0,003$ ) y 40,1 % frente al 1,37 % sobre la población no leucocitaria ( $p = 0,03$ ).

En la tabla II se recogen los datos más relevantes de los pacientes analizados.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los derrames pleurales o ascíticos suelen ser manifestaciones clínicas frecuentes provocadas por la infiltración tumoral, incluso pueden aparecer como primera expresión del daño tumoral. De hecho, en nuestra población, los tumores metastásicos representaron el 15 % de los derrames pleurales y el 9 % de los derrames peritoneales, datos ligeramente inferiores a los reportados en la literatura (15-35 % pleurales y 10 % ascíticos) (3,4). En nuestro estudio, el 53 % de los diagnósticos de neoplasia se establecieron en el proceso asistencial en el que se realizó el estudio del líquido biológico.

La observación citológica del líquido pleural y ascítico es una prueba útil y necesaria en la caracterización celular, aunque tiene como desventaja que puede estar influenciada por el grado de entrenamiento del evaluador (19). El rendimiento diagnóstico de esta prueba, en la cohorte estudiada, aumenta cuando se combina con la CMF para la detección de una posible afectación tumoral.

En condiciones normales los líquidos pleurales y ascíticos no presentan células epiteliales, por lo que la expresión de EpCAM en este tipo de muestras se atribuyó a celularidad tumoral. En nuestro trabajo, la valoración de la expresión de dicho biomarcador se atribuye a células epiteliales neoplásicas, tal y como apuntan otros autores (13). A pesar de que la ED de la CMF resultó igual, independientemente de si empleábamos nuestro punto de corte de 0,98 o el de 2 % (18) de células que expresan EpCAM en la población no leucocitaria (CD45/CD14<sup>-</sup>), se considera más apropiado emplear el punto de corte de 2 % al haber obtenido con él mayor VPP.

La expresión del EpCAM por CMF aporta valor añadido al acto clínico al utilizarla como una prueba de cribado que ayude a los servicios de anatomía patológica (AP) en la priorización de aquellos pacientes con sospecha clínica y analítica de neoplasia. Adicionalmente a la mejora en el tiempo de respuesta, la CMF permite analizar mayor número de células que la observación de la citología y la inmunocitoquímica. Sin embargo, no puede obviarse que pueden aparecer resultados discrepantes entre la CMF y la inmunocitoquímica derivados de la pérdida de expresión de EpCAM que se produce en determina-

dos tumores epiteliales mal diferenciados (20). Otros aspectos limitantes de la CMF son la falta de estandarización en el punto de corte para fijar la positividad y la información que se recoge en el informe del laboratorio. De hecho, los trabajos publicados suelen reportar el porcentaje de eventos adquiridos con expresión CD45/EpCAM<sup>+</sup> del total celular, lo que remarca el carácter cualitativo del resultado (14,21). En este trabajo han intentado solventarse estas limitaciones mediante la comparación del punto de corte fijado por Sahu del 2 % de expresión de EpCAM en la población CD45/CD14<sup>-</sup> y del de 0,98 % obtenido en nuestro estudio por curvas ROC. Por otro lado, se considera apropiado informar del resultado obtenido del inmunofenotipo de forma cualitativa y cuantitativa empleando comentarios del siguiente tipo: "Se detecta la presencia de células epiteliales que expresan la molécula EpCAM en un [X %] de la población no leucocitaria (CD45/CD14<sup>-</sup>). Los resultados sugieren un posible origen neoplásico. Se recomienda establecer el diagnóstico por anatomía patológica o pruebas de imagen".

Entre las limitaciones del estudio se encuentra el tamaño muestral, el impacto en las distintas condiciones de conservación de la muestra y la falta de solicitud de pruebas bioquímicas (proteínas y LDH) en suero para la clasificación de exudado y trasudado según los criterios de Light.

La realización del inmunofenotipo basado en la expresión del EpCAM en la población no leucocitaria (CD45/CD14<sup>-</sup>) ha permitido identificar y caracterizar células neoplásicas no hematológicas en un tiempo de respuesta menor al obtenido por inmunocitoquímica.

Dada la información que aporta el empleo de CMF, puesta de relevancia en este estudio, se propone que, en aquellos líquidos con recuento celular elevado según los criterios de inclusión descritos en este estudio, y en los que la observación citológica no sea concluyente respecto a la caracterización celular o se tenga la sospecha de infiltración tumoral por tumor sólido, se solicite el inmunofenotipo al laboratorio de CMF (Fig. 4). Se prevé que esta propuesta pueda reducir los tiempos de respuesta globales por parte de AP, dato que se analizará tras la implantación del protocolo en nuestro servicio.

Este trabajo destaca el papel de liderazgo del laboratorio clínico en la implantación de herramientas o de estrategias diagnósticas que mejoren los protocolos actuales de análisis de líquidos ascíticos y pleurales y que permitan establecer un resultado lo más precoz posible. Esto puede ser beneficioso para alcanzar un diagnóstico temprano, teniendo en cuenta que muchos pacientes con derrames pleurales y ascíticos tienen un desenlace mortal a corto plazo. El establecimiento de algoritmos consensuados con los servicios peticionarios e implicados, como AP y hematología, aumenta la capacidad del laboratorio en el diagnóstico de los líquidos biológicos.

**Tabla II.**  
**Características de los pacientes analizados**

ID	Tipo	Edad	Sexo	Observación citológica	CMF	IC	Diagnóstico final
1	P	78	M	Células atípicas	43,38	1	Carcinoma de células pequeñas broncopulmonares
2	P	89	H	No células atípicas	0,00	0	Traumatismo torácico
3	A	84	H	No células atípicas	0,00	0	Insuficiencia cardiaca
4	A	84	M	Células atípicas	16,00		Carcinomatosis peritoneal de un carcinoma de ovario
5	P	86	H	No células atípicas	0,56	0	Neumonía basal derecha
6	P	84	H	Mesoteliales	0,04	0	Disnea. Enfermedad de Waldenström
7	P	69	M	No células atípicas Linfoide	0,18	0	Neumonía bilateral
8	P	72	M	Células atípicas	71,42	1	Carcinoma no microcítico de pulmón
9	P	69	H	Células atípicas	73,54	1	Adenocarcinoma de pulmón
10	A	65	H	Macrófagos	0,45	0	Cirrosis hepática de origen enólico
11	P	66	M	Macrófagos y mesoteliales	1,05	0	Adenocarcinoma ductal de páncreas
12	P	75	H	Macrófagos y mesoteliales	1,77	0	Insuficiencia cardiaca Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
13	A	66	M	Macrófagos	1,52	0	Cirrosis hepática de origen enólico
14	P	65	M	No valorable	0,02	0	Disnea
15	A	67	H	Macrófagos	0,04	0	Hepatopatía crónica en fase cirrosis
16	A	68	H	Macrófagos y mesoteliales	0,00	0	Descompensación hidrópica con ascitis refractaria
17	P	52	M	Células atípicas	62,59	1	Adenocarcinoma intestinal
18	P	52	H	No valorable	0,01	0	Tuberculosis pleural
19	A	81	H	Macrófagos y mesoteliales	3,63	0	Ascitis secundaria a hipertensión portal
20	A	37	M	Macrófagos	2,66	--	Hiperestimulación ovárica grave
21	A	58	H	Macrófagos y mesoteliales	0,36	0	Cirrosis hepática de origen enólico
22	P	70	H	Células atípicas	81,08	1	Adenocarcinoma de pulmón
23	A	61	M	Células atípicas	77,13	1	Carcinomatosis peritoneal de origen ginecológico
24	P	85	H	Células atípicas	62,22	1	Adenocarcinoma de pulmón
25	P	61	M	Macrófagos y mesoteliales	0,89	0	Adenocarcinoma de colon
26	P	88	H	Células atípicas	15,15	1	Carcinomatosis pleural
27	A	58	H	Células atípicas	1,65	1	Carcinomatosis peritoneal de origen ginecológico
28	P	73	M	Linfoide	0,05	1	Infiltración pleural por proliferación linfoide
29	P	76	H	Macrófagos	0,91	0	Pleuropericarditis aguda
30	P	71	H	Células atípicas	32,98	1	Adenocarcinoma de pulmón
31	P	91	H	No células atípicas	11,46	0	Insuficiencia cardiaca
32	P	68	M	Células atípicas	64,81	--	Carcinomatosis pleural por carcinoma de mama
33	P	75	M	Células atípicas	22,78	--	Carcinomatosis pleural

Tipo: A: ascítico; P: pleural. Sexo: M: mujer; H: hombre. CMF: citometría de flujo (expresión de células epiteliales neoplásicas, CD45-/EpCAM+). IC: inmunocitoquímica (0: negativa para malignidad; 1: positiva para malignidad; --: sin inmunocitoquímica del líquido obtenido).

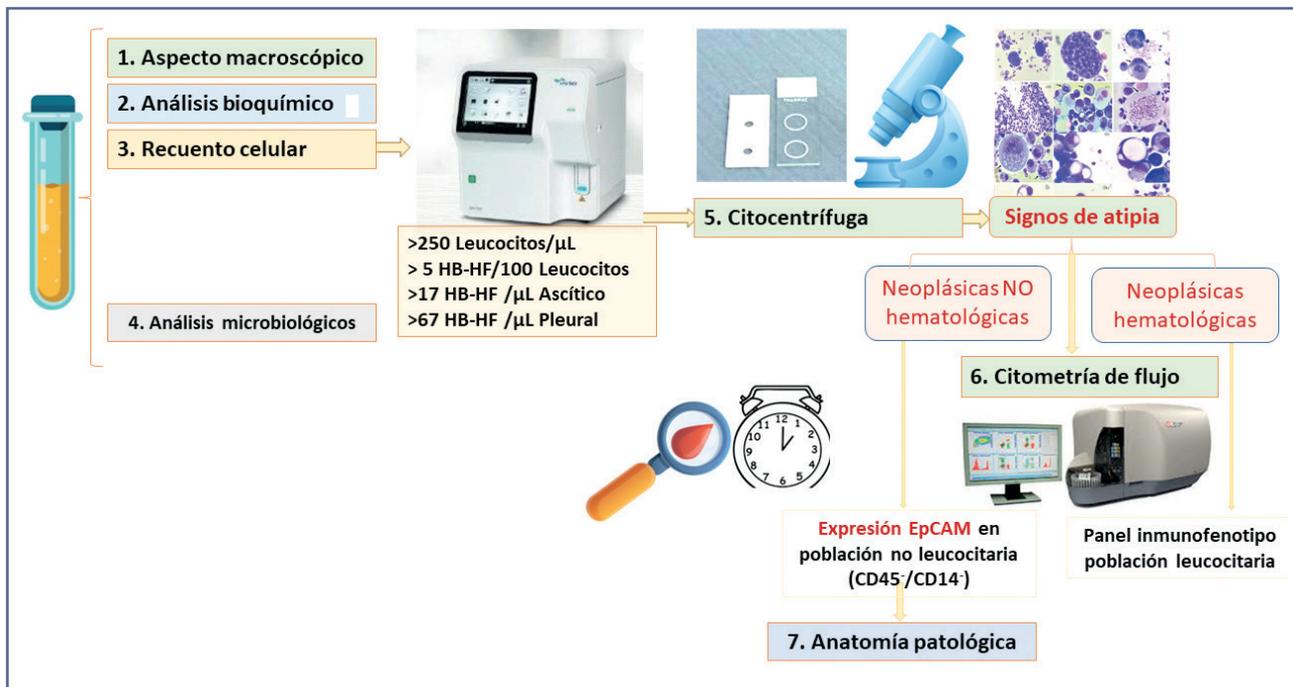


Figura 4 – Esquema de trabajo para el análisis de líquidos pleurales y ascíticos.

## BIBLIOGRAFÍA

- González Hernández Á. Principios de bioquímica clínica y patología molecular. 3.ª ed. Madrid: Elsevier; 2019.
- Light RW. Pleural Effusions: The Diagnostic Separation of Transudates and Exudates. *Ann Intern Med* 1972;77(4):507.
- Villena Garrido V, Cases Viedma E, Fernández Villar A, de Pablo Gafas A, Pérez Rodríguez E, Porcel Pérez JM, et al. Recommendations of Diagnosis and Treatment of Pleural Effusion. Update. *Arch Bronconeumol Engl Ed* 2014;50(6):235-49.
- Becker G, Galandí D, Blum HE. Malignant ascites: Systematic review and guideline for treatment. *Eur J Cancer* 2006;42(5):589-97.
- Merino A. Manual de citología de sangre periférica y líquidos biológicos. 2.ª ed. Madrid: Médica Panamericana; 2019.
- Fentiman IS, Millis R, Sexton S, Hayward JL. Pleural effusion in breast cancer: a review of 105 cases. *Cancer* 1981;47(8):2087-92.
- Mishra EK, Muruganandan S, Clark A, Bhatnagar R, Maskell N, Lee YCG, et al. Breathlessness Predicts Survival in Patients With Malignant Pleural Effusions. *Chest* 2021;160(1):351-7.
- Porcel JM, Esquerda A, Vives M, Bielsa S. Etiology of pleural effusions: analysis of more than 3,000 consecutive thoracenteses. *Arch Bronconeumol* 2014;50(5):161-5.
- Motherby H, Nadjari B, Friegel P, Kohaus J, Ramp U, Böcking A. Diagnostic accuracy of effusion cytology. *Diagn Cytopathol* 1999;20(6):350-7.
- Westers TM, Ireland R, Kern W, Alhan C, Balleisen JS, Bettelheim P, et al. Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: a report from an international consortium and the European LeukemiaNet Working Group. *Leukemia* 2012;26(7):1730-41.
- Pillai V, Dorfman DM. Flow Cytometry of Nonhematopoietic Neoplasms. *Acta Cytol* 2016;60(4):336-43.
- Sarrach S, Huang Y, Niedermeyer S, Hachmeister M, Fischer L, Gille S, et al. Spatiotemporal patterning of EpCAM is important for murine embryonic endo- and mesodermal differentiation. *Sci Rep* 2018;8(1):1801.
- Went P, Vasei M, Bubendorf L, Terracciano L, Tornillo L, Riede U, et al. Frequent high-level expression of the immunotherapeutic target Ep-CAM in colon, stomach, prostate and lung cancers. *Br J Cancer* 2006;94(1):128-35.
- Dorwal P, Moore H, Stewart P, Harrison B, Monaghan J. CD326 (Ep-CAM) testing by flow cytometric BerEP4 antibody is a useful and rapid adjunct to histopathology: CD326 BY FLOW CYTOMETRY. *Cytometry B Clin Cytom* 2018;94(3):536-41.
- Wong-Arteta J, Rey M, Aragón L, Gil-Rodríguez E, Bujanda L. The utility of flow cytometry in the diagnostic work up of malignant effusions due to nonhematopoietic neoplasms. *Cytometry B Clin Cytom* 2020;98(6):504-15.
- Wong-Arteta J, Gil-Rodríguez E, Cabezón-Vicente R, Bereciartua-Urbieta E, Bujanda L. High fluorescence cell count in pleural fluids for malignant effusion screening. *Clin Chim Acta* 2019;499:115-7.
- Wong-Arteta J, Merino A, Torrente S, Banales JM, Bujanda L. High fluorescence cell count in ascitic body fluids for carcinomatosis screening. *Clin Chem Lab Med CCLM* 2018;56(11):272-4.
- Sahu S, Gupta P, Susheilia S, Gautam U, Dey P. Application of multicolour flow cytometry in the detection of metastatic carcinoma in serous effusions: Special emphasis in atypical cytology. *Cytopathology* 2021;32(2):169-79.
- Kundu R, Handa U, Mohan H. Role of DNA flow cytometry and immunocytochemical analysis in diagnosis of malignant effusions. *Diagn Cytopathol* 2012;40(10):887-92.
- Pillai V, Cibas ES, Dorfman DM. A Simplified Flow Cytometric Immunophenotyping Procedure for the Diagnosis of Effusions Caused by Epithelial Malignancies. *Am J Clin Pathol* 2013;139(5):672-81.
- Spizzo G, Fong D, Wurm M, Ensinger C, Obrist P, Hofer C, et al. Ep-CAM expression in primary tumour tissues and metastases: an immunohistochemical analysis. *J Clin Pathol* 2011;64(5):415-20.