

# Valutazione citofluorimetrica del liquido cefalorachidiano in oncoematologia

M.M. Ciriello, L. Calcagno, T. Callegari, C. Arfini

Laboratorio Analisi, Azienda Ospedaliera Nazionale di Alessandria

## Riassunto

La localizzazione meningeale di neoplasia ematologica, complicanza temibile di linfomi e leucemie acute, ha importanti implicazioni sulla prognosi e sulle scelte terapeutiche. La tecnica diagnostica gold standard per l'identificazione di coinvolgimento liquorale è la citologia convenzionale, che risulta tuttavia poco sensibile e specifica. Recenti lavori evidenziano che l'accuratezza diagnostica può essere aumentata utilizzando la tipizzazione immunofenotipica delle cellule neoplastiche liquorali in citometria a flusso. Il National Comprehensive Cancer Network (NCCN) nelle linee guida 2010 (Clinical Practice Guidelines in Oncology), relativamente alla diagnosi di localizzazione leptomeningea, raccomanda l'impiego dell'analisi del liquor in citometria a flusso in caso di pazienti affetti da neoplasie ematologiche. Dal 2006 è in corso in Italia uno studio prospettico coordinato dal Gruppo Italiano Multiregionale per le Leucemie e i Linfomi (GIMURELL), con l'obiettivo primario di confrontare la citologia convenzionale e la citometria a flusso del liquido cerebrospinale, in un'ampia coorte di pazienti affetti da linfoma non Hodgkin aggressivo, di nuova diagnosi, ad alto rischio per localizzazione leptomeningea. Tutto questo indica il grande interesse attuale della comunità scientifica per l'analisi liquorale in citometria a flusso, tecnica che consente l'identificazione delle cellule maligne in modo oggettivo, utilizzando l'evidenza di restrizione clonale kappa o lambda nei linfomi B o di fenotipi aberranti in caso di linfomi T.

## Summary

### Flow cytometric evaluation of cerebrospinal fluid in hematological malignancies

The diagnosis of leptomeningeal disease of haematological malignancies, adverse complication of lymphomas and acute leukemias, has great prognostic and therapeutic implications in patients at high risk of leptomeningeal disease. The diagnostic gold standard to identify cerebrospinal fluid (CSF) involvement is conventional cytological analysis, a technique characterized by low sensitivity and specificity. Recent papers make evidence that the efficiency of CSF involvement detection could improve by use of Flow Cytometry (FCM) immunophenotypic analysis of CSF samples. The National Comprehensive Cancer Network (NCCN) guidelines 2010 (Clinical Practice Guidelines in Oncology) recommends CSF flow cytometric analysis in patient's CSF with hematologic malignancies. Since 2006 is taking place a multicentric prospective Italian study by Multiregional Italian Group for Leukemias and Lymphomas (GIMURELL), with the primary objective to compare conventional cytology versus FCM of cerebrospinal fluid in a large cohort of patients with newly diagnosed aggressive non-Hodgkin's lymphoma at high risk for leptomeningeal disease. All this indicates the great current interest of the scientific community for analyzing cerebrospinal fluid by FCM, a technique which allows the identification of malignant cells with an objective method, using evidence of clonal kappa/lambda restriction in B-cell lymphomas or aberrant phenotypes in T-cell lymphomas.

*Key-words:* cerebrospinal fluid, flow cytometry, cytology, leukemia, lymphoma.

## Introduzione

La localizzazione meningeale di cellule neoplastiche è una temibile complicanza in pazienti affetti da tumori solidi (4-15%), da neoplasie ematologiche (5-15%) e da tumore cerebrale primitivo (1-2%). Tale incidenza è tuttavia sotto-stimata.

Il sospetto di localizzazione neoplastica del sistema ner-

voso centrale si pone in base alle manifestazioni cliniche e/o alle tecniche di neuroimaging e viene confermata mediante analisi citologica del liquido cefalorachidiano (LCR), che oggi è ancora considerata la tecnica diagnostica gold standard, dotata di elevata specificità ma, associata a sensibilità <50%, con elevata frequenza di risultati falsamente negativi<sup>1</sup>, come è stato dimostrato da studi autoptici di

comparazione diagnostica pre e post-mortem<sup>2</sup>. Inoltre l'interpretazione dei preparati citologici può essere difficile a causa della povertà di cellule nel LCR e della difficoltà di definire morfologicamente cellule benigne o maligne, soprattutto linfoidi.

Recentemente sono stati segnalati metodi complementari per l'analisi del LCR, quali l'immunofenotipo con tecnica citometrica, gli studi di citogenetica e biologia molecolare. È stata dimostrata l'elevata sensibilità dello studio del LCR in citometria a flusso per l'identificazione di localizzazione linfomatosa secondaria, sia in pazienti di nuova diagnosi, sia nelle recidive post trattamento<sup>3</sup>. Un recente lavoro<sup>4</sup> ha messo in evidenza che la sensibilità diagnostica della citometria a flusso è da due a tre volte più elevata rispetto a quella della citologia convenzionale. Per questo il National Comprehensive Cancer Network nelle ultime linee guida<sup>5</sup> raccomanda l'impiego routinario della citometria a flusso in associazione con la citologia convenzionale del LCR, per la ricerca di localizzazione cerebrale di linfoma, in quanto nello studio di Bromberg era riportato un piccolo numero di LCR negativi in citometria a flusso e positivi all'esame citologico.

Anche la tecnica PCR potrebbe aumentare la sensibilità diagnostica di localizzazione maligna meningeo, pur avendo la limitazione della conoscenza di DNA-primers tumore specifici<sup>6</sup>, che attualmente sono scarsamente disponibili e conosciuti solo per alcune mutazioni di cellule linfomatose.

Sono stati inoltre valutati numerosi marcatori biochimici di cellule neoplastiche nel LCR,  $\beta_2$ -microglobulina, LDH, alfa-fetoproteina, HCG, ma l'utilità è risultata scarsa per la loro bassa sensibilità. Altri marcatori biochimici più innovativi, dotati di elevate sensibilità e specificità per cellule neoplastiche, sono stati testati al fine di raggiungere una diagnosi più precoce e utile nelle scelte terapeutiche: metalloproteinasi, catepsine, cistatina C, molecole coinvolte nell'angiogenesi VEGF. Tuttavia si tratta di molecole dosabili nel LCR con test di laboratorio di difficile standardizzazione, che sono modificate anche dai cambiamenti del flusso liquorale, quindi non ancora utilizzabili nella pratica clinica.

Recentemente è stato pubblicato un interessante articolo<sup>7</sup> sul ruolo della citometria nell'identificazione dell'infiltrazione leptomeningeo in linfomi non-Hodgkin aggressivi: gli autori hanno dimostrato una netta superiorità della citometria a flusso rispetto alla morfologia convenzionale nell'evidenziare la malattia meningeo nei linfomi aggressivi. Si tratta di uno studio multicentrico, ad ampia casistica (123 pazienti) con analisi citometrica centralizzata, nel quale la sensibilità e la specificità ottenute sono molto alte e, come atteso, i campioni positivi in citometria e negativi in morfologia sono quelli caratterizzati da un'infiltrazione meningeo di minore entità.

Dopo tutti questi contributi a favore della citometria a flusso resta una domanda: è possibile sostituire i vecchi parametri di assegnazione del rischio di malattia meningeo (LDH elevato, presenza di malattia extralinfonodale, diagnosi di linfoma di Burkitt) con la sola citometria a flusso?

## Il metodo citometrico

Sono ormai numerose le segnalazioni in letteratura della

maggior sensibilità diagnostica della citometria a flusso rispetto alla citologia, nella ricerca di cellule neoplastiche liquorali, soprattutto nei linfomi non Hodgkin aggressivi. Diverse strategie metodologiche sono state impiegate.

Il gruppo italiano di Napoli<sup>8</sup> ha analizzato i campioni di LCR con 2 differenti approcci a 4 (FITC/PE/PerCP/APC) o 6 colori (FITC/PE/PerCP/PE-CY7/APC/APC-CY7). I mix anticorpali impiegati nell'approccio a 4 colori erano suddivisi in 3 tubi: 1) Kappa/lambda/CD45/CD19; 2) CD20/CD10/CD45/CD19; 3) CD5/CD3/CD7/CD2. I primi due tubi erano usati in caso di B-NHL, il terzo in caso di T-NHL. I campioni di liquor superiori a 1 ml venivano centrifugati e risospesi in 200  $\mu$ l di PBS, 50  $\mu$ l della sospensione veniva incubato con l'appropriato mix anticorpale. Quando il volume liquorale era inferiore a 1 ml, 200  $\mu$ l erano direttamente incubati con gli appropriati anticorpi. L'analisi citometrica era considerata positiva se evidenziava un cluster di almeno 30 elementi con le caratteristiche immunofenotipiche delle cellule linfomatose.

Un gruppo cooperativo internazionale<sup>9</sup> ha definito un Consensus Protocol per l'analisi citometrica del liquor (Basic Protocol e Alternate Protocol), da tre a otto colori, con eventuale conta assoluta cellulare mediante impiego di microsfere fluorescenti a numero noto. Il protocollo riguarda anche le fasi di raccolta, stoccaggio e trasporto del campione, oltre a quelle di marcatura e lettura citometrica. Importante è processare il LCR entro 1 ora dalla raccolta oppure stabilizzarlo con fissativi. Il LCR centrifugato e risospeso in 300  $\mu$ l di PBS viene successivamente marcato in quantità di 100  $\mu$ l con appropriati mix anticorpali, che variano a seconda della conoscenza o meno della patologia di base (linfoma, leucemia acuta o solo sintomi neurologici in assenza di diagnosi pregressa). I campioni di LCR che presentano clusters di più di 25 eventi con caratteristiche immunofenotipiche di linfoma o leucemia sono considerati positivi, clusters tra 10 e 25 eventi sono sospetti e clusters di meno di 10 eventi sono negativi. La presenza di blasti nel LCR in caso di leucosi acuta è facilmente identificabile in citometria a flusso grazie allo specifico profilo immunofenotipico di queste cellule. In caso di linfoma B bisogna tenere presente che nel liquor normale i linfociti B sono presenti in quantità molto basse, al limite della soglia di sensibilità della citometria e, se aumentano, derivano da invasione meningeo di un linfoma B. La sensibilità di identificazione di cellule di linfoma T dipende dal profilo immunofenotipico aberrante del linfoma stesso, che permette di distinguere i linfociti T neoplastici da quelli normali.

Il gruppo spagnolo di Alberto Orfao<sup>7</sup> ha utilizzato, per lo studio multicentrico sui linfomi aggressivi, un approccio a 6 colori utilizzando 9 anticorpi monoclonali, sfruttando un'altra particolarità della citometria, che permette di abbinare nello stesso fluorocromo 2 anticorpi monoclonali a differente intensità di espressione e localizzati su popolazioni cellulari diverse, consentendo così di eseguire analisi policromatiche spinte anche a chi dispone di tecnologie a 6 colori.

## La nostra esperienza

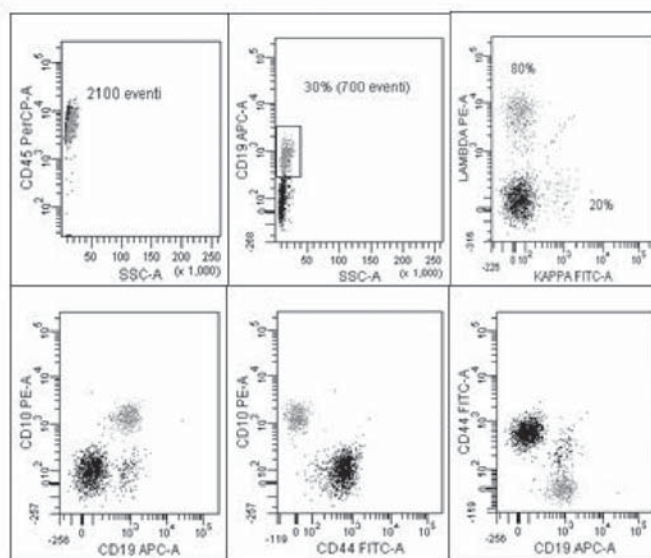
Dal 2006 il nostro laboratorio esegue l'analisi citofluorimetrica del liquor di pazienti con linfomi B aggressivi per la valutazione della recidiva meningeo, in casi di sospetto

linfoma del SNC, inviati sulla base della sintomatologia neurologica o di immagini sospette di risonanza magnetica e nelle leucosi acute, ove previsto dal protocollo terapeutico.

Il nostro approccio prevede di processare il campione il più presto possibile, massimo entro 1 ora dalla raccolta, utilizzando, nel caso di sospetto linfoma, un approccio a 4 colori in 2 tempi. Nel primo step prepariamo 2 tubi di screening con Anticorpi Monoclonali (Becton Dickinson Biosciences, San José, California) coniugati rispettivamente con FITC/PE/PerCP/APC: kappa/lambda/CD45/CD19 e CD5/CD20/CD45/CD3 o, alternativamente, CD3/CD20/CD45/CD10 in base alla conoscenza o meno di un fenotipo precedentemente individuato su linfonodo o midollo. Questo approccio nella maggior parte dei casi risulta sufficiente per rispondere al quesito clinico. Nei casi in cui identifichiamo una popolazione patologica non nota, passiamo al secondo step, usando un appropriato pannello di reagenti al fine di completare la definizione del fenotipo cellulare (Fig. 1). In caso di sospetta recidiva meningea di leucosi acute utilizziamo un tubo contenente gli anticorpi selezionati alla diagnosi per la malattia residua dello stesso paziente.

La cellularità liquorale viene preventivamente valutata con doppio metodo, in camera di Nageotte e su ADVIA 2120i (Siemens Healthcare Diagnostics, Monaco, Germania). Nel caso in cui il campione sia paucicellulare (<10 elementi/ $\mu$ l), procediamo alla marcatura senza una precedente centrifugazione al fine di evitare perdita della scarsa componente cellulare. Il campione è considerato positivo quando otteniamo clusters cellulari costituiti da più di 30 elementi, espressioni caratteristiche fenotipiche di linfoma (B o T), o leucemia acuta, ecc.

In tre anni (2006-2009) abbiamo analizzato in citometria a flusso 52 campioni di liquor, riscontrando presenza di elementi neoplastici clonali in 7 pazienti (13,7%) e 1 recidiva meningea di leucosi acute mieloide (MS), dopo 5 anni da trapianto allogenico (Tab. I). Sette liquor positivi provenivano da pazienti con diagnosi di LNH o da pazienti con lesioni sospette al SNC (diagnostica per immagini). In 6 pazienti era già stata fatta diagnosi di LNH e l'analisi citofluorimetrica ne ha sempre confermato il sottotipo. In tutti i casi studiati non era stata praticata profilassi intracranica. L'analisi citologica del liquor, quando disponibile, ha dato sempre esito negativo. La cellularità liquorale era



**Figura 1.** liquor in cui si evidenzia una popolazione di linfociti B (80%), clonale Lambda, CD10+ CD44-.

in media 46/ $\mu$ l (2-100/ $\mu$ l) determinata con doppia conta, in camera Nageotte e su ADVIA 2120i.

## Conclusioni

I vecchi metodi per la diagnosi e il monitoraggio delle localizzazioni neoplastiche al SNC, hanno mostrato scarse sensibilità e specificità nell'individuazione della malattia meningea. A questi vanno affiancati nuovi metodi, in primis lo studio del LCR in citometria a flusso, che grazie alle elevate sensibilità e specificità, ha le caratteristiche per una precoce identificazione di coinvolgimento del SNC. Deve essere potenziata anche la ricerca di nuovi biomarcatori di cellule neoplastiche nel liquor. L'impiego di nuovi metodi diagnostici nei trials clinici potrebbe produrre dati a favore di un più precoce trattamento delle localizzazioni meninee e fornire il razionale per autorizzare la profilassi del SNC prima che la malattia sia sintomatica e si stabilisca un deficit neurologico permanente o, nei casi più avanzati, l'exitus del paziente.

## Bibliografia

1. Chamberlain MC, Glantz M, Groves MD, Wilson WH. Dia-

**Tabella I.** Liquor positivi all'analisi citofluorimetrica presso Laboratorio Analisi A.O.N. di Alessandria (2006-2009).

Pazienti	Istologia	Immunofenotipo	FISH	Citologia	cellule/ $\mu$ l
1	BL	B(CD19+CD20+CD10+)	t(8;14)	ND	100
2	DLBCL	B(CD20+CD38+CD138+)	N	N	18
3	DLBCL	B(CD19+CD20+)	N	ND	45
4	MCL	B(CD19+CD20+CD5+)	t(11;14)	N	2
5	B-CLL	B(CD19+CD20+CD5+)	N	N	58
6	BL	B(CD19+CD20+CD10+)	t(14;18)	N	3
7	BL	B(CD19+CD20+CD10+)	N	P	39
8	MS	My(CD33+CD34+CD117+)	N	P	99

Abbreviazioni: BL: Burkitt Lymphoma; DLBCL: Diffuse Large B Cell Lymphoma; MCL: Mantle Cell Lymphoma; B-CLL: B-Chronic Lymphocytic Leukemia; MS: Myeloid Sarcoma; P=Positivo; N= Negativo; ND= Non disponibile.

- gnostic tools for neoplastic meningitis: detecting disease, identifying patient risk and determining benefit of treatment. *Semin Oncol* 2009; 4:S35-S45.
2. Glass JP, Melamed M, Chernik NL, Posner JB. Malignant cells in cerebrospinal fluid (CSF): the meaning of a positive CSF cytology. *Neurology* 1979; 29:1369-75.
  3. Hedge U, Filie A, Little RF, Janik JE, Grant N, Steinberg SM, et al. High incidence of occult leptomeningeal disease detected by flow cytometry in newly diagnosed aggressive B-cell lymphomas at risk for central nervous system involvement: the role of flow cytometry versus cytology. *Blood* 2005; 105:496-502.
  4. Bromberg JEC, Breems DA, Kraan J, Bikker G, van der Holt B, Sillevs Smitt P, et al. CSF flow cytometry greatly improves diagnostic accuracy in CNS hematologic malignancies. *Neurology* 2007; 68:1674-9.
  5. Brem S, Bierman PJ, Black P, Brem H, Chamberlain M, Chiocca EA, et al. NCCN clinical practice guidelines in oncology. Central nervous system cancer. V1 2010, 08/03/2010. Available at: URL: [http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/f\\_guidelines.asp](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp). (data di consultazione: 24.7.2010).
  6. Rhodes CH, Glantz MJ, Glantz I, Lekos A, Sorenson GD, Honsinger C, et al. A comparison of polymerase chain reaction examination of cerebrospinal fluid and conventional cytology in the diagnosis of lymphomatous meningitis. *Cancer* 1996; 77:543-8.
  7. Quijano S, Lopez A, Sancho JM, Panizo C, Deben G, Castilla 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.
  8. Di Noto R, Scalia G, Abate G, Gorrese M, Pascariello C, Raia M, et al. Critical role of multidimensional flow cytometry in detecting occult leptomeningeal disease in newly diagnosed aggressive B-cell lymphomas. *Leuk Res* 2008; 32:1196-9.
  9. Kraan J, Gratama JW, Haioun C, Orfao A, Plonquet A, Porwit A, et al. Flow cytometric immunophenotyping of cerebrospinal fluid. *Curr Protoc Cytom* 2008; Chapter 6:Unit 6.25.