



Panorama

Informe técnico del IX Taller de Citometría de Flujo: inmunofenotipo de leucemias

Technical report of the 9th Workshop on Flow Cytometry: Leukemia Immunophenotyping

Berta Sánchez Sánchez

Servicio de Inmunología, Hospitales Universitarios Virgen del Rocío, Sevilla, España

Introducción

El objetivo de los diferentes talleres que se desarrollan bajo los auspicios de la Sociedad Española de Inmunología (SEI; www.inmunologia.org) es, mediante el intercambio de muestras, poner a disposición de los laboratorios participantes una herramienta útil para asegurar la calidad de los procesos analíticos. El IX Taller de Citometría de Flujo se ha desarrollado en el ámbito del XXXV Congreso de la SEI (San Sebastián 2010) y ha constado de dos ejercicios con diferentes laboratorios participantes: el Taller de Subpoblaciones Linfocitarias y, el que nos ocupa en el presente informe, el Taller de Inmunofenotipo de Leucemias.

La identificación de las diferentes poblaciones de estirpe hematopoyética, tanto normales como tumorales, es una aplicación importante de la citometría de flujo. La sensibilidad, la precisión y la reproducibilidad de esta metodología ha permitido no sólo una mejora notable en la capacidad de detectar poblaciones celulares normales y leucémicas, sino también una adscripción mucho más fiable de ellas a cada uno de los diferentes linajes que constituyen este sistema.

Material y métodos

Laboratorios participantes y responsables del Taller 2010-08-12

En los ejercicios participaron 10 laboratorios, y uno de ellos actuó como coordinador (Hospitales Universitarios Virgen del

Rocío, Sevilla). Los laboratorios recibieron las muestras con una descripción analítica y clínica del caso y remitieron los resultados a la coordinadora. La información se devolvió junto con un número de identificación propio para valorar de manera confidencial e individual sus datos, respecto al conjunto de laboratorios participantes en el Taller.

Listado de responsables y laboratorios participantes

A continuación, se indican los 10 laboratorios que participaron en el Taller de Inmunofenotipo de Leucemias 2010, junto con los nombres de los profesionales responsables del Taller pertenecientes a sus respectivos centros hospitalarios.

- Badajoz. Hospital Infanta Cristina. Josefa Melero Ruiz.
- Baracaldo. Hospital de Cruces. Marta Riñón Martínez-Gallo.
- Cádiz. Hospital Puerta del Mar. José Antonio Brieva Romero.
- Granada. Hospital Virgen de las Nieves. Francisco Ruiz-Cabello Osuna, Pilar Jiménez Gámiz.
- Madrid. Centro de Transfusión de Madrid. Félix García Sánchez, José Luis Vicario Moreno, Antonio Balas Pérez.
- Madrid. Hospital Ramón y Cajal. Ernesto Roldán Santiago.
- Murcia. Hospital Virgen de la Arrixaca. Alfredo Minguela Puras.
- Pamplona. Clínica Universitaria de Navarra. Juana Merino Roncal.

- San Sebastián. Hospital de Donostia. Pilar Etxaniz Aizpuru.
- Sevilla. Hospitales Universitarios Virgen del Rocío. Berta Sánchez Sánchez.

Los hospitales que han enviado muestras han sido: Hospital Infanta Cristina de Badajoz, Clínica Universitaria de Navarra, Hospital de Donostia y Hospitales Universitarios Virgen del Rocío de Sevilla.

Metodología del Taller 2010

Los resultados de cada parámetro se expresan como porcentajes referidos a la ventana de análisis. Cada laboratorio aplicó la ventana de análisis que consideró más adecuada para cada muestra: FSC/SSC, CD45/SSC, logSSC/CD45, CD34/SSC, CD123/SSC, CD19/SSC, CD4/SSC, CD45/CD33, HLA-DR(high)/SSC(high), CD33/SSC, CD45, CD19, CD4, CD123, CD34 y variable. En cuanto a la preparación de la muestra, se tuvieron en cuenta 3 métodos diferentes: a) lisado-lavado; b) lisado-no lavado, y c) no lisado-no lavado. Por otro lado, se informa el porcentaje de la población patológica sobre el total de leucocitos (es decir, considerando el total de células de la muestra). Por último, se solicitó información sobre el diagnóstico probable.

Las tablas con los resultados de los diferentes laboratorios se enviaron con un número de código a cada uno de los responsables de los laboratorios participantes en el Taller. A la hora de interpretar los resultados obtenidos con los diferentes marcadores celulares, se elaboró un fenotipo consenso, en el que se tuvieron en cuenta los criterios siguientes:

- El marcador tenía que haberlo estudiado más del 50% de los laboratorios participantes.
- El marcador se debe expresar en más de un 20% de las células patológicas.
- Más del 70% de los laboratorios lo informan como positivo (o negativo).

También se consideró la expresión de marcadores adicionales, datos moleculares, marcadores discrepantes, presencia de poblaciones adicionales, comentarios recibidos de los distintos laboratorios participantes, así como los diagnósticos emitidos.

Resultados

Muestra: BA-1. Enviada por: Hospital Infanta Cristina, Badajoz.
Fecha de envío: 09/02/2010

Descripción clínica y analítica del caso

Varón de 42 años de edad, que acude a urgencias por sentir astenia durante 10 días, además de petequias en párpados inferiores, que el día anterior aparecieron en extremidades inferiores. Sin fiebre, adenopatías ni visceromegalias. En el hemograma se aprecia: anemia (hemoglobina [Hb] 9,2 g/dl),

leucopenia (2,3 mill/μl) y plaquetopenia muy importante (10,0 mill/μl). Presencia de blastos. La muestra, sangre estabilizada, es remitida a los laboratorios participantes para protocolo de leucemias agudas.

Resultados

El porcentaje de la población patológica sobre el total de leucocitos osciló entre el 51 y el 75%.

- Leucemia mieloide aguda (LMA) (10 laboratorios): todos los laboratorios coinciden en el diagnóstico de leucemia mieloide aguda. El fenotipo consenso es: CD13+/CD33+/CD34+(low)/CD56+(high)/CD64+/CD117+/MPO+cit/HLA-DR-.

Adicionalmente, un laboratorio detectó expresión positiva de CD9, otro laboratorio informó positividad para CD31, mientras que un tercer laboratorio —que catalogó la leucemia como LMA-M3— detectó mediante hibridación in situ fluorescente (FISH) una rotura atípica de RARa con pérdida de la región centromérica en un 76% de los núcleos (datos no mostrados).

Ocho laboratorios informaron el proceso como "LMA-M3", un laboratorio como "LMA, posible M3", mientras que otro laboratorio la catalogó como "LMA, probable M2 t(8;21)+".

Comentarios

Dos laboratorios detectan una segunda población patológica, que oscila entre un 17 y un 27% del total de leucocitos, que no modificó el diagnóstico de LMA-M3, con el siguiente fenotipo consenso: CD13+/CD33+/CD34+/CD56+/HLA-DR-. Las ventanas empleadas por estos dos laboratorios para el análisis de esta segunda población fueron CD34/SSC y FSC/SSC. Uno de los laboratorios informó positividad para mieloperoxidasa (MPO) en citoplasma, mientras que hubo discrepancia en la expresión de CD64 y CD117.

Muestra: CUN-1. Enviada por: Clínica Universitaria de Navarra.

Fecha de envío: 23/03/2010

Descripción clínica y analítica del caso

Muestra de médula ósea de una niña de 12 años, con probable leucemia aguda. Está ajustada a 10 millones de leucocitos/ml.

Resultados

El porcentaje de la población patológica sobre el total de leucocitos osciló entre el 73 y el 96%.

- Leucemia linfoblástica aguda (LLA) B (10 laboratorios): todos los laboratorios coinciden en el diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda de estirpe B. El fenotipo consenso es: CD10+/CD19+/CD20+/CD22+/CD34-/CD45+(low)/HLA-DR+.

Adicionalmente, 6 laboratorios informaron ausencia de expresión de MPO en citoplasma. Hubo discrepancia en la expresión de nucleotidil transferasa terminal (TdT). Cuatro laboratorios informaron positividad, mientras que otros 4 encontraron expresión negativa para este marcador.

Cinco laboratorios catalogaron el proceso como LLA-B común, 2 como LLA-B, mientras que los 3 laboratorios restantes lo encuadraron como LLA-BII común, LLA EGIL BII y LLA pre-B, respectivamente.

Muestra: CUN-2. Enviada por: Clínica Universitaria de Navarra.
Fecha de envío: 30/03/2010

Descripción clínica y analítica del caso

Varón de 65 años sin fiebre, astenia o infecciones, con vida activa sin limitaciones, que acude por epigastralgiea de 2-3 días de evolución. En el hemograma se observan 85.000 leucocitos (90% de linfocitos). Se envía muestra de sangre periférica estabilizada ajustada a 10.000 células/ μ l.

Resultados

El porcentaje de la población patológica sobre el total de leucocitos osciló entre el 80 y el 97%.

— Leucemia de células T (LT) (10 laboratorios): todos los laboratorios coinciden en el diagnóstico de leucemia de estirpe T. El fenotipo consenso es: CD1a-/CD2+/CD3+(low)/CD4+/CD5+/CD7+(high)/CD8-/CD10-/CD45+/TdT-.

Tres laboratorios catalogaron el proceso como síndrome linfoproliferativo crónico T (CD4+), 2 como leucemia prolinfocítica (LPL)-T (CD4+), otros 2 como LLC/LPL-T, mientras que los 3 restantes emitieron un diagnóstico de linfoma no Hodgkin (LNH)-T, leucemia T y LLA-T medular, respectivamente.

Un laboratorio, que catalogó la leucemia como LLC/LPL-T, emitió el comentario siguiente: "Por el fenotipo y la breve descripción clínica, se había inclinado a considerar que era una LLC/prolinfocítica-T (linfocito T maduro) con pérdida de expresión de CD3/TCR en superficie celular. Sin embargo, en función de la sospecha clínica, habría que considerar la posibilidad de que fuera una LLA-T (estadio medular)".

Muestra: DO-1. Enviada por: Hospital de Donostia, San Sebastián. Fecha de envío: 01/02/2010

Descripción clínica y analítica del caso

Mujer de 81 años, con antecedentes de hipertensión arterial, insuficiencia mitral moderada e hipertensión pulmonar, en la que se observa una trombocitopenia sin adenopatías ni visceromegalias palpables. Se remite muestra de sangre periférica estabilizada con un recuento de 5.540 leucocitos de la paciente. Se aconseja introducir marcaje con CD123.

Resultados

El porcentaje de la población patológica sobre el total de leucocitos osciló entre el 4 y el 60%.

— Leucemia de células dendríticas (LCD) (8 laboratorios): todos estos laboratorios coinciden en informar las células tumorales como leucemia de células dendríticas. Tres de ellos la catalogan como plasmocitoide, mientras que un laboratorio la considera secundaria a síndrome mielodisplásico.

— LMA (1 laboratorio): informa la población tumoral como leucemia mieloide aguda (subtipo más probable LMA-M4). Este laboratorio no incluyó marcaje con CD123 en el panel de estudio. Uno de los laboratorios participantes no emitió resultados. El fenotipo consenso es: CD4+/CD36+/CD45+/CD123+/HLA-DR+/MPO-cit.

Hubo discrepancia en la expresión de CD33. Cinco laboratorios encontraron más de un 30% de células positivas,

mientras que otros 4 encontraron expresión negativa para este marcador.

Comentarios

Siete laboratorios detectan una segunda población patológica, que oscila entre un 5,6 y un 29% del total de leucocitos, que no modificó el diagnóstico de LCD, con el fenotipo consenso siguiente: CD4+/CD33+/CD45+/CD123+/HLA-DR+/MPO-cit. Las ventanas empleadas por estos laboratorios para el análisis de esta segunda población fueron CD45, CD45/CD33, CD45/SSC y FSC/SSC. Hubo discrepancia en la expresión de CD11b, CD13, CD14, CD15 y CD117. Uno de estos laboratorios clasificó esta población como blastos M1, mientras que un octavo laboratorio reportó la detección de una población mieloide hipogranular, sin remitir datos acerca de su inmunofenotipo.

Un laboratorio detecta una tercera población patológica (5%), que no modifica el diagnóstico de LCD, con el inmunofenotipo siguiente: CD4+/CD13+/CD33+(low)/CD45+(low)/CD117+/HLA-DR+(high)/MPO-cit. La ventana de análisis utilizada fue CD34.

Otro laboratorio comenta que "aparte de las dos poblaciones descritas, patológica (33%) y monocitos atípicos con baja expresión de CD14 (18%), se detectan mieloblastos CD34+ (5%) y neutrófilos (10%) claramente hipogranulados, lo cual indica que se trata de una leucemia secundaria a mielodisplasia previa. Por el fenotipo CD34-/CD117-/CD13-/CD33-/MPO-(ausencia de marcadores mieloideos) junto a DR+/CD4+/CD36+ y CD64- (no monocitoide), cabe considerar la posibilidad de que se trate de una línea de células dendríticas, a pesar de ser CD56- (típico de las células dendríticas plasmocitoideas)".

Muestra: SE-1. Enviada por: Hospitales Universitarios Virgen del Rocío, Sevilla. Fecha de envío: 28/01/2010

Descripción clínica y analítica del caso

Mujer de 48 años con pancitopenia moderada (trombopenia y anemia), esplenomegalia dudosa en la exploración física, sin adenopatías en cadenas ganglionares. Sospecha de síndrome linfoproliferativo crónico. Se remite muestra de sangre estabilizada y diluida en $\frac{1}{2}$ tampón fosfato salino con un recuento inicial de 5.290 leucocitos/ μ l (69,6% de linfocitos).

Resultados

El porcentaje de la población patológica sobre el total de leucocitos osciló entre el 31 y el 70%.

— Tricoleucemia (TL) (8 laboratorios): todos estos laboratorios coinciden en informar las células tumorales como TL, mientras que un laboratorio informa la población tumoral como LNH de células B (LNH-B). Uno de los laboratorios participantes no emitió resultados. El fenotipo consenso es: CD11c+(high)/CD19+/CD20+(high)/CD22+(high)/CD23+/CD25+/CD103+.

Un laboratorio encontró la población celular patológica IgD+/IgM+/kappa+, mientras que otro laboratorio comentó: "Imposible establecer la clonalidad kappa/lambda, supongo que por el fijador utilizado". El laboratorio que clasificó la leucemia como LNH-B no incluyó CD103 en el panel de estudio.

Muestra: SE-2. Enviada por: Hospitales Universitarios Virgen del Rocío, Sevilla. Fecha de envío: 04/02/2010

Descripción clínica y analítica del caso

Varón de 83 años, con sospecha de leucemia aguda de hábito mieloide. Se remite muestra de sangre periférica con un recuento de 11.600 leucocitos/ μ l (40% de blastos).

Resultados

El porcentaje de la población patológica sobre el total de leucocitos osciló entre el 20 y el 72%.

— LMA (7 laboratorios): todos estos laboratorios coinciden en informar las células tumorales como leucemia mieloide aguda, mientras que un laboratorio informa la población tumoral como síndrome mielodisplásico en transformación a LMA. Dos de los laboratorios participantes no emitieron resultados. El fenotipo consenso es: CD4+(low)/CD11c+/CD13+/CD14-/CD15+/CD20+/CD33+/CD34-/CD45+/CD56+(high)/CD64+/CD117-/HLA-DR+/MPO+cit.

Seis laboratorios catalogaron el proceso como "LMA-M5", uno de ellos como "LMA-M5a", mientras que otros dos laboratorios la catalogaron como "LMA-M5b". Un laboratorio, que catalogó la leucemia como LMA-M5a, realizó el comentario siguiente: "A pesar de la fuerte expresión de CD56 y la ausencia de CD14, me he inclinado a considerarla como monocitoide por la fuerte expresión de CD33, CD36, CD64 y DR, así como por la coexpresión de CD4(low) y CD15".

Comentarios

Un laboratorio detecta una segunda población patológica (40%), que no modificó el diagnóstico de SMD en transformación a LMA, con el fenotipo siguiente: CD10+(low)/CD11c+(low)/CD13+(low)/CD15+(high)/CD33+(low)/CD56+/CD65+(low)/CD71+(low)/HLA-DR+. La ventana empleada por este laboratorio para el análisis de esta segunda población fue logSSC/CD45.

Muestra: SE-3. Enviada por: Hospitales Universitarios Virgen del Rocío, Sevilla. Fecha de envío: 10/02/2010

Descripción clínica y analítica del caso

Mujer de 71 años con linfocitosis y sospecha de síndrome linfoproliferativo crónico. Se remite muestra de sangre periférica con un recuento de 50.000 células/ μ l.

Resultados

El porcentaje de la población patológica sobre el total de leucocitos osciló entre el 47 y el 83%.

— LLC-B (10 laboratorios): todos los laboratorios coinciden en el diagnóstico de leucemia linfoides crónica de células B. El fenotipo consenso es: CD5+/CD19+/CD20+(low)/CD23+/CD45+.

Hubo discrepancia en la expresión de CD22. Cinco laboratorios encontraron más de un 50% de células positivas, mientras que otros 3 encontraron menos de un 10% de células positivas para este marcador. Adicionalmente, un laboratorio encontró la población celular patológica IgD+/IgM+/kappa+.

Consideraciones finales

Respecto a los marcadores, hubo discrepancias en la expresión de CD15, CD22, CD33, CD64 y TdT. Dado que algunos de estos marcadores son muy importantes en la orientación diagnóstica, en futuros ejercicios sería aconsejable consensuar la clona, el fluorocromo y el sistema de permeabilización, en cada caso.

En líneas generales, ha habido bastante homogeneidad en los diagnósticos emitidos por los diferentes laboratorios participantes en el presente Taller, y da la impresión de que no hay grandes problemas con las técnicas ni los modos de análisis utilizados en cada laboratorio. Sin embargo, ha habido una gran disparidad de criterios para clasificar una misma muestra, aun habiendo informado fenotipos para la población tumoral muy similares, especialmente en el caso de la leucemia de células T. Para homogeneizar nuestros criterios, sería conveniente ajustarnos a los fenotipos consenso para clasificarlos, así como unificar criterios diagnósticos. Además, debemos aportar todos los datos analíticos de que se disponga (alteraciones genéticas, características morfológicas, datos de presentación clínica, etc.), que siempre constituirán un complemento muy valioso para el diagnóstico final.

Por último, lamentar que el número de laboratorios participantes en el ejercicio de Inmunofenotipo de Leucemias vaya disminuyendo cada año.