

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

CITOMETRÍA DE FLUJO EN EL DIAGNÓSTICO DE LOS DERRAMES NEOPLÁSICOS



Autor: Jhonatan Alexander Wong Arteta.

Director y tutor: Dr. Luis Bujanda Fernández de Piérola.

Donosti, enero 2022.

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

**Tesis realizada por compendio de artículos para optar al
título de Doctor en Medicina.**

Autorizaciones:

Dedicatoria:

A Krups y a Illari, por el amor, la paciencia y el apoyo que me dais y la paz que con vosotras consigo.

A mi madre, por tu amor incondicional.

Al papá Juan, por tus cuidados y enseñanzas.

A Helena, por tu disciplina y tus consejos.

A Luis, por el conocimiento, la paciencia, la amabilidad y la confianza que muy bien sabes dar.

A mi padre, a mi hermano y a mis hermanas.

Y finalmente a Adolfo y a mis adjuntas (Raquel, Eva, Asun, Edurne, Mercedes y Larraitz) por apoyarme y creer en mí.

A ustedes les dedico un pedacito de este trabajo porque sin vuestro apoyo me hubiera sido imposible llegar hasta aquí.

Agradecimientos:

A los servicios de Análisis clínicos e Inmunología del hospital universitario Donostia, por vuestra amabilidad, por hacerme sentir en una segunda casa, porque sin vuestra ayuda todos los objetivos detrás de esta tesis hubieran sido muy difíciles de alcanzar.

Al servicio de enfermedades hepáticas y gastrointestinales de Biodonostia, porque gracias a vuestros consejos y conocimientos pude iniciar aquel camino que hoy alcanza su primera meta con esta tesis.

Abreviaturas:

IHC (Inmunohistoquímica)

FSC o “forward scatter” (Luz dispersada frontalmente)

SSC o “sideward scatter” (Luz dispersada lateralmente)

CD (Clústeres de diferenciación)

FC (Citometría de flujo)

LDH (Lactato deshidrogenasa)

HFC (Células de alta fluorescencia)

HF–BF# (Células de alta fluorescencia totales)

HF–BF% (Células de alta fluorescencia en porcentaje)

HTP (Hipertensión portal)

TC–BF# (Células nucleadas totales)

TC (Tomografía computarizada)

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	37
2. MARCO TEÓRICO	41
2.1 Ascitis:.....	43
a) Definición y etiología.....	43
b) Cuadro clínico:.....	44
c) Diagnóstico:	44
2.2 Derrame Pleural:	47
a) Definición y etiología:.....	47
b) Cuadro clínico:.....	48
c) Diagnóstico:	49
2.3 Citometría de flujo:	56
a) Inmunofenotipado:	56
b) Aspectos técnicos:.....	57
c) Reactivos utilizados en el inmunofenotipado:	61
2.4 Citometría de flujo para el cribado de los derrames malignos:	62
2.5 Citometría de flujo en el diagnóstico de los derrames neoplásicos no hematológicos.....	66
3. HIPÓTESIS.....	71
Hipótesis:.....	73
4. OBJETIVOS	75
4.1 Objetivo general 1:.....	77
4.1.1 Objetivo específico 1:.....	77
4.1.2 Objetivo específico 2:.....	77
4.1.3 Objetivo específico 3:.....	77
4.1.4 Objetivo específico 4:.....	78
4.1.5 Objetivo específico 5:.....	78
4.2 Objetivo general 2:.....	79
4.2.1 Objetivo específico 6:.....	79
4.2.2 Objetivo específico 7:.....	79
4.2.3 Objetivo específico 8:.....	80
5. RESUMEN Y DISCUSIÓN.....	81
Publicación 1: High fluorescence cell count in ascitic body fluids for carcinomatosis screening.	83
Resumen 1:.....	83
Discusión 1:.....	87

Publicación 2: High fluorescence cell count in pleural fluids for malignant effusion screening	89
Resumen 2:.....	89
Discusión 2:.....	93
Publicación 3: The utility of flow cytometry in the diagnostic work up of malignant effusions due to non-hematopoietic neoplasms.	95
Resumen 3:.....	95
Discusión 3:.....	101
6. CONCLUSIONES	103
1. Conclusión general 1:.....	105
2. Conclusión general 2:.....	105
7. REFERENCIAS.....	107
8. ANEXOS.....	117

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1 Causas de ascitis.....	43
Tabla 2: Causas de ascitis relacionada a malignidad	44
Tabla 3: Clasificación de la ascitis según el gradiente de albúmina suero – ascitis.....	45
Tabla 4: Mecanismos de producción de derrame pleural.....	48
Tabla 5: Características organolépticas principales del derrame pleural.	50
Tabla 6: Causas de exudado pleural.....	52
Tabla 7: Sensibilidad de la citología en el derrame pleural.	55
Tabla 8: Expresión de EpCAM en diferentes grupos celulares.....	67
Tabla 9: Rendimiento de las variables estudiadas en el líquido ascítico.....	85
Tabla 10: Rendimiento de las variables estudiadas en el líquido pleural.....	91
Tabla 11: Rendimiento de la citometría y la citología en el diagnóstico de los derrames neoplásicos, después de utilizar un algoritmo de cribado.	98
Figura 1: Excitación y emisión de un Fluorocromo.....	57
Figura 2: Componentes principales de un citómetro de flujo.....	59
Figura 3: Sistema óptico de un citómetro de flujo.	60
Figura 4: Signos principales de atipia celular	64
Figura 5: Escatergrama del canal WDF para líquidos biológicos.....	66
Figura 6: Distribución de los eventos CD45-/EpCAM+	70
Figura 7: Áreas bajo la curva de las variables estudiadas en el líquido ascítico.	84
Figura 8: Áreas bajo la curva de las variables estudiadas en el líquido pleural.	90
Figura 9: Algoritmo para el cribado de los derrames neoplásicos.	93
Figura 10: Algoritmo para el cribado de las células malignas.	96
Figura 11: Áreas bajo la curva de la citología y la citometría para la detección de células malignas.	97
Figura 12: Correlación entre el porcentaje de células atípicas y eventos CD45-/EPCAM+.....	99

1. INTRODUCCIÓN

La ascitis relacionada con malignidad (ascitis maligna) es una afección grave, con una supervivencia global de entre 1 y 4 meses después del diagnóstico, y representa del 7 al 10 % de todos los casos de ascitis. Su etiología es diversa, pero aproximadamente dos tercios de ese 7 a 10 % es secundaria a carcinomatosis (1–3).

El derrame pleural maligno es principalmente secundario a metástasis pleural. Su prevalencia es del 15 al 35% de todos los derrames pleurales, y la mediana de supervivencia oscila entre 4 y 6 meses (4).

Esta prevalencia tan elevada hace ver lo importante de realizar un diagnóstico rápido y correcto de estos derrames.

Hoy en día, la citología es el gold estándar para el diagnóstico de los derrames malignos. Su estudio incluye la determinación del número de células y su identificación, pero esta última tiene sus limitaciones, destacando el tiempo consumido, el cual es especialmente importante en un laboratorio de Urgencias. Aunque las células malignas tienen una morfología característica (5), a menudo es difícil diferenciarlas de los macrófagos y las células mesoteliales reactivas, y esto se complica más cuando la celularidad de la muestra es escasa y/o cuando la muestra posee una cantidad elevada de células hematológicas o mesoteliales (6).

La sensibilidad de la citología en el diagnóstico de derrames malignos es del 40% al 80%. Este margen tan amplio es ocasionado principalmente por problemas derivados de la utilización de técnicas manuales, siendo la calidad de las preparaciones y la experiencia entre los observadores (7). Para mejorar la sensibilidad diagnóstica, muchos estudios adicionales han sido propuestos, entre estos, la inmunohistoquímica (IHC) se ha convertido en el método auxiliar más utilizado en el diagnóstico de derrames, permitiendo la clasificación correcta de la mayoría de los tumores (8). Sin embargo, es una técnica que consume mucho tiempo.

Sysmex XN-350® es un analizador hematológico automatizado que utiliza citometría de flujo de fluorescencia para analizar las propiedades fisiológicas y químicas de las células, proporcionando información sobre el tamaño y la estructura celular, además del

intracelular a través del uso de marcadores de fluorescencia que se unen específicamente a los ácidos nucleicos (9,10). Combinando estos parámetros identifica a los neutrófilos, eosinófilos, monocitos y linfocitos; y excluye de esta clasificación diferencial a los macrófagos, células mesoteliales y neoplásicas (11), dejándolas agrupadas como células de alta fluorescencia (HFC). De esta manera, HFC incluye a células que, debido a su tamaño, complejidad y contenido nucleico, pueden ser diferenciadas de las células sanguíneas.

La citometría de flujo (FC) se usa ampliamente en el diagnóstico de neoplasias hematológicas; pero a pesar de haber demostrado su utilidad potencial en el diagnóstico y seguimiento de los derrames malignos (12–15), el uso de la FC en las neoplasias no hematológicas no es habitual. En concordancia con esto, la literatura publicada sobre este tema es escasa. FC podría utilizarse de forma rápida sobre células viables contenidas en muestras en fresco, disminuyendo el tiempo para el diagnóstico de los derrames malignos.

Conociendo que la ascitis maligna y el derrame pleural maligno presentan prevalencias muy diferentes de infiltración neoplásica (7 al 10% y 15 al 35%, respectivamente), nuestro objetivo fue desarrollar 2 algoritmos para el cribado de los derrames malignos, uno para la ascitis y otro para el derrame pleural, centrados en la automatización del flujo de trabajo mediante del uso de las células de alta fluorescencia. Posteriormente, una vez conseguidos dichos algoritmos, nuestro objetivo final fue estudiar la utilidad de la citometría de flujo en el diagnóstico de dichos derrames secundarios a neoplasias no hematológicas.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Ascitis:

a) **Definición y etiología:** La ascitis es la acumulación de líquido dentro de la cavidad peritoneal. Puede ser secundaria a muchas patologías, siendo las causas principales la cirrosis hepática, las neoplasias malignas y el fallo cardíaco (2) (Tabla 1).

Tabla 1 Causas de ascitis

Patología	Proporción
Cirrosis	81 %
Neoplasias malignas	10 %
Fallo cardíaco	3 %
Tuberculosis	2 %
Díálisis peritoneal	1 %
Otros	3 %

Ascitis relacionada a malignidad:

Se define así a la ascitis secundaria a neoplasias malignas. Puede observarse en diferentes tumores, especialmente en ovario, mama, colon, pulmón y páncreas (3). Se han descrito hasta 6 mecanismos involucrados en su desarrollo (16), en los cuales la carcinomatosis peritoneal es el más importante y se le atribuyen los dos tercios de su etiología (Tabla 2). La mediana de supervivencia al diagnóstico de ascitis relacionada con malignidad es de uno a cuatro meses (1). Los pacientes que no presentan un cáncer de ovario tienen un peor pronóstico, con una supervivencia menor a tres meses (16).

Tabla 2: Causas de ascitis relacionada a malignidad

Patología	Proporción
Carcinomatosis peritoneal	53 %
Carcinomatosis peritoneal y metástasis hepática masiva	13 %
Metástasis hepática masiva con hipertensión portal	13 %
Carcinoma hepatocelular con cirrosis	13 %
Ascitis quilosa (usualmente por linfoma)	7 %
Síndrome de Budd–Chiari asociado a malignidad	Raro

b) **Cuadro clínico:** Cuando la ascitis se desarrolla, los pacientes suelen buscar atención médica por dolor abdominal, disnea o saciedad temprana. El dolor abdominal puede deberse a una combinación de factores, que incluyen la invasión nerviosa por el tumor, el estiramiento de la cápsula hepática o de la pared abdominal. En el caso de la ascitis relacionada a malignidad su desarrollo está relacionado con una carga tumoral importante, por eso los pacientes generalmente presentan un síndrome constitucional (astenia, anorexia y pérdida de peso significativa) antes que aparezca la ascitis, a pesar del peso que el paciente gana por el líquido ascítico que se añade.

c) **Diagnóstico:**

Paracentesis: es la forma más eficaz de confirmar la presencia de ascitis y filiar su origen (17,18).

- **Apariencia:** La información macroscópica del líquido ascítico puede ser útil en el diagnóstico diferencial. El líquido claro se ve típicamente en el contexto de cirrosis, el turbio si hay infección, el lechoso en el contexto de ascitis quilosa y el sanguinolento en el contexto de malignidad o una paracentesis traumática.

El aspecto serohemático/sanguinolento suele observarse en concentraciones de > 10 000 glóbulos rojos/ μ L. Por otro lado, el aspecto hemático se acompaña de recuentos de

decenas de miles de glóbulos rojos por microlitro. El diagnóstico diferencial en este contexto es de cirrosis, fuga de sangre de un colateral perforado (por la propia punción o por un traumatismo previo) o malignidad. Se ha visto que la ascitis es sanguinolenta en el 22 % de la ascitis relacionada con malignidad en general; pero según el mecanismo etiológico involucrado este porcentaje varía desde < 10% en carcinomatosis peritoneal aislada, 50% en carcinoma hepatocelular, y 66% en carcinomatosis peritoneal con metástasis hepáticas masivas (3,19,20).

Estudios de laboratorio: las pruebas que se solicitan con mayor frecuencia en la evaluación del líquido ascítico incluyen el recuento celular y diferencial, el gradiente de albúmina suero–ascitis (SAAG), concentraciones de proteínas, glucosa y lactato deshidrogenasa, y los cultivos.

Gradiente de albúmina de suero – ascitis: Este gradiente identifica con precisión a la hipertensión portal y posee mayor utilidad que el concepto de exudado / trasudado basado en proteínas (2). Se calcula restando el valor de la albúmina del líquido ascítico del valor de la albúmina sérica, ambas muestras deben obtenerse el mismo día. Si el gradiente es $\geq 1,1$ g/dL predice hipertensión portal con un 97 % de precisión; por otro lado, un gradiente $< 1,1$ g/dL indica que el paciente no tiene hipertensión portal (2) (Tabla 3).

Tabla 3: Clasificación de la ascitis según el gradiente de albúmina suero – ascitis

HTP (gradiente $\geq 1,1$ g/dL)	No HTP (gradiente $< 1,1$ g/dL)
Cirrosis	Carcinomatosis peritoneal
Hepatitis alcohólica	Tuberculosis peritoneal
Fallo cardiaco	Pancreatitis
Metástasis hepáticas masivas	Serositis
Síndrome Budd–Chiari	Síndrome nefrótico
Trombosis de la vena porta	
Fibrosis portal idiopática	

HTP; hipertensión portal.

Adaptado de Runyon A. Evaluation of adults with ascites. Uptodate 2020.

El gradiente se elevará por cualquier patología que conduzca a hipertensión portal, por lo tanto, no es específico de la cirrosis.

Recuento celular y diferencial: un recuento total de ≥ 500 leucocitos/ μL se aprecia en el 75 % de los pacientes con carcinomatosis peritoneal, en el 80 % de carcinomatosis peritoneal más metástasis hepáticas masivas, y en el 66 % de cirrosis más carcinoma hepatocelular (3). En ocasiones, la presencia de neutrófilos puede reflejar una respuesta a las células tumorales dañadas: alrededor del 8 % de los pacientes tienen un recuento de ≥ 250 neutrófilos/ μL ; es por eso que la carcinomatosis peritoneal puede simular peritonitis bacteriana espontánea (3). El predominio de los linfocitos nos da una pista de que el líquido no está infectado.

Citología: debe ser realizada en todos los líquidos ascíticos en los que se sospeche una ascitis relacionada con malignidad. Podrán observarse células malignas viables si son exfoliadas en el líquido ascítico (3), y esto ocurre en la carcinomatosis peritoneal, la cual representa los dos tercios de los pacientes con ascitis relacionada con malignidad. La mayoría de los pacientes restantes (metástasis hepáticas masivas, carcinoma hepatocelular, síndrome maligno de Budd-Chiari) casi siempre tienen citologías negativas (3). El carcinoma hepatocelular causa ascitis por aumento de la presión portal ocasionada por el reemplazo del parénquima hepático con masa tumoral asociado o no a trombosis de la vena porta (3), y metastatiza al peritoneo con poca frecuencia (21–24).

La sensibilidad de la citología para la detección de la ascitis relacionada con malignidad es del 58 al 75 % (25–27), y depende del número de muestras procesadas, del procesamiento de estas, la etiología de la ascitis y la experiencia del examinador. Habitualmente, la citología será positiva si el líquido se procesa de manera óptima y si se examinan suficientes muestras. Si se maneja adecuadamente, una muestra de 50 ml suele ser suficiente para hacer el diagnóstico. Cuando el procesamiento de la muestra se coordina con el laboratorio, el 83 % de las primeras muestras de pacientes con ascitis relacionada con malignidad son positivas o sospechosas de malignidad (3). Algunos laboratorios prefieren un espécimen llevado a mano, mientras que otros prefieren que la

muestra se fije en alcohol inmediatamente después de su obtención. El mesotelioma peritoneal, igual que el pleural, suele ser difícil de diagnosticar citológicamente (28,29).

Pruebas de imagen: La tomografía computarizada es la prueba de imagen más utilizada para el diagnóstico de la carcinomatosis peritoneal, la cual puede manifestarse como lesiones nodulares o placas, ascitis o la infiltración tumoral del mesenterio y/o del tejido graso. Estudios publicados indican una sensibilidad del 64% al 96% para el diagnóstico de carcinomatosis peritoneal, con una especificidad que va del 91% al 100% (30,31). La sensibilidad se ve afectada principalmente por el tamaño y el tipo de la lesión, la reconstrucción de las imágenes y la experiencia del radiólogo.

2.2 Derrame Pleural:

a) *Definición y etiología:* La pleura parietal recubre la pared torácica y la visceral recubre el pulmón, y entre ambos se encuentra el espacio pleural. En condiciones fisiológicas, este espacio está ocupado por una cantidad mínima de líquido (0,26 mL/kg) el cual contiene una concentración de proteínas < 50% que las del suero, y dentro de la celularidad predominan los macrófagos, mientras que las células mesoteliales se encuentran en una pequeña proporción (exfoliadas del revestimiento pleural y con mitosis ocasionales) (32). El líquido pleural es producido por filtración desde la circulación sistémica al espacio pleural a través de la pleura parietal y en condiciones normales aproximadamente el 80% se reabsorbe por los linfáticos de la pleura parietal. Los excesos moderados en la producción del líquido pleural se pueden compensar con un aumento en la absorción linfática a través de la pleura parietal, y sólo cuando se sobrepasa este aumento de la absorción el líquido se acumula para dar lugar al derrame pleural (32,33).

Los mecanismos por los que se origina el derrame pleural se muestran en la Tabla 4, y están relacionados con una mayor producción o una menor reabsorción del líquido, que a su vez se ven influidos por cambios en las presiones hidrostáticas capilares, coloidosmóticas intra o extravasculares y presiones negativas intratorácicas (33).

Tabla 4: Mecanismos de producción de derrame pleural

Aumento de presión hidrostática sistémica
Descenso de la presión oncótica en la microcirculación
Aumento de permeabilidad en la microcirculación pleural
Aumento de líquido intersticial pulmonar
Obstrucción del drenaje linfático
Paso de líquido desde otras cavidades: peritoneo, retroperitoneo, espacio cefalorraquídeo, catéteres
Disminución de la presión negativa en el espacio pleural
Rotura vascular torácica
Rotura del conducto torácico

Derrame pleural maligno:

Su mecanismo principal de producción es el aumento de la permeabilidad vascular, asociado a obstrucción del drenaje linfático a nivel pleural y/o mediastínico, y es responsable del 15 al 35% de todos los derrames pleurales, lo que lo convierte en una de las principales causas de exudado pleural (4). La mayoría de los derrames pleurales malignos son producidos por metástasis pleurales, principalmente desde tumores pulmonares (más de un tercio de los casos) y de mama. Dependiendo de la exposición al asbesto, el mesotelioma puede ser su tercera causa. La mediana de supervivencia al diagnóstico del derrame pleural maligno oscila entre 4 y 6 meses.

b) **Cuadro clínico:** El derrame puede pasar desapercibido y constituir un hallazgo en una radiografía de tórax realizada por otros motivos. Si el líquido pleural ocupa más de un tercio del hemitórax suele acompañarse de cierto grado de disnea, y suele acompañarse de dolor de tipo pleurítico. La disnea suele intensificarse cuando el paciente se acuesta en decúbito contralateral al derrame. En derrames de gran tamaño puede observarse un

discreto abombamiento y disminución de los movimientos respiratorios, matidez marcada en la percusión y disminución de las vibraciones vocales en la auscultación (32). El dolor intenso y continuo debe hacer sospechar de un mesotelioma, especialmente en sujetos con historia de exposición previa a asbesto.

c) Diagnóstico:

- *Toracocentesis*: En pacientes con derrame bilateral y en un contexto clínico que sugiere fuertemente un trasudado, no está indicada la realización de toracocentesis. En el resto de las situaciones se realizará una toracocentesis si la cuantía del líquido lo permite (4).

El análisis del líquido pleural mediante técnicas de laboratorio asociado al cuadro clínico permite diagnosticar la causa de un derrame, acotar el diagnóstico diferencial y organizar un plan terapéutico en la mayoría de los pacientes que se someten a una toracocentesis. En el líquido pleural obtenido debe analizarse el color, el aspecto y el olor (Tabla 5).

Tabla 5: Características organolépticas principales del derrame pleural.

Color	Diagnóstico sugerido	Aspecto	Diagnóstico sugerido
Amarillo pálido	Trasudado	Pus	Empiema
Sanguinolento	Malignidad	Viscoso	Mesotelioma
Marrón	Derrame sanguinolento antiguo	Turbio	Exudado inflamatorio
Blanquecino	Quilotórax	Restos celulares	Pleuritis reumatoide
Amarillo verdoso	Pleuritis reumatoide	Olor	Diagnóstico sugerido
Verde oscuro	Biliotórax	Pútrido	Empiema por anaerobios
		Amonio	Urinotórax

Adaptado de Heffner J. Diagnostic evaluation of a pleural effusion in adults: Initial testing. Uptodate, review 2020.

Existen una serie de patologías en las cuales la toracocentesis resulta especialmente útil como el derrame pleural maligno, empiema y el hemotórax, entre otras.

Caracterización: La diferenciación entre trasudados y exudados es el paso inicial en el diagnóstico etiológico del derrame pleural. Los primeros resultan de un desequilibrio entre las fuerzas hidrostáticas y oncóticas en la circulación pulmonar o sistémica, mientras que los segundos se producen por un aumento de la permeabilidad vascular.

– Trasudado: es el resultado de un aumento de la presión hidrostática capilar y/o una disminución de la presión oncótica plasmática por disminución de la concentración de proteínas. Este desequilibrio hace que habitualmente sean bilaterales. Las posibilidades

diagnósticas son limitadas, siendo las causas principales la insuficiencia cardiaca (80 %) y la cirrosis hepática (4). Una vez identificado habitualmente no son necesarios otros procedimientos diagnósticos adicionales (4). Con la administración de diuréticos y la posterior evacuación del derrame habitualmente se resuelve.

– Exudado: se origina principalmente por inflamación pleural y pulmonar, que aumenta la permeabilidad capilar y desencadena la entrada de líquido y proteínas al espacio pleural. También se produce cuando el drenaje linfático del espacio pleural falla, ocasionando una eliminación menor de líquido y proteínas. Se localizan más de un solo hemitórax. En contraste con el trasudado, el exudado presenta un desafío diagnóstico mayor, debido a que la afectación de cualquier órgano puede ocasionar un derrame pleural tipo exudado por mecanismos varios (Tabla 6). En el 80% es secundario a un cáncer, neumonía, tuberculosis o pleuro-pericarditis vírica (4).

Tabla 6: Causas de exudado pleural.

Infecciones	Enfermedades del tejido conectivo	Movimiento de líquido desde el abdomen al espacio pleural
Neumonía bacteriana. Pleuritis tuberculosa. Neumonía atípica. Abscesos ⁽¹⁾ . Parásitos. Enfermedad fúngica.	Pleuritis lúpica. Pleuritis por artritis reumatoide. EMTC. Churg-Strauss. Wegener.	Ascitis relacionada a malignidad. Pancreatitis. Pseudo-quiste pancreático. Síndrome de Meig. Abscesos ⁽¹⁾ .
	Endocrinas	
	Hipotiroidismo. SHO.	Descenso de la presión oncótica
Malignidad		Hepatopatía crónica. Síndrome nefrótico. Hipoalbuminemia de otras causas.
Carcinoma. Linfoma. Mesotelioma. Quilotórax.	Drenaje linfático alterado	
	Malignidad. Quilotórax ⁽³⁾ .	Miscelánea
Traumático / iatrogénico		Estenosis de la vena pulmonar. Endometriosis. Derrame para neoplásico. Ahogamiento. Quemaduras eléctricas. Hematopoyesis extramedular.
Desplazamiento del CVC. Drogas ⁽²⁾ . Hemotórax. Quilotórax. Perforación esofágica.	Otras patologías inflamatorias	
	Pancreatitis. Embolia pulmonar. Radioterapia. Sarcoidosis. SDRA.	

(1) Absesos: hígado, bazo, diafragma. (2) Drogas: nitrofurantoína, dasatinib, amiodarona, metotrexato, betabloqueantes, clozapina, fenitoína. (3) Quilotórax secundario a linfangioleiomiomatosis, linfangiectasia, síndrome de uñas amarillas.

CVC: catéter venoso central. **EMTC:** Enfermedad mixta del tejido conectivo. **SDRA:** síndrome de distrés respiratorio agudo. **SHO:** síndrome de hiperestimulación ovárica.

Adaptado de Heffner J. Management of malignant pleural effusions. Uptodate, 2020; y Villena Garrido V. Arch Bronconeumol. 2006.

– *Estudios de Laboratorio:*

Criterios de Light: es el método para diferenciar entre trasudado y exudado. Se basa en la medición de las proteínas y la LDH tanto en suero como en el líquido pleural. De acuerdo con los criterios tradicionales, si se cumple al menos uno de los tres el fluido se define como un exudado (34):

- Cociente de proteína pleural / proteína sérica mayor a 0,5; o
- Cociente de LDH pleural / LDH sérica mayor a 0,6; o
- LDH pleural superior a los dos tercios del límite superior de la LDH sérica.

Estos criterios demuestran una sensibilidad de 98 % y una especificidad de 80 % para los exudados (34); pero clasifican erróneamente como exudados al 30% de derrames cardíacos (35).

Recuento y fórmula leucocitaria: El recuento leucocitario no tiene valor diagnóstico, y puede superar los 10.000 leucocitos/ μ L en el derrame paraneumónico, pancreatitis y tromboembolismo pulmonar (33). En los derrames de corta evolución, suele predominar los polimorfonucleares, y en los de larga duración, los linfocitos. La eosinofilia (más de 10% de eosinófilos) es principalmente secundaria a la presencia de aire o sangre en el espacio pleural, y menos frecuentemente en la asbestosis, algunos fármacos, tromboembolismo pulmonar, infecciones por hongos, parásitos o el Churg-Strauss. Aunque escasos mililitros de sangre tiñen de rojo grandes cantidades de líquido, los derrames hemáticos suelen ser mayores de 100.000 hematíes/ μ L, y en el hemotórax el hematocrito del líquido pleural es superior al 50% del sanguíneo.

Entre los datos de laboratorio que deben hacer sospechar en un derrame pleural maligno destacan la presencia de exudado, el predominio linfocitario y el ADA < 35 U/L, los cuales en > 95%, > 80% y en 95% respectivamente, acompañan a este tipo de derrame. Mientras que el aspecto hemorrágico debería reforzar la sospecha de malignidad (4).

Citología: es una de las determinaciones que ofrece mayor rentabilidad para el diagnóstico de malignidad. La sensibilidad es alrededor del 60%, pero es más alto en neoplasias de mama y ovario respecto a linfomas, sarcomas y mesoteliomas (36) (Tabla

7), y cuando se remiten 60 mL o más de líquido pleural. Depende también del entrenamiento del citólogo, de la extensión pleural de la neoplasia y de la estirpe tumoral (mayor en adenocarcinoma). El rendimiento se puede mejorar si se centrifuga el líquido y se incluye el botón celular en bloque de parafina, para su posterior procesamiento como si se tratara de una biopsia (técnica de bloque celular) (32). El análisis de muestras citológicas secuenciales incrementa la rentabilidad (33); pero no se aconseja repetir la citología más de 2 veces (4). Si se sospecha linfoma es recomendable el estudio mediante citometría de flujo.

La inmunohistoquímica utiliza diversos anticuerpos para la diferenciación de las células epiteliales y mesoteliales. Dado que ninguno de ellos es totalmente específico, se ha recomendado la utilización de un panel con al menos cuatro de ellos. Las técnicas de bloque celular han mejorado los resultados de la citología.

Salvo instrucciones expresas, la muestra de líquido pleural para estudio citológico se puede incluir en tubos citratados para prevenir su coagulación, pero no en cualquier otro medio, por el riesgo de interferir con las técnicas de laboratorio (4).

Tabla 7: Sensibilidad de la citología en el derrame pleural.

Origen	Frecuencia	Sensibilidad de la Citología	Sensibilidad de la Biopsia
Ovario	4,8 %	83 %	100 %
Colon	3,2 %	62 %	92 %
Pulmón	24,3%	60 %	95 %
Mama	18,2 %	57 %	78 %
Riñón	4,3 %	54 %	100 %
Mesotelioma	14,6 %	41 %	94 %
Linfoma	9,2 %	18 %	86 %
Otros	10 %	67 %	100 %
Desconocido	11,3 %	71 %	95 %
Total	100 %	60 %	95 %

- *Pruebas de imagen:* En el derrame pleural maligno hay que tener en cuenta que:

- Se recomienda realizar la tomografía con contraste.
- Suele ocupar más de la mitad de un hemitórax.
- Si es bilateral (más habitual en metástasis de mama y ovario) el tamaño del corazón no está aumentado, al menos que coexista un derrame pericárdico.
- Si el derrame unilateral es masivo y el mediastino está centrado hay que sospechar en una obstrucción bronquial proximal, que el mediastino se haya fijado al tumor y/o adenopatías, una infiltración pleural extensa.
- Los signos que hacen pensar en derrame neoplásico son las nodulaciones pleurales, el engrosamiento difuso de la pleura parietal mayor de 1 cm, el engrosamiento circunferencial de toda la pleura y la presencia de metástasis

hepáticas (4). En más del 50% de los casos es posible observar un derrame pleural aislado.

- Si se realiza una ecografía torácica su especificidad puede superar el 95% si se observa engrosamiento marcado de pleura parietal o visceral, o se ven nódulos sobre la superficie del diafragma (37).

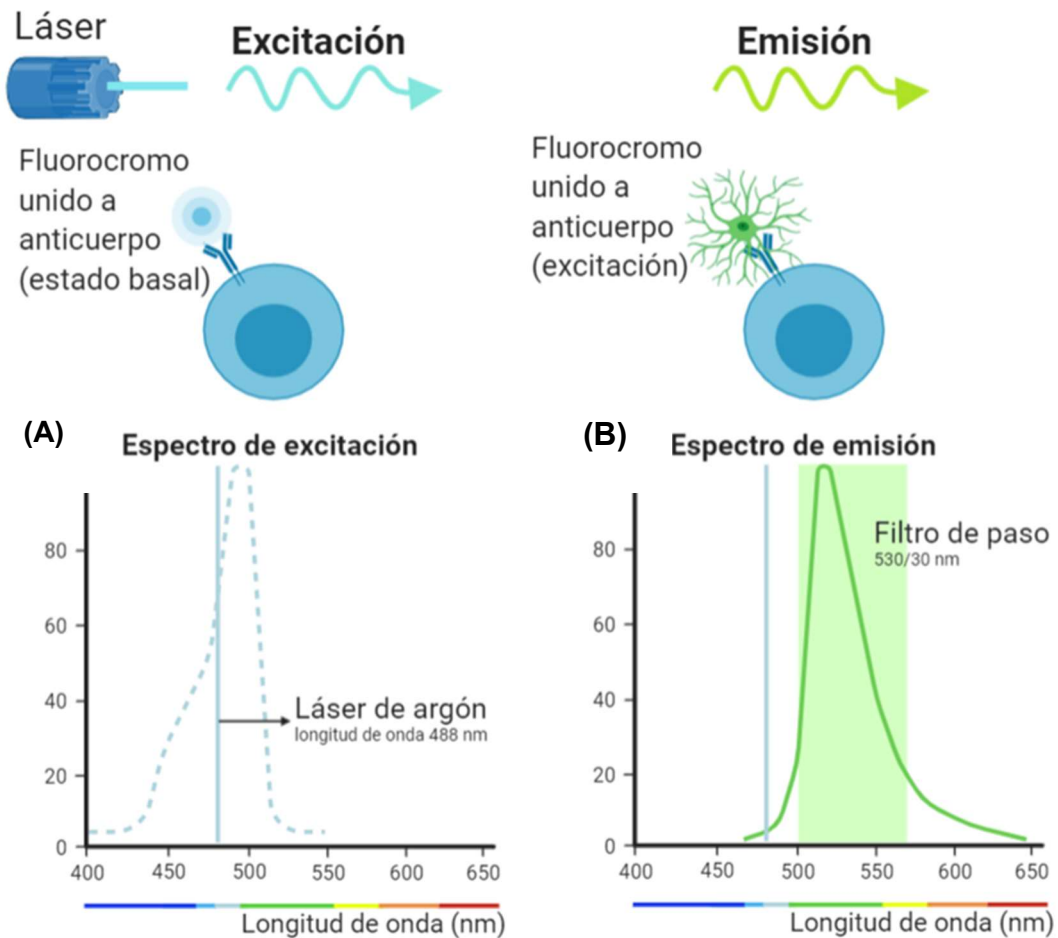
2.3 Citometría de flujo:

La citometría de flujo (FC) es una técnica muy útil en el estudio de poblaciones celulares, siendo capaz de identificar, cuantificar y caracterizar células (o partículas), mientras estas se encuentren suspendidas en un fluido y presenten un tamaño de 0,2 a 150 micrómetros. Los parámetros habitualmente estudiados son el tamaño, la granularidad, la viabilidad y la inmunofenotipificación celular.

Cualquier muestra biológica podría analizarse mediante FC; pero las más estudiadas son la sangre periférica, el líquido cefalorraquídeo y el lavado broncoalveolar, aunque la falta de valores normales publicados para estos dos últimos puede dificultar su interpretación.

a) **Inmunofenotipado:** Es la técnica utilizada para el estudio de las poblaciones celulares a través de la detección de las proteínas celulares expresadas. El inmunofenotipado utiliza anticuerpos específicos contra antígenos celulares de interés, que se conjugan con un compuesto fluorescente (fluorocromo). Estos fluorocromos absorben energía de la fuente láser, lo que hace que un electrón se excite elevando su energía y volviendo rápidamente a su estado basal, emitiendo el exceso de energía como un fotón de luz de una longitud de onda característica (38) (Figura 1). La longitud de onda de excitación y emisión son características de cada fluorocromo, por lo que es posible detectar simultáneamente varios antígenos, por ejemplo, los citómetros de flujo actuales pueden tener hasta cinco láseres de diferentes longitudes de onda, cada láser se puede combinar con tres o cuatro filtros, lo que permite un análisis de hasta 20 proteínas diferentes simultáneamente. En la práctica, la mayoría de los paneles de inmunofenotipado en uso clínico contienen 10 a 12 marcadores diferentes.

Figura 1: Excitación y emisión de un Fluorocromo.



El complejo anticuerpo–fluorocromo unido a la célula (estado basal) es estimulado por la luz del láser, ganando energía y perdiéndola rápidamente, emitiendo una nueva señal luminosa que será medida. El espectro de excitación del fluorocromo se muestra en (A) y el de emisión en (B).

b) Aspectos técnicos: Los componentes principales de un citómetro de flujo pueden agruparse en:

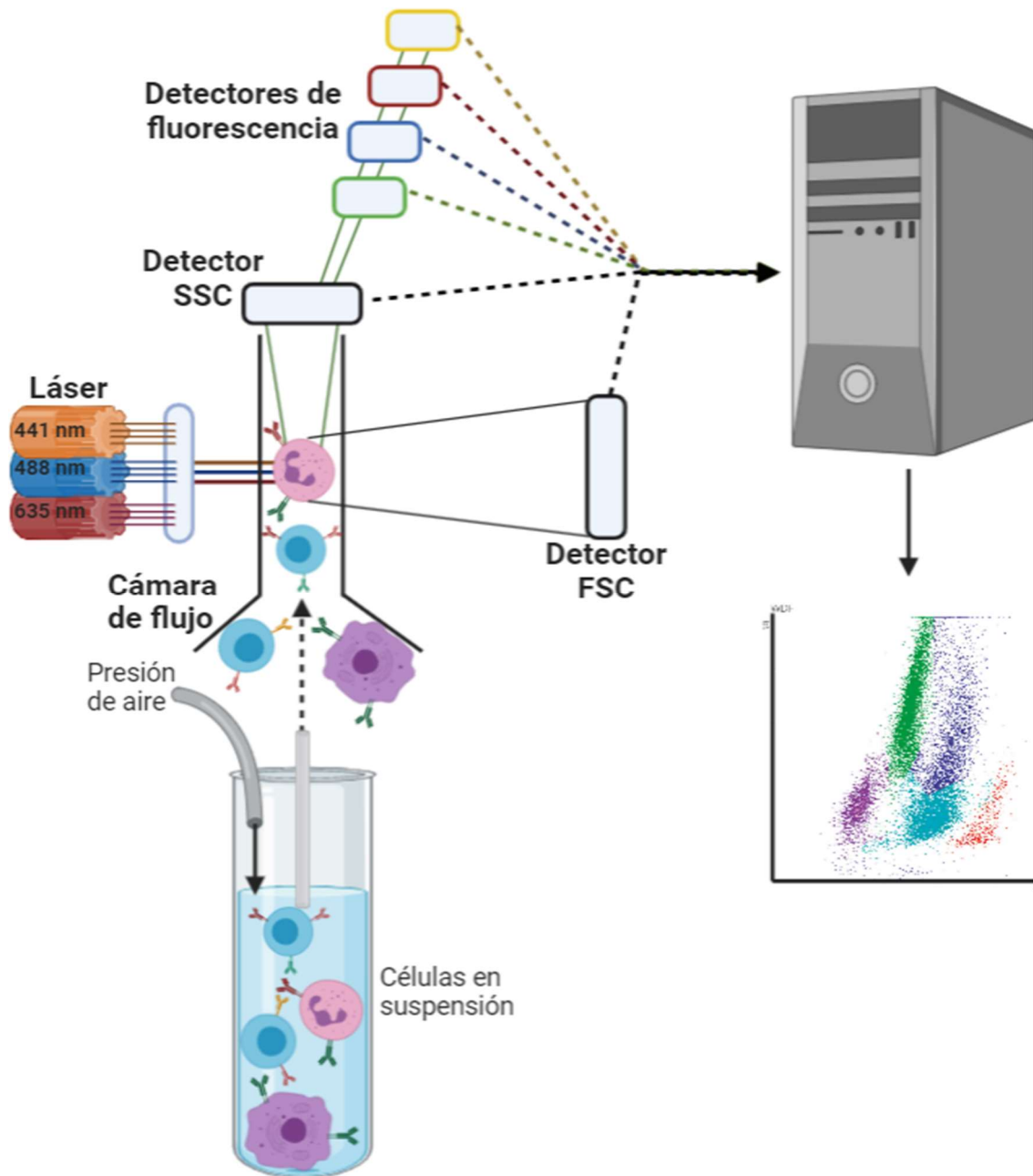
· *Sistema de fluidos*: Incluye aquellos componentes que permiten el transporte, enfoque y paso secuencial de las partículas en estudio. Para conseguirlo, la muestra ha de inyectarse dentro de otro fluido en movimiento (fluido envolvente), diferenciándose de este último por ir a una velocidad inferior. De esta forma, se origina un flujo laminar en el que ambos fluidos se mantienen separados (Figura 2).

· *Fuentes de luz:* Generalmente son láseres, que se emiten a longitudes de ondas concretas y específicas (Figura 2). Actualmente, los citómetros están dotados, como mínimo, de un láser azul que emite a 488 nm, y un láser rojo que emite por encima de 630 nm (39–41), y en caso de disponer de un tercer láser este suele emitir a longitudes correspondientes a luz violeta o ultravioleta (42). Dependiendo del citómetro, las distintas fuentes de luz pueden incidir sobre el mismo o distintos puntos del flujo.

· *Sistema óptico:* Está integrado por los lentes y prismas que enfocan el haz (o haces) de luz, la fibra óptica que conduce la luz al punto de intercepción con la muestra (punto de interrogación), los filtros que seleccionan la luz con diferente longitud de onda (color), y los espejos que las envían a los detectores (Figuras 2 y 3). En consecuencia, a cada detector le llega luz con una determinada longitud de onda (color) que se generó tras su intercepción con cada célula.

· *Sistema electrónico:* Incluye aquellos componentes que detectan y procesan la señal luminosa. La luz debe ser transformada en corriente eléctrica y luego digitalizada, para así poder ser medida y almacenada mediante un sistema informático (40). Los detectores son placas recubiertas de compuestos fotosensibles, así los que están incluidos en los citómetros son de tres tipos: a) tipo fotodiodo, para intensidades elevadas de luz por ej. la luz dispersada frontalmente (FSC o “forward scatter”), b) tipo tubos fotomultiplicadores (PMT o “photomultiplier tube”) para intensidades de luz bajas por ej. los detectores de luz dispersada lateralmente (SSC o “sideward scatter”) y de fluorescencia (citómetros convencionales), c) tipo espectrales, que miden simultáneamente la luz que procede de varios fluorocromos distintos con diferentes picos de emisión.

Figura 2: Componentes principales de un citómetro de flujo.



Las células en suspensión unidas a complejos anticuerpo–fluorocromo son empujadas por la presión de aire, pasando de forma ordenada a través de una cámara de flujo donde son alcanzadas por la luz de los rayos láser. Un detector de dispersión de luz delantera (FSC) recoge la luz emitida en ángulos bajos ($< 10^\circ$) y un detector de dispersión de luz lateral (SSC) recoge la luz dispersada y la fluorescencia emitida en un ángulo de 90° . La luz que llega a los diferentes detectores es procesada y convertida a señal digital por un ordenador (39).

· *Manejo de la información:* Con lo expuesto anteriormente, se puede deducir que se mide la intensidad de la luz dispersada tras la incidencia del láser sobre las células, y la luz emitida por los fluorocromos (naturales o artificiales).

La luz dispersada es medida en 2 puntos respecto a la fuente de la luz: FSC, en un ángulo cercano a 180°; SSC, en un ángulo cercano a 90° (Figura 2). Ambas (FSC y SSC) reflejan las características físicas de las células analizadas, así FSC aporta información del tamaño y SSC de la complejidad o granularidad interna.

Los fluorocromos al ser incididos por la luz del láser emiten una nueva luz, con una longitud de onda inferior, que se traduce en un color o fluorescencia diferente.

Las señales luminosas (fotones) son recogidas por los detectores, que las transforman en electrones, generando así corriente eléctrica, que finalmente será convertida en señal digital que puede visualizarse y almacenarse en un sistema informático.

c) Reactivos utilizados en el inmunofenotipado:

Como se mencionó anteriormente, para la caracterización celular por FC se hace uso de anticuerpos conjugados con fluorocromos.

Anticuerpos:

Pueden clasificarse como monoclonales o policlonales dependiendo del número de antígenos a los que puedan unirse. Los anticuerpos monoclonales son los más utilizados en la citometría clínica, se agrupan bajo la designación de “clústeres de diferenciación” (CD) y actualmente se dispone de 401 grupos de anticuerpos distintos clasificados en 371 clústeres diferentes que van de CD1 a CD371 (43).

Los anticuerpos monoclonales incluidos dentro de un mismo CD pueden unirse a epítomos diferentes del mismo antígeno, lo que condiciona que se pueda observar patrones de marcaje celular diferentes para distintos clones de un mismo CD (44).

Fluorocromos:

Son compuestos capaces de absorber luz a una determinada longitud de onda (espectro de excitación) y luego emitir una nueva luz con una longitud inferior y específica (espectro de emisión) (Figura 1). En este proceso se consume energía y se genera calor

(40,41). El uso de 2 o más fluorocromos simultáneamente en una misma muestra ha marcado el inicio de la citometría multicolor que conocemos actualmente; sin embargo puede generarse solapamiento en el espectro de emisión de fluorocromos capaces de ser excitados por una misma longitud de onda, lo que obliga a usar técnicas que eliminen esta interferencia, conocidas como “compensación de fluorescencias” (40). Por su origen pueden clasificarse en 4 familias (45,46): (a) moléculas orgánicas pequeñas, como el isotiocianato de fluoresceína (FITC), Alexa Flúor (AF) y las cianinas (Cy); (b) moléculas proteicas grandes, como la ficoeritrina (PE), la aloficocianina (APC), la proteína peridina-clorofila (PerCP) y la proteína de la familia de las cianinas derivadas del alga *Anemonia Majano* (AmCyan); (c) nanocristales inorgánicos fluorescentes, actualmente en desuso por problemas técnicos; (d) polímeros inorgánicos de la familia de la violeta brillante 421 (BV421), que son los más recientes y particularmente atractivos por su solubilidad, especificidad e intensidad elevadas.

Además, algunos fluorocromos son capaces de conjugarse generando parejas (tándems) por ejemplo PerCP–Cy5.5, APC–Cy7, PE–Cy7 (47). De esta forma, la luz del láser excita al primer fluorocromo (donante) que emite fluorescencia capaz de ser absorbida por el segundo fluorocromo (receptor), que finalmente emitirá luz en su longitud de onda habitual. Con esto se ha logrado ampliar las opciones de fluorocromos disponibles para cada láser, y conseguir espectros de emisión de luz antes no disponibles.

2.4 Citometría de flujo para el cribado de los derrames malignos:

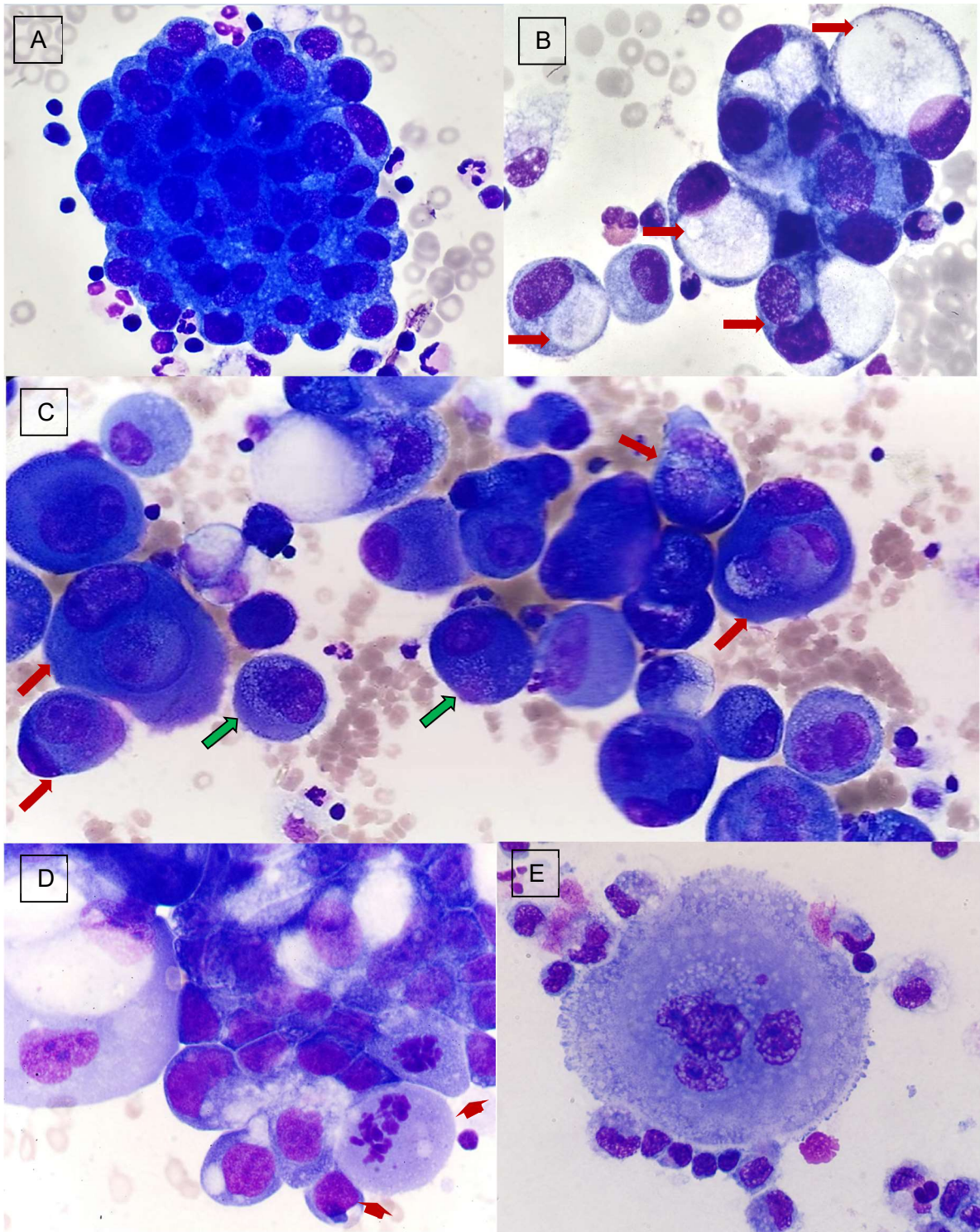
Actualmente, en la mayoría de los laboratorios clínicos, los recuentos de la celularidad contenida en los líquidos biológicos se realizan manualmente en muestras frescas mediante cámaras de Fuchs-Rosenthal o Neubauer (hemocitómetro) mediante la revisión al microscopio óptico, lo cual se considera el método gold standard. Posteriormente, a partir de los hallazgos microscópicos encontrados (densidad celular elevada, elementos atípicos) se puede realizar un frotis por citocentrifugación, sedimentación o filtración, y posterior tinción con May Grünwald-Giemsa o Wright para su revisión por microscopía óptica convencional, con la cual se conseguirá una diferenciación adecuada de las células encontradas (hematológicas: linfocitos, neutrófilos, eosinófilos; no hematológicas: macrófagos, mesoteliales) y confirmar o descartar los signos de atipia inicialmente vistos

en el estudio de la muestra en fresco. Estas técnicas son imprecisas y requieren mucho tiempo (48).

Esta citología convencional, realizada en el laboratorio de Bioquímica o Urgencias, aporta información importante cuando se encuentran signos de atipia celular, los cuales deberán ser confirmados en el laboratorio de Anatomía Patológica a través de nuevas tinciones (papanicolaou), técnicas de citobloque e inmunohistoquímica para finalmente llegar al diagnóstico de infiltración la muestra por células tumorales.

Dentro los signos principales de atipia celular que podemos encontrar en la citología convencional están: el monomorfismo celular, el aumento importante del tamaño celular, la basofilia citoplasmática intensa, una relación núcleo/citoplasma alta, la cromatina laxa, la presencia de nucléolos grandes/prominentes, un contorno nuclear irregular, la vacuolización polar del citoplasma, los anillos de sello, las mitosis anómalas, la formación de sincitio y nidos celulares, y por último la fagocitosis de una célula atípica por otra célula de similares características morfológicas, este fenómeno último se conoce comúnmente como canibalismo celular (Figura 4) (49).

Figura 4: Signos principales de atipia celular



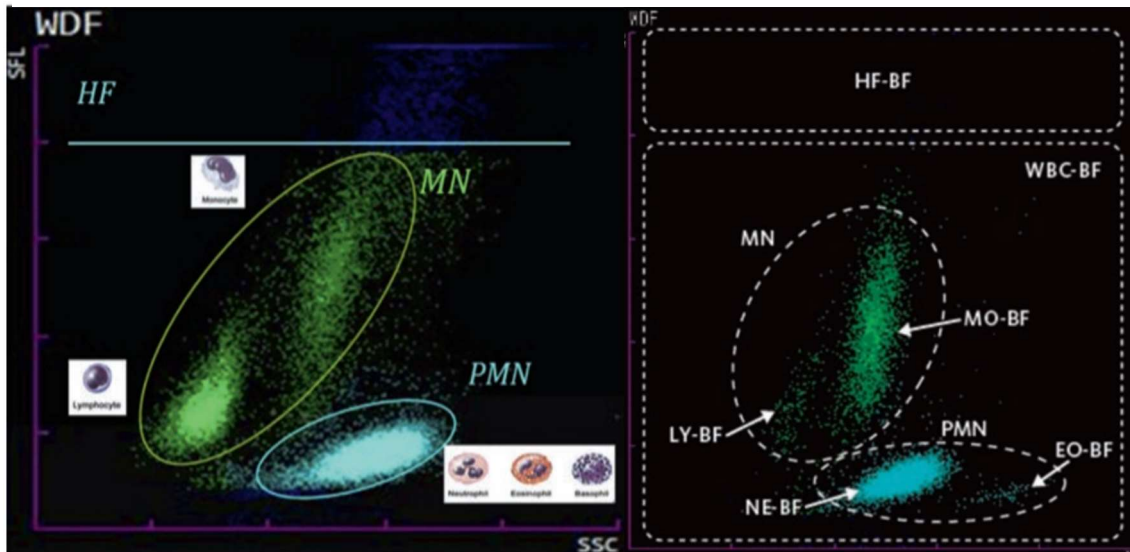
- (A) nido celular: no es posible ver la separación celular por la formación de sincitio.
(B) Flechas marrones: anillos de sello.
(C) Flechas marrones: canibalismo celular. Flechas verdes: vacuolización polar del citoplasma. De forma general se puede ver nucléolos prominentes y una relación núcleo citoplasma elevada.
(D) Flechas marrones: mitosis anómalas. E, gigantismo celular y contorno nuclear irregular.
En A y en C se puede apreciar la basofilia intensa.

En 1999 Sysmex lanzó su analizador hematológico totalmente automatizado, el XE-2100. Unos años más tarde, la FDA aprobó este analizador para el trabajo en la mayoría de los líquidos biológicos excepto el líquido cefalorraquídeo, debido a su imprecisión para recuentos celulares bajos. En 2007, se introdujo el XE-5000 que tenía un software único para el análisis de los líquidos biológicos llamado “body fluid mode”. Esta nueva serie pudo analizar todos los fluidos sin ningún tratamiento previo y contar tres veces más células, mejorando así la precisión de los recuentos celulares. El último analizador hematológico de Sysmex, la serie XN, contiene un body fluid mode mejorado realiza un recuento celular dos veces mayor que el XE-5000 (aumentando la precisión) y posee un límite de detección de 1 leucocito/ μL (50), por lo que está aprobado por la FDA para su uso en líquido cefalorraquídeo.

El Sysmex XN-350® es un analizador hematológico automatizado que permite el recuento de glóbulos blancos y su caracterización gracias a la combinación de citometría de flujo de fluorescencia y técnicas de impedancia (48).

Este tipo de citometría convencional usa tinciones fluorescentes que penetran en las células y marcan el contenido celular, que luego al exponerse a un rayo láser emite una determinada dispersión de luz. Utiliza diferentes parámetros como la dispersión frontal (FSC), que mide el tamaño y volumen celular; la dispersión lateral (SSC), que detecta la complejidad y/o granularidad intracelular; y la fluorescencia que es proporcional al contenido nucleico (9,10,48). Combinando estos parámetros a través del modo “body fluid mode” es posible informar el recuento total de células nucleadas (TC-BF#), el recuento de glóbulos rojos, el recuento de leucocitos mononucleares, leucocitos polimorfonucleares, y las células de alta fluorescencia (HF-BF) que incluyen a los macrófagos, las células mesoteliales y las células tumorales (11,48) (Figura 5). Las células HF-BF están ubicadas arriba del grupo de leucocitos mononucleares y no están incluidas en recuento diferencial de leucocitos; pero están incluidas en el TC-BF#. De esta forma, HF-BF agrupa células que, debido a su tamaño, complejidad y contenido nucleico, pueden ser diferenciadas de las células sanguíneas.

Figura 5: Escatergrama del canal WDF para líquidos biológicos.



MN (leucocitos mononucleares), el cluster superior corresponde a monocitos (MO-BF) y el inferior a linfocitos (LY-BF); PMN (leucocitos polimorfonucleares), el cluster izquierdo corresponde a neutrófilos (NE-BF) y el derecho a eosinófilos (EO-BF); HF-BF, células de alta fluorescencia.

2.5 Citometría de flujo en el diagnóstico de los derrames neoplásicos no hematológicos.

La FC es una herramienta ampliamente utilizada en el diagnóstico de neoplasias hematológicas; pero a pesar de que existen algunos estudios que muestran su utilidad potencial en el diagnóstico de los derrames neoplásicos no hematológicos (12–15,51,52), no se utiliza de forma rutinaria en la práctica diaria y la literatura publicada sobre este tema sigue siendo escasa. Algunas de las ventajas de FC son ser un método sensible, reproducible, rápido y rentable, cuyos resultados tienen una correlación adecuada con la citología. Además, en comparación con la citología, la FC permite el análisis simultáneo de la expresión de múltiples antígenos en la superficie de miles de células y proporciona información diagnóstica de otras poblaciones celulares no malignas que habitualmente se encuentran en la muestra, como leucocitos, macrófagos y células mesoteliales. Conociendo que las células epiteliales normalmente no están presentes en los líquidos

biológicos normales de las cavidades serosas (ascítico, pleural, cefalorraquídeo), su detección en un paciente con sospecha de carcinoma proporciona información extremadamente valiosa.

Se han probado varios anticuerpos a lo largo de los años; pero EpCAM (epithelial cell adhesion molecule) se ha convertido en el mejor marcador para detectar células epiteliales por FC (53). EpCAM, también conocido como Ber-EP4, CD326 o MOC31, es una glucoproteína transmembrana de la superficie celular, con un peso de 40 kDa, que durante el desarrollo de una neoplasia, modula negativamente la adhesión celular mediada por cadherina, lo que resulta en un efecto antiadhesivo (54), y por lo tanto, permitiría la migración celular que se requiere para la metástasis (55). EpCAM se expresa en células epiteliales normales, con la excepción de los queratinocitos epidérmicos, las células parietales gástricas, las células mioepiteliales, el epitelio cortical tímico y los hepatocitos (56), se sobreexpresa en la mayoría de las neoplasias epiteliales; y no se expresa en mesotelio normal o neoplásico ni células hematopoyéticas (57,58) (Tabla 8).

Tabla 8: Expresión de EpCAM en diferentes grupos celulares.

No expresión	Expresión normal	Expresión fuerte
- Tejido de origen mesenquimal: hematopoyético, óseo, mesotelio, muscular, adiposo. - Tejido neuroendocrino. - Otros: hepatocitos, células parietales gástricas, mioepiteliales, epitelio cortical del timo, queratinocitos epidérmicos.	Mayoría de epitelios	Mayoría de carcinomas

Además de la expresión de EpCAM, se han estudiado otros anticuerpos que pueden ser útiles en el estudio de los derrames neoplásicos no hematológicos. Entre estos, CD45 destaca por la amplia experiencia que se tiene por uso en la patología hematológica. CD45 es un receptor de proteína tirosina fosfatasa, que se expresa en la superficie de todas las células hematopoyéticas nucleadas y sus precursores, excepto los eritrocitos y las plaquetas maduras (59), por lo tanto, su principal utilidad estará en confirmar o descartar

el origen hematológico de las células encontradas en la muestra. CD14, una glucoproteína de 53-55 kDa enlazada a GPI (glicosilfosfatidilinositol), se expresa en los monocitos, los macrófagos interfoliculares y algunas células dendríticas. CD56, expresado por una variedad de células normales, incluyendo origen neuroectodérmico y natural killers, demostró ser útil para la identificación de tumores de células pequeñas redondas y azules no hematopoyéticas, de esta forma, una expresión fuerte de CD56 predijo un carcinoma neuroendocrino, mientras que la negatividad de este antígeno sugirió el diagnóstico de carcinoma de células no pequeñas (60). NG2 (neuron glia antigen-2), se ha asociado con tumores de células germinales (61). CD99 se expresa en muchas neoplasias: sarcoma de Ewing/tumor neuroectodérmico primitivo, leucemias/linfomas linfoblásticas T y B, tumor desmoplásico de células pequeñas y redondas, condrosarcoma mesenquimatoso y rhabdomiosarcoma, entre otros. La fuerte expresión de CD99 en una población de células CD45 es anormal y sugiere una neoplasia no hematopoyética (62). CD71 no es un marcador tumoral común; pero está sobreexpresado en las células en proliferación (como las células tumorales), y también se expresa en el mesotelio normal (63). CD10, su expresión se ha documentado en el carcinoma de células renales de células claras, carcinoma hepatocelular, algunos tumores ginecológicos y tumores de células germinales (61,64). Miogenina, una proteína expresada en la diferenciación precoz del músculo esquelético fetal, es un marcador altamente sensible y específico para el diagnóstico de rhabdomiosarcomas (65). EMA (Antígeno de membrana epitelial, MUC1) se ha visto expresado en diferentes carcinomas, mesotelioma y células mesoteliales (66).

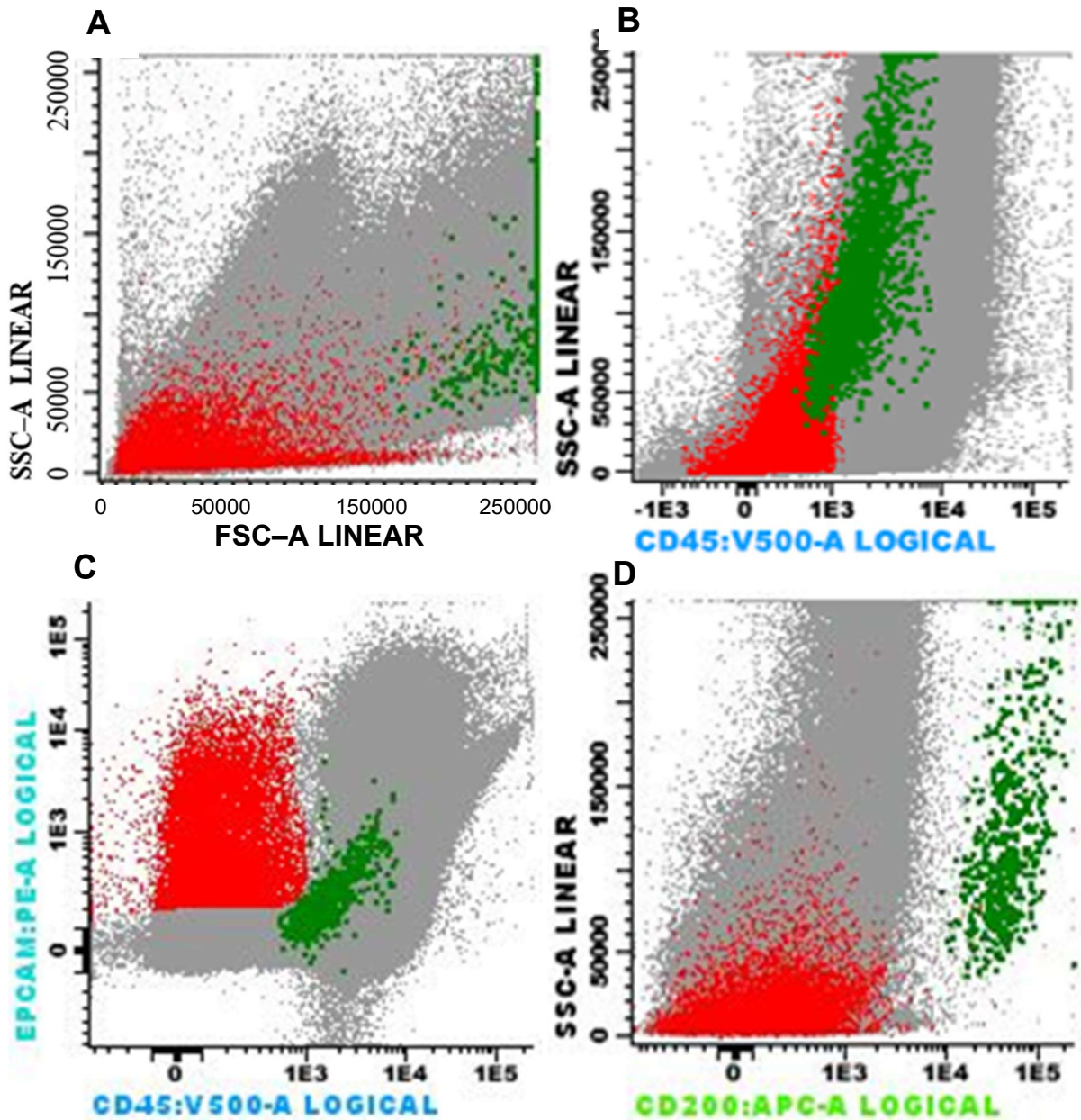
Un trabajo reciente informó que las neoplasias no hematológicas, además de no expresar CD45, expresan frecuentemente CD56, CD117 o CD138 (67). En este contexto, publicaciones anteriores mencionan a CD138 como un marcador robusto de diferenciación epitelial, y se ha informado de la expresión de este antígeno en varios tumores no hematológicos no epiteliales como melanoma, leiomioma, sarcoma sinovial, sarcomas epitelioides, tumores del estroma gastrointestinal y schwannomas epitelioides malignos (68), además de su utilidad para distinguir entre carcinoma y mesotelioma (69). Con respecto a CD117, puede expresarse junto con CD56, CD99 y CD90 en el sarcoma de Ewing/tumor neuroectodérmico primitivo (60). La expresión de CD117 se correlaciona fuertemente con carcinoma neuroendocrino de células pequeñas o grandes de alto grado, y no se expresa en los tumores carcinoides, es así que utilizaron a CD117 como un complemento de CD56, cuya coexpresión en el contexto de neoplasias

no hematológicas es una característica definitoria de la diferenciación neuroendocrina (67).

Previamente, algunos grupos han propuesto diferentes paneles para identificar neoplasias no hematopoyéticas por FC. Pillai y colaboradores propusieron un panel simplificado que incluía CD45, CD14 y EpCAM, con una sensibilidad y especificidad comparable a la citología (52). Chang y colaboradores, sugieren la inclusión de citoqueratina, CD56, EpCAM, miogenina y CD99 en el panel (60). Kentrou y colaboradores propusieron un panel que incluía EpCAM, CD56, CD71 y EMA. Según Dong y colaboradores, la inclusión de EpCAM, EMA, CD14 y CD45 en el panel sería suficiente para fines de diagnóstico (70). Además, Davidson y colaboradores proponen un panel más amplio que incluye EpCAM, N-cadherina, CD45 y CD14 para abordar la caracterización de derrames no hematológicos malignos, junto con anticuerpos para EMA, B72.3 (TAG-72), AH6 (antígeno de Lewisy) y HB-Tn (antígeno de carbohidrato Tn) (12). Según este último autor, las células carcinomatosas expresaron 3 de los 4 marcadores epiteliales (EpCAM, B72.3, AH6 y HB-Tn) en el 77% de los casos estudiados.

Mientras que las células de origen hematopoyético ocupan regiones bien establecidas en el diagrama de dispersión frontal versus lateral (FSC vs. SSC), los elementos epiteliales son de tamaño y complejidad citoplasmática variables, lo que determina su presencia en cualquier región del diagrama de dispersión, aunque curiosamente la mayoría de los eventos EpCAM positivos se encuentran en la región del debris (restos celulares) (Figura 6). Se supone que estos eventos EpCAM representan células tumorales fragmentadas (13) o vesículas extracelulares que contienen antígeno de la célula madre (71). Respecto a esto, se ha sugerido que preparar las células para FC en hielo con una manipulación suave podría mantener intactas las células malignas (52).

Figura 6: Distribución de los eventos CD45-/EpCAM+



En **rojo**: células epiteliales/carcinomasas. En **verde**: células mesoteliales.

A, muestra cómo la mayor proporción de las células carcinomasas se distribuyen en la zona de restos celulares (debris).

B y C, muestra la identificación de las células carcinomasas por su patrón CD45-/EpCAM+.

D, muestra la identificación de las células mesoteliales por la intensidad con que expresan CD200.

3. HIPÓTESIS

Hipótesis:

La citometría de flujo convencional, realizada en analizadores hematológicos Sysmex® de la serie XN a través del recuento de células de alta fluorescencia en líquidos ascíticos y pleurales, puede ser la base de algoritmos automatizados para la detección de derrames neoplásicos. Aunque según los estudios revisados en la literatura, la incidencia de etiología neoplásica en ambos derrames es bastante diferente, por lo que parece ser necesario realizar dos estudios independientes.

La citometría de flujo avanzada, realizada en citómetros como el BD FACSCanto II™ a través de la detección de células epiteliales mediante el anticuerpo EpCAM, puede completar dicho algoritmo automatizado haciendo finalmente el diagnóstico del derrame neoplásico, mejorando así la sensibilidad y el tiempo de respuesta de las técnicas actuales.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general 1: Realizar un algoritmo de cribado para la detección de los derrames neoplásicos, que tendrá como base el recuento de las células de alta fluorescencia mediante citometría de flujo convencional (citometría de fluorescencia – Sysmex-XN350).

* Publicación 1: Wong-Arteta J y cols. High fluorescence cell count in ascitic body fluids for carcinomatosis screening. Clin Chem Lab Med. 2018.

* Publicación 2: Wong-Arteta J y cols. High fluorescence cell count in pleural fluids for malignant effusion screening. Clin Chim Acta. 2019.

4.1.1 Objetivo específico 1: En el cribado de la carcinomatosis peritoneal a través del estudio de los líquidos ascíticos mediante citometría de flujo convencional, se buscará establecer los puntos corte óptimos para el recuento de células de alta fluorescencia totales (HF–BF#) y su porcentaje (HF–BF%), eligiendo entre ambas variables la que ofrezca la sensibilidad y área bajo la curva mayores. Dichos puntos de corte se obtendrán a través de la comparación con la citología/inmunohistoquímica realizada en el laboratorio de Anatomía Patológica.

* Publicación 1: Wong-Arteta J y cols. High fluorescence cell count in ascitic body fluids for carcinomatosis screening. Clin Chem Lab Med. 2018.

4.1.2 Objetivo específico 2: En el cribado de la carcinomatosis peritoneal a través del estudio de los líquidos ascíticos mediante citometría de flujo convencional, conocer si la asociación de otras variables como el recuento total de células nucleadas, el diagnóstico del paciente en el momento de la paracentesis, y la citología convencional; pueden mejorar el área bajo la curva y la sensibilidad de los puntos de corte de HF–BF# y HF–BF% elegidos.

* Publicación 1: Wong-Arteta J y cols. High fluorescence cell count in ascitic body fluids for carcinomatosis screening. Clin Chem Lab Med. 2018.

4.1.3 Objetivo específico 3: En el cribado del derrame pleural maligno a través del estudio de los líquidos pleurales mediante citometría de flujo convencional, establecer los puntos

corte óptimos para HF–BF# y HF–BF% eligiendo entre ambas variables la que ofrezca la sensibilidad y área bajo la curva mayores. Dichos puntos de corte se obtendrán a través de la comparación con la citología/inmunohistoquímica realizada en el laboratorio de Anatomía Patológica.

* Publicación 2: Wong-Arteta J y cols. High fluorescence cell count in pleural fluids for malignant effusion screening. Clin Chim Acta. 2019.

4.1.4 **Objetivo específico 4:** En el cribado del derrame pleural maligno a través del estudio de los líquidos pleurales mediante citometría de flujo convencional, conocer si la asociación de otras variables como el recuento total de células nucleadas, el recuento total y el porcentaje de neutrófilos, el recuento total de glóbulos rojos, el diagnóstico del paciente en el momento de la paracentesis, y la citología convencional; pueden mejorar el área bajo la curva y la sensibilidad de los puntos de corte de HF–BF# y HF–BF% elegidos.

* Publicación 2: Wong-Arteta J y cols. High fluorescence cell count in pleural fluids for malignant effusion screening. Clin Chim Acta. 2019.

4.1.5 **Objetivo específico 5:** Conocer en qué medida la aplicación de los algoritmos de cribado diseñados para la detección de células neoplásicas disminuiría el número de frotis a realizar en la rutina de trabajo del laboratorio.

* Publicación 1: Wong-Arteta J y cols. High fluorescence cell count in ascitic body fluids for carcinomatosis screening. Clin Chem Lab Med. 2018.

* Publicación 2: Wong-Arteta J y cols. High fluorescence cell count in pleural fluids for malignant effusion screening. Wong-Arteta J y cols. Clin Chim Acta. 2019.

4.2 Objetivo general 2: Conocer el rendimiento de la citometría de flujo avanzada (BD FACSCanto II) mediante el uso del anticuerpo EpCAM en el diagnóstico de los derrames neoplásicos, usando muestras de líquidos ascíticos y pleurales seleccionados por un algoritmo de cribado que incluiría el recuento de células de alta fluorescencia por citometría de convencional (Sysmex®, serie XN) y citología convencional (tinción May Grünwald-Giemsa). Dicho rendimiento será medido a través de la comparación de su sensibilidad, especificidad y área bajo la curva con la citología/inmunohistoquímica realizada en el laboratorio de Anatomía Patológica.

* Publicación 3: Wong–Arteta J y cols. The utility of flow cytometry in the diagnostic work up of malignant effusions due to nonhematopoietic neoplasms. *Cytometry B Clin Cytom.* 2020.

4.2.1 Objetivo específico 6: Comparar el tiempo de respuesta de la citometría de flujo avanzada con la citología/inmunohistoquímica. Dicho tiempo corresponderá a los días que transcurren desde la entrega de la muestra en el laboratorio hasta la emisión de un informe final.

* Publicación 3: Wong–Arteta J y cols. The utility of flow cytometry in the diagnostic work up of malignant effusions due to nonhematopoietic neoplasms. *Cytometry B Clin Cytom.* 2020.

4.2.2 Objetivo específico 7: Conocer la sensibilidad, especificidad y área bajo la curva de los paneles diseñados, a través de su comparación con el diagnóstico final, en el cual se tendrá en cuenta el informe de la tomografía computarizada, inmunohistoquímica, biopsia (si la hubiera) y curso clínico. Valorar si existen diferencias en la sensibilidad, la especificidad y el área bajo la curva de la citometría de flujo avanzada y la citología/inmunohistoquímica en combinación (ambas técnicas en paralelo) frente a dichas técnicas por separado.

* Publicación 3: Wong–Arteta J y cols. The utility of flow cytometry in the diagnostic work up of malignant effusions due to nonhematopoietic neoplasms. *Cytometry B Clin Cytom.* 2020.

4.2.3 Objetivo específico 8: Conocer si existe relación entre el porcentaje de células atípicas informadas mediante citología convencional (tinción May Grünwald-Giemsa) y el porcentaje de eventos CD45-/EPCAM+ vistos por citometría avanzada.

* Publicación 3: Wong–Arteta J y cols. The utility of flow cytometry in the diagnostic work up of malignant effusions due to nonhematopoietic neoplasms. *Cytometry B Clin Cytom.* 2020.

5. RESUMEN Y DISCUSIÓN

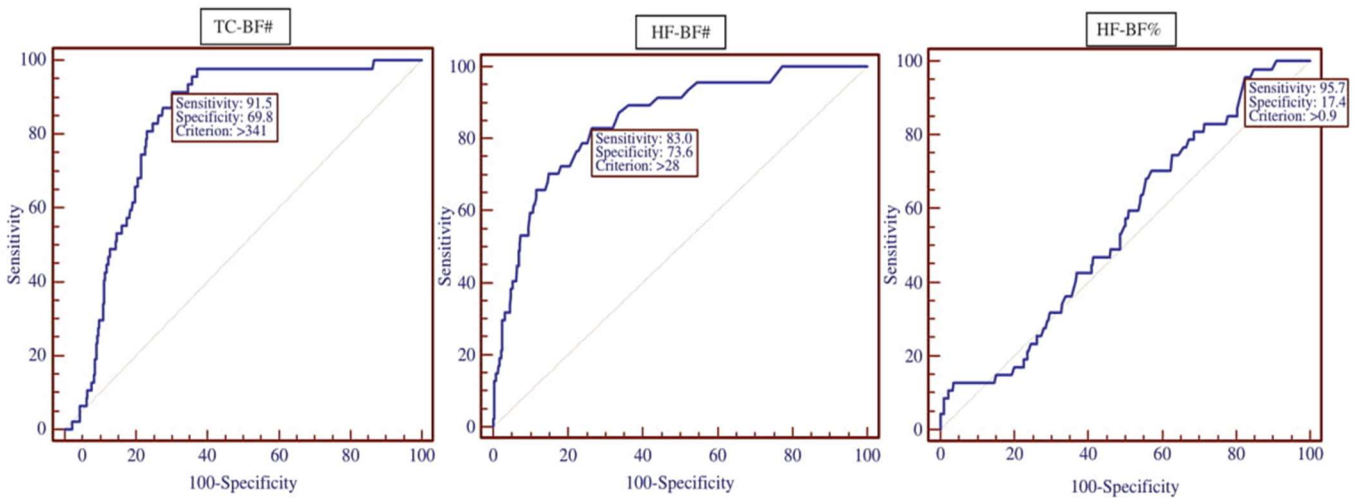
Publicación 1: High fluorescence cell count in ascitic body fluids for carcinomatosis screening.

Resumen 1:

La ascitis maligna es una entidad grave, con una supervivencia global de 1 a 4 meses entre los pacientes que la padecen, y representa entre 7 y 10% de todos los casos de ascitis (1,2,17). La etiología es diversa, pero aproximadamente dos tercios de los casos son secundarios a carcinomatosis, por lo que es importante reconocer la presencia de células malignas a través de la citología; pero actualmente esto sigue siendo un desafío, dada la complejidad morfológica de las células malignas y lo difícil que es, en muchas ocasiones, diferenciarlas de las células mesoteliales reactivas y los macrófagos. El objetivo principal de este estudio fue evaluar la utilidad del recuento de las células de alta fluorescencia en el líquido ascítico para el cribado de la carcinomatosis peritoneal.

Se estudiaron 1085 muestras de líquido ascítico obtenidas de forma consecutiva, que fueron analizadas en un Sysmex XN-350® en modo “body fluid mode”. Se consideró que los pacientes tenían ascitis carcinomatosa si se encontraba al menos uno de los siguientes criterios: (a) informe tomográfico de carcinomatosis peritoneal y curso clínico compatible, y / o (b) citología o biopsia positivas para células malignas realizadas en Anatomía Patológica. Según estos criterios, el 4,3% (47/1085) de los líquidos fueron considerados carcinomatosos. Se calcularon las áreas bajo la curva para las células nucleadas totales (TC-BF#), células de alta fluorescencia totales (HF-BF#) y en porcentaje (HF-BF%).

Figura 7: Áreas bajo la curva de las variables estudiadas en el líquido ascítico.



TC-BF#: células nucleadas totales. HF-BF#: células de alta fluorescencia totales. HF-BF%: células de alta fluorescencia en porcentaje.

Adaptado de Wong-Arteta J. High fluorescence cell count in ascitic body fluids for carcinomatosis screening. Clin Chem Lab Med. 2018

Los mejores puntos de corte de las 3 variables fueron asociados con la citología convencional y el diagnóstico en el momento de la paracentesis.

La combinación de $TC-BF\# \geq 250 / \mu L$ y $HF-BF\# \geq 17 / \mu L$ tuvo una sensibilidad, especificidad, valor predictivo negativo y positive likelihood ratio de 91%, 77%, 99,5% y 4, respectivamente. Estos resultados mejoraron cuando los líquidos ascíticos asociados a cirrosis hepática y diálisis peritoneal ambulatoria fueron excluidos; y cuando la citología convencional fue asociada (Tabla 9). Por otro lado, la aplicación de este algoritmo, en cualquier combinación de las variables mencionadas anteriormente, reduciría el número de frotis que se realizarían para ser revisados al microscopio.

Tabla 9: Rendimiento de las variables estudiadas en el líquido ascítico.

	S	E	PPV	NPV	LR +	Smears that should be performed
HF-BF# $\geq 17/\mu\text{L}$	91% (80-98%)	57% (53-60%)	8.7% (6-12)	99% (98-100%)	2.1 (1.9-2.4)	46% (494/1085)
TC-BF# $\geq 250/\mu\text{L}$ and HF-BF# $\geq 17/\mu\text{L}$	91% (80-98%)	77% (74-80%)	15% (11-20%)	99.5% (99-100%)	4 (3-4.6)	26% (282/1085)
TC-BF# $\geq 250/\mu\text{L}$ and HF-BF# $\geq 17/\mu\text{L}$ no cirrhosis or APD ^a	91% (80-98%)	90% (88-92%)	29% (22-38%)	99.6% (99-100%)	9.2 (8-11)	13% (146/1085)
TC-BF# $\geq 250/\mu\text{L}$ and HF-BF# $\geq 17/\mu\text{L}$ positive OM ^b	90.3% (74-98%)	99.6% (98-99.9%)	93.3% (78-99%)	99.3% (98-99.8%)	205 (51-819)	

HF-BF# $\geq 17/\mu\text{L}$: células de alta fluorescencia totales mayores o iguales a 17 por microlitro. **TC-BF# $\geq 250/\mu\text{L}$:** células nucleadas totales mayores o iguales a 250 por microlitro. **No cirrhosis or APD:** se han excluido a los líquidos procedentes de pacientes con cirrosis hepática o diálisis peritoneal ambulatoria. **Positive OM:** citología convencional positiva para atipia celular. **S:** sensibilidad. **E:** especificidad. **PPV:** valor predictivo positivo. **NPV:** valor predictivo negativo. **LR +: likelihood ratio** positiva. **Smears that should be performed:** frotis que se realizarían si se aplicara cada algoritmo.

Discusión 1:

Nuestros resultados validan los hallazgos encontrados por Labaere y cols. (11), en la cual se describe que $\text{HF-BF\#} \geq 17/\mu\text{L}$ puede desempeñar un papel importante en el cribado de la carcinomatosis; pero nuestro estudio proporciona además el diseño de un algoritmo para la automatización del trabajo en el laboratorio clínico y añade parámetros clínico–radiológicos que refuerzan esta hipótesis. Los puntos fuertes de este estudio incluyen la gran cantidad de muestras analizadas y su realización dentro de la práctica clínica habitual, mientras que su punto débil principal ha sido no contar con estudio tomográfico e inmunohistoquímico en todos los pacientes.

Publicación 2: High fluorescence cell count in pleural fluids for malignant effusion screening

Resumen 2:

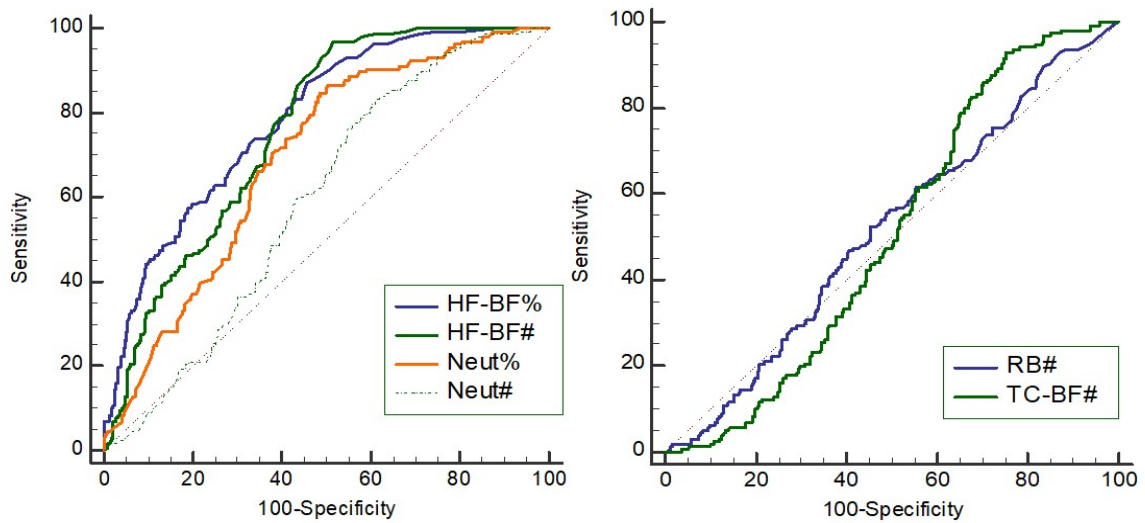
El derrame pleural maligno es principalmente secundario a metástasis pleural. Su prevalencia es del 15 al 35% de todos los derrames pleurales, y la mediana de supervivencia global oscila entre 4 y 6 meses, por lo que es muy importante saber cómo diagnosticarlo (4). La citología convencional incluye la determinación del número de células y su diferenciación, pero esta técnica tiene sus limitaciones, como el consumo de tiempo, lo cual es especialmente importante en laboratorio de Urgencias.

Previamente hemos publicado un estudio para el cribado de la carcinomatosis peritoneal a través del uso de células de alta fluorescencia (72), pero como estos derrames presentan diferentes incidencias de infiltración neoplásica (derrame pleural del 15 al 35%, ascitis del 7 al 10%) (1,4) hemos preferido desarrollar dos estudios independientes.

Nuestro objetivo principal fue evaluar la utilidad del recuento de células de alta fluorescencia en líquidos pleurales para el cribado del derrame pleural maligno.

Se estudiaron 505 muestras de líquido pleural obtenidas de forma consecutiva, que fueron analizadas en un Sysmex XN-350® en modo “body fluid mode”. Se consideró que los pacientes tenían derrame pleural maligno si cumplían al menos uno de los siguientes criterios: (a) infiltración neoplásica asociada a derrame pleural diagnosticadas por tomografía y / o (b) citología positiva para células malignas realizada en Anatomía Patología; en ambos casos fue esencial la presencia de derrame pleural radiológico y curso clínico compatible con enfermedad neoplásica. Según estos criterios, el 31% (156/505) de los derrames fueron considerados malignos. Se calcularon las áreas bajo la curva para las células nucleadas totales (TC-BF#), células de alta fluorescencia totales (HF-BF#), células de alta fluorescencia por 100 leucocitos (HF-BF%), neutrófilos totales (Neut#), neutrófilos por 100 leucocitos (Neut%) y glóbulos rojos totales (RB#) (Figura 8).

Figura 8: Áreas bajo la curva de las variables estudiadas en el líquido pleural.



HF-BF%: células de alta fluorescencia por 100 leucocitos; **HF-BF#:** células de alta fluorescencia totales; **Neut%:** neutrófilos por 100 leucocitos; **Neut#:** neutrófilos totales; **RB#:** glóbulos rojos totales; **TC-BF#:** células nucleadas totales.

Adaptado de Wong–Arteta J. High fluorescence cell count in pleural fluids for malignant effusion screening. Clin Chim Acta 2019.

TC-BF# y RB# fueron descartadas por sus áreas bajo la curva pobres, y se calcularon los mejores puntos de corte del resto de variables, realizándose asociaciones entre ellas y con la citología convencional, y con el diagnóstico en el momento de la toracocentesis.

Las mejores combinaciones obtenidas para el cribado del derrame pleural maligno fueron $HF-BF\# \geq 17 / \mu L$ y $HF-BF\% > 10 / \mu L$, ambas en ausencia de insuficiencia cardíaca y / o infección respiratoria baja, y asociadas a microscopía convencional realizada en el laboratorio de Bioquímica, obteniéndose una sensibilidad, especificidad, valor predictivo negativo y positive likelihood ratio de 87%, 97%, 92%, 25; y 88%, 96%, 94%, 26; respectivamente (Tabla 10). Por otro lado, la aplicación de este algoritmo, combinando de diferentes formas las variables mencionadas anteriormente, reduciría el número de frotis que se realizarían para ser revisados al microscopio.

Tabla 10: Rendimiento de las variables estudiadas en el líquido pleural.

	AUC	S	E	PPV	NPV	LR +	Smears that should be performed
HF-BF# $\geq 17/\mu\text{L}$	0.718	94 (89–97%)	50 (44–55%)	46 (43–48%)	95 (91–97%)	1.9 (1.7–2.1)	64% (324/505)
HF-BF# $> 10/\mu\text{L}$	0.70	98 (94–100%)	42 (37–47%)	43 (41–45%)	98 (94–99%)	1.7 (1.5–1.8)	70% (356/505)
HF-BF# $\geq 17/\mu\text{L}$	0.849	91 (85–95%)	79 (74–83%)	66 (61–71%)	95 (92–97%)	4.3 (3.5–5)	43% (216/505)
No ICC, no infection							
HF-BF# $> 10/\mu\text{L}$	0.842	94 (89–97%)	74 (69–79%)	62 (58–66%)	97 (94–98%)	3.7 (3–4.4)	47% (237/505)
No ICC, no infection							
HF-BF# $\geq 17/\mu\text{L}$	0.918	87 (81–92%)	97 (94–98%)	92 (91–98%)	92 (87–95%)	25 (14–44)	
No ICC, no infection							
Positive OM							
HF-BF# $> 10/\mu\text{L}$	0.925	88 (82–93%)	96 (94–98%)	92 (87–95%)	94 (92–97%)	26 (15–45)	
No ICC, no infection							
Positive OM							

HF-BF# $\geq 17/\mu\text{L}$: células de alta fluorescencia totales mayores o iguales a 17 por microlitro.

HF-BF# $> 10/\mu\text{L}$: células de alta fluorescencia totales mayores a 10 por microlitro.

No ICC, no infection: Se han excluido los líquidos procedentes de pacientes con fallo cardiaco o infección respiratoria baja.

Positive OM: citología convencional positiva para atipia celular.

AUC: área bajo la curva. **S:** sensibilidad. **E:** especificidad. **PPV:** valor predictivo positivo. **NPV:** valor predictivo negativo. **LR +:** *likelihood ratio* positiva.

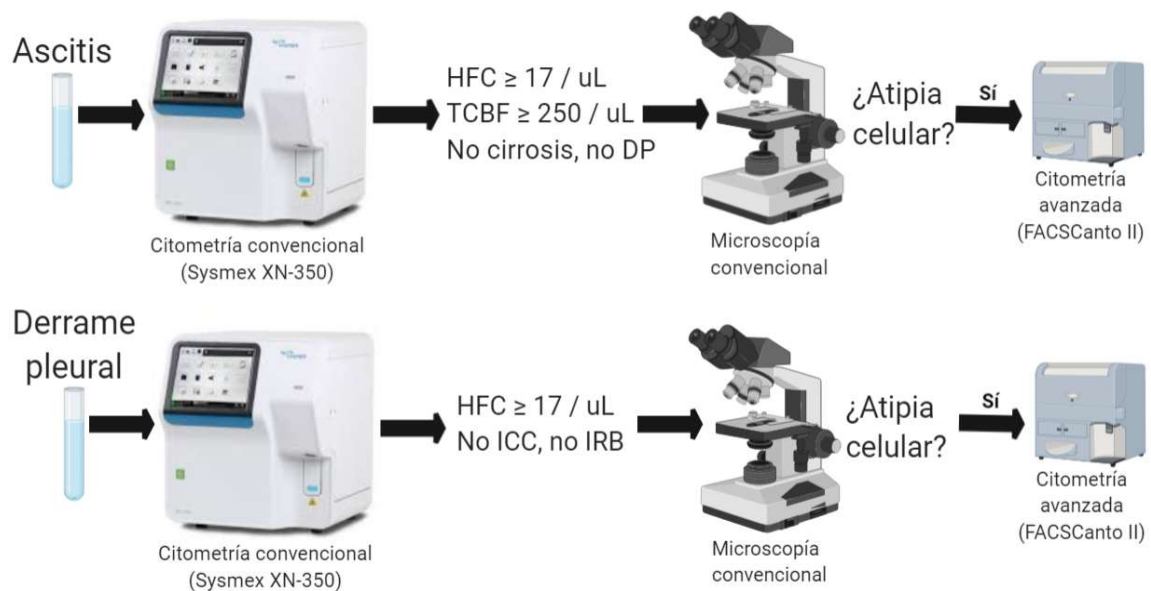
Smears that should be performed: frotis que se realizarían si se aplicara cada algoritmo.

Adaptado de Wong–Arteta J. High fluorescence cell count in pleural fluids for malignant effusion screening. Clin Chim Acta 2019.

Discusión 2:

Nuestros resultados demuestran que el punto de corte de HF-BF# $\geq 17/\mu\text{L}$ es útil para el cribado de los derrames neoplásicos tanto en líquido ascítico como en líquido pleural (Figura 9); pero en este último la asociación con TC-BF# parece no tener utilidad. Los puntos fuertes de este estudio incluyen la gran cantidad de muestras analizadas y su realización dentro de la práctica clínica habitual. La implementación del recuento de células de alta fluorescencia en algoritmos para el cribado y el seguimiento de los derrames neoplásicos podrían adelantar su diagnóstico, y permitiría un seguimiento más estricto en pacientes con citología negativa.

Figura 9: Algoritmo para el cribado de los derrames neoplásicos.



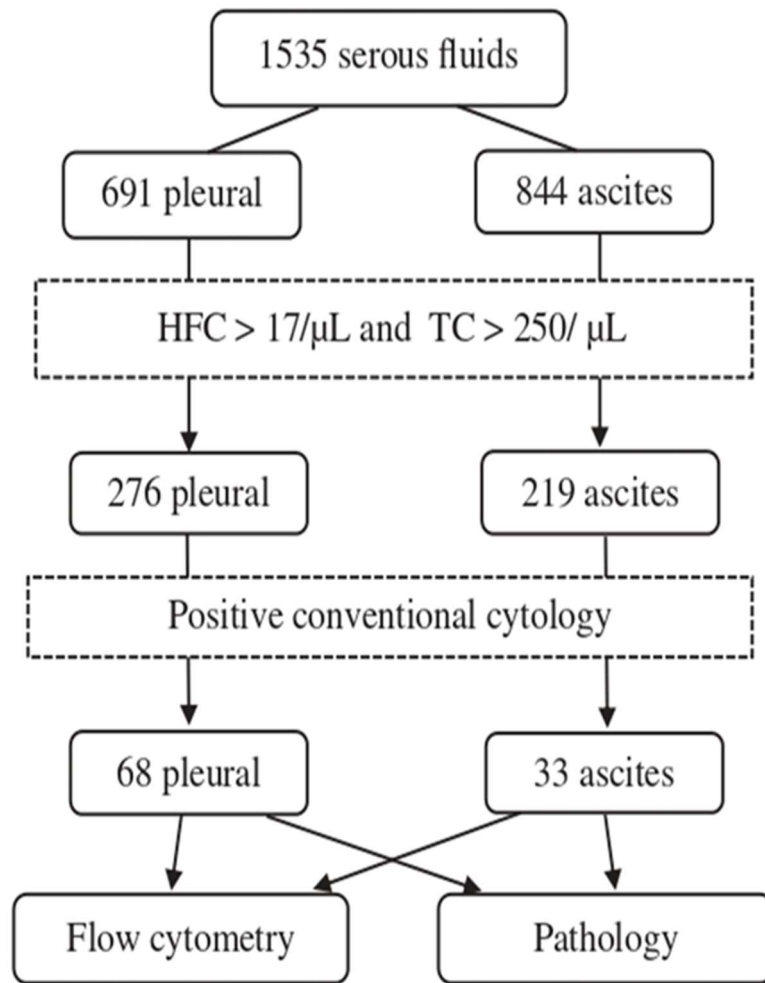
HFC, células de alta fluorescencia; TCBF, células nucleadas totales, DP, diálisis peritoneal; ICC, insuficiencia cardíaca congestiva; IRB, infección respiratoria baja.

Publicación 3: The utility of flow cytometry in the diagnostic work up of malignant effusions due to non-hematopoietic neoplasms.

Resumen 3:

El derrame pleural maligno y la carcinomatosis peritoneal son causas frecuentes de derrame (1,4). La evaluación citológica a través de la tinción con Papanicolaou (seguida de inmunohistoquímica, si corresponde) es actualmente el gold standard para el diagnóstico de los derrames malignos, pero su sensibilidad es del 40% al 80% y es una técnica que requiere mucho tiempo (7). Aunque la citometría de flujo avanzada (BD FACSCanto II™) no se usa de forma rutinaria en el diagnóstico o seguimiento de las neoplasias no hematológicas, tiene la ventaja de poder aplicarse rápidamente a muestras frescas, lo que puede disminuir el tiempo para el diagnóstico. El objetivo principal de este estudio fue evaluar la utilidad de la citometría de flujo como herramienta confirmatoria en el diagnóstico de derrames neoplásicos, basada en la expresión del anticuerpo EpCAM en células tumorales versus la evaluación citológica. Se recolectaron 1535 fluidos serosos de forma consecutiva, de los cuales 101 (68 pleurales, 33 ascíticos) se seleccionaron mediante un algoritmo de cribado y se analizaron por citometría de flujo avanzada y citología/inmunohistoquímica (Figura 10). 73 de estas muestras (46 pleurales, 27 ascitis) se consideraron malignas según criterios clínicos, citológicos y radiológicos. Según nuestros datos, el 75% (55/73) de estas muestras fueron positivas por citología/inmunohistoquímica y el 74% (54/73) por citometría.

Figura 10: Algoritmo para el cribado de las células malignas.

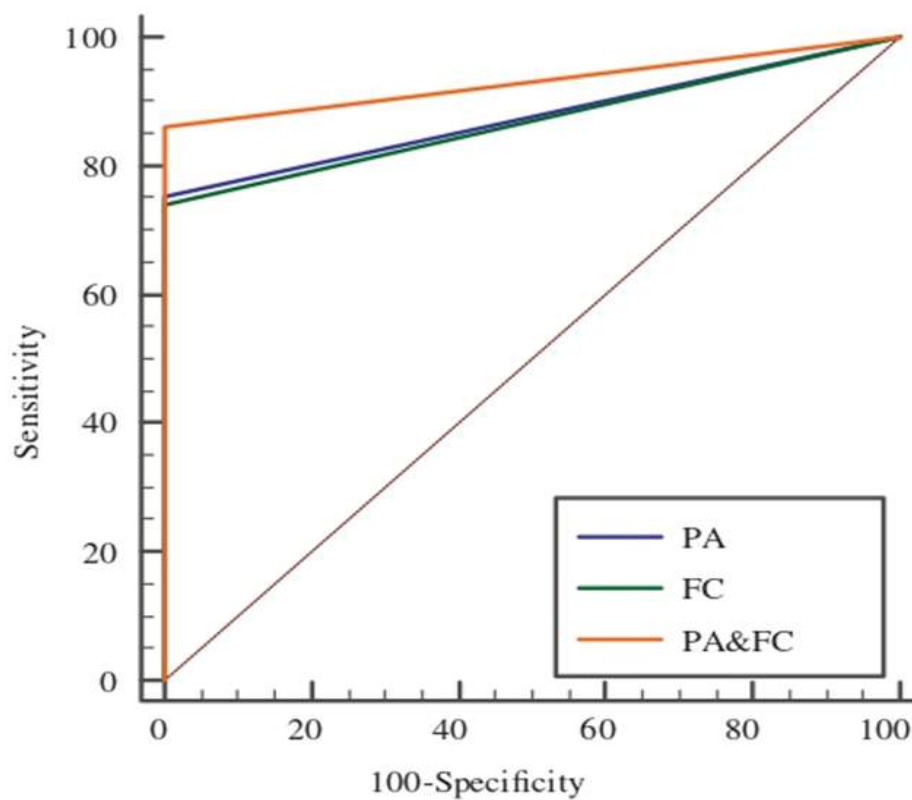


HFC > 17/μL and TC > 250/μL, células de alta fluorescencia totales mayores a 17 por microlitro asociado a células totales mayores a 250 por microlitro.

Positive conventional cytology, citología convencional positiva para atipia celular. **Flow cytometry**, citometría de flujo. **Pathology**, citología/ inmunohistoquímica.

La sensibilidad, la especificidad y el área bajo la curva de la citometría y la citología fueron similares; pero estos resultados mejoraron cuando ambas técnicas fueron utilizadas en paralelo (Figura 11). Además, la mediana del tiempo de respuesta fue diferente (1 vs. 5, respectivamente) (Tabla 11), considerando como tal al tiempo transcurrido desde la entrega de la muestra hasta la emisión del informe.

Figura 11: Áreas bajo la curva de la citología y la citometría para la detección de células malignas.



PA, citología/inmunohistoquímica. **FC**, citometría de flujo.

PA&FC, utilización de ambas técnicas en paralelo.

Tabla 11: Rendimiento de la citometría y la citología en el diagnóstico de los derrames neoplásicos, después de utilizar un algoritmo de cribado.

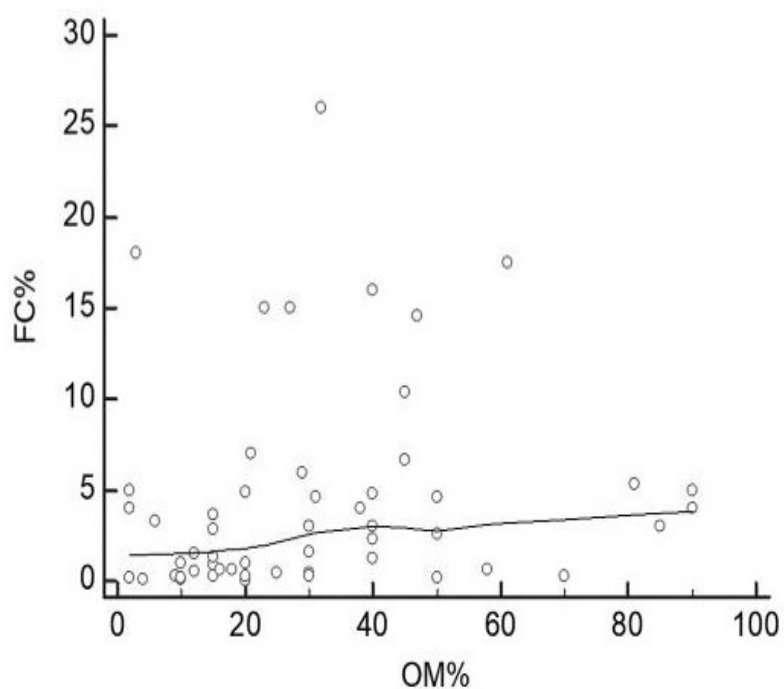
	S	E	AUC	Delay
FC	73.9% (62-84%)	100% (88-100%)	0.87 (0.79-0.93)	1 (0-1)
PA	75.3% (64-85%)	100% (88-100%)	0.88 (0.80-0.93)	5 (1-14)
FC&PA	86.3% (76-93%)	100% (88-100%)	0.93 (0.86-0.97)	

FC: citometría de flujo; **PA:** citología; **FC&PA:** citometría y citología utilizadas en paralelo. **S:** sensibilidad; **E:** especificidad; **AUC:** área bajo la curva; **Delay:** mediana en días del tiempo de respuesta desde la extracción de la muestra hasta la emisión del informe definitivo.

Adaptado de Wong–Arteta J. The utility of flow cytometry in the diagnostic work up of malignant effusions due to nonhematopoietic neoplasms. Cytometry part B 2020.

Por otro lado, al comparar el porcentaje de células atípicas encontradas por citología convencional (laboratorio de Bioquímica, tinción May-Grunwald-Giemsa) y el porcentaje de células carcinomatosas CD45–/EpCAM+, se observó coeficiente de correlación bajo y no significativo ($r = 0,1492$; $p = 0,29$), lo que se traduce en una falta de correlación entre ambas (Figura 12).

Figura 12: Correlación entre el porcentaje de células atípicas y eventos CD45-/EPCAM+.



FC%, porcentaje de eventos CD45-/EPCAM+ detectados por citometría de flujo. **OM%**, porcentaje de células atípicas detectadas por citología convencional.

Adaptado de Wong–Arteta J. The utility of flow cytometry in the diagnostic work up of malignant effusions due to nonhematopoietic neoplasms. Cytometry part B 2020.

Discusión 3:

En la rutina diaria de trabajo, algunos exámenes citológicos se informan como sospechosos o atípicos en función de ciertas características; pero esta información no es suficiente hacer un diagnóstico, porque de cara a tomar una decisión clínica, estos resultados se consideran negativos. Nuestros datos demuestran que si se incorpora la citometría de flujo en la evaluación de rutina de las neoplasias no hematológicas, es posible analizar rápidamente un fluido seroso en los casos sospechosos, y emitir un diagnóstico con un mayor grado de confianza y en un tiempo menor. La citometría es una prueba complementaria útil al examen citológico, la cual proporciona resultados más rápidos en comparación con la inmunohistoquímica, pudiendo identificar aquellas células malignas que no se detectaron con la citología. El uso combinado de ambas técnicas en paralelo mejora el rendimiento de estas por separado.

6. CONCLUSIONES

1. Conclusión general 1: Es posible realizar un algoritmo de cribado para los derrames neoplásicos basado en el recuento de las células de alta fluorescencia a través de la citometría convencional.

- a. En el cribado de la carcinomatosis peritoneal, el recuento de las células de alta fluorescencia (HF–BF#) ha demostrado una sensibilidad y un área bajo la curva mayor que su porcentaje (HF–BF%).
- b. En el cribado de la carcinomatosis peritoneal, asociar HF–BF# a otras variables como el recuento total de células nucleadas (TC–BF#), la citología convencional y el diagnóstico del paciente permite mejorar el área bajo la curva y la sensibilidad de la HF–BF# en solitario.
- c. En el cribado del derrame pleural maligno, HF–BF# y HF–BF% ofrecen sensibilidades y áreas bajo la curva similares.
- d. En el cribado del derrame pleural maligno, asociar HF–BF# y HF–BF% a otras variables como la citología convencional y el diagnóstico del paciente permite mejorar el área bajo la curva y la sensibilidad de estas en solitario
- e. La aplicación de un algoritmo de cribado para la detección de células neoplásicas disminuye el número de frotis a realizar.

2. Conclusión general 2: En los líquidos ascíticos y pleurales, la detección de células carcinomatosas a través de los eventos EpCAM+/CD45- ofrece resultados comparables con la citología/inmunohistoquímica.

- a. En el diagnóstico del derrame neoplásico, la citometría de flujo avanzada ofrece un tiempo de respuesta menor que la citología/inmunohistoquímica.

- b. En el diagnóstico del derrame neoplásico, la realización en paralelo de la citometría de flujo avanzada y la citología/inmunohistoquímica mejora la sensibilidad de ambas técnicas en solitario.

- c. No se ha encontrado una correlación entre el porcentaje de células atípicas por citología convencional y el porcentaje de células EpCAM+/CD45- por citometría de flujo avanzada.

7. REFERENCIAS

1. Becker G, Galandi D, Blum HE. Malignant ascites: systematic review and guideline for treatment. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 2006 Mar;42(5):589–97.
2. Runyon BA, Montano AA, Akriviadis EA, Antillon MR, Irving MA, McHutchison JG. The serum-ascites albumin gradient is superior to the exudate-transudate concept in the differential diagnosis of ascites. *Ann Intern Med*. 1992 Aug 1;117(3):215–20.
3. Runyon BA, Hoefs JC, Morgan TR. Ascitic fluid analysis in malignancy-related ascites. *Hepatology* Baltim Md. 1988 Oct;8(5):1104–9.
4. 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 Jun 1;50(6):235–49.
5. Lepus CM, Vivero M. Updates in Effusion Cytology. *Surg Pathol Clin*. 2018 Sep;11(3):523–44.
6. Yu GH, Glaser LJ, Gustafson KS. Role of Ancillary Techniques in Fluid Cytology. *Acta Cytol*. 2019 Apr 24;1–11.
7. Metzgeroth G, Kuhn C, Schultheis B, Hehlmann R, Hastka J. Diagnostic accuracy of cytology and immunocytology in carcinomatous effusions. *Cytopathology*. 2008 Aug 1;19(4):205–11.
8. Fetsch PA, Abati A. Immunocytochemistry in effusion cytology: a contemporary review. *Cancer*. 2001 Oct 25;93(5):293–308.
9. Fluorescence flow cytometry - Sysmex Europe GmbH [Internet]. [cited 2019 Aug 4]. Available from: <https://www.sysmex-europe.com/academy/knowledge-centre/measurement-technologies/fluorescence-flow-cytometry.html>
10. WBC differential channel - Sysmex Europe GmbH [Internet]. [cited 2019 Aug 4]. Available from: <https://www.sysmex-europe.com/academy/clinic-laboratory/analyser-channels/wbc-differential-channel.html>
11. Labaere D, Boeckx N, Geerts I, Moens M, Van den Driessche M. Detection of malignant cells in serous body fluids by counting high-fluorescent cells on the Sysmex XN-2000 hematology analyzer. *Int J Lab Hematol*. 2015 Oct;37(5):715–22.

12. Davidson B. Malignant Nonhematological Effusion Characterization by Flow Cytometry. *Acta Cytol.* 2016;60(4):365–71.
13. Pillai V, Dorfman DM. Flow Cytometry of Nonhematopoietic Neoplasms. *Acta Cytol.* 2016;60(4):336–43.
14. Acosta M, Pereira J, Arroz M. Screening of carcinoma metastasis by flow cytometry: A study of 238 cases. *Cytometry B Clin Cytom.* 2016;90(3):289–94.
15. van Bussel MTJ, Pluim D, Bol M, Beijnen JH, Schellens JHM, Brandsma D. EpCAM-based assays for epithelial tumor cell detection in cerebrospinal fluid. *J Neurooncol.* 2018 Mar;137(1):1–10.
16. Ayantunde AA, Parsons SL. Pattern and prognostic factors in patients with malignant ascites: a retrospective study. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2007 May;18(5):945–9.
17. Runyon BA. Management of adult patients with ascites caused by cirrhosis. *Hepatology Baltim Md.* 1998 Jan;27(1):264–72.
18. Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease- 2 Volume Set - 11th Edition. Available from: <https://www.elsevier.com/books/sleisenger-and-fordtrans-gastrointestinal-and-liver-disease-2-volume-set/feldman/978-0-323-60962-3>
19. DeSitter L, Rector WG. The significance of bloody ascites in patients with cirrhosis. *Am J Gastroenterol.* 1984 Feb;79(2):136–8.
20. Akriviadis EA. Hemoperitoneum in patients with ascites. *Am J Gastroenterol.* 1997 Apr;92(4):567–75.
21. Chetty R, Learmonth GM, Taylor DA. Giant cell hepatocellular carcinoma. *Cytopathol Off J Br Soc Clin Cytol.* 1990;1(4):233–7.
22. Falconieri G, Zanconati F, Colautti I, Dudine S, Bonifacio-Gori D, Di Bonito L. Effusion cytology of hepatocellular carcinoma. *Acta Cytol.* 1995 Oct;39(5):893–7.
23. Cruikshank DP, Buchsbaum HJ. Effects of rapid paracentesis. Cardiovascular dynamics and body fluid composition. *JAMA.* 1973 Sep 10;225(11):1361–2.
24. Colli A, Cocciolo M, Riva C, Marcassoli L, Pirola M, Di Gregorio P, et al. Ascitic fluid analysis in hepatocellular carcinoma. *Cancer.* 1993 Aug 1;72(3):677–82.

25. Decker D, Stratmann H, Springer W, Schwering H, Varnai N, Bollmann R. Benign and malignant cells in effusions: diagnostic value of image DNA cytometry in comparison to cytological analysis. *Pathol Res Pract*. 1998;194(11):791–5.
26. Kielhorn E, Schofield K, Rimm DL. Use of magnetic enrichment for detection of carcinoma cells in fluid specimens. *Cancer*. 2002;94(1):205–11.
27. Allen VA, Takashima Y, Nayak S, Manahan KJ, Geisler JP. Assessment of False-negative Ascites Cytology in Epithelial Ovarian Carcinoma: A Study of 313 Patients. *Am J Clin Oncol*. 2017 Apr;40(2):175–7.
28. Patel NP, Taylor CA, Levine EA, Trupiano JK, Geisinger KR. Cytomorphologic features of primary peritoneal mesothelioma in effusion, washing, and fine-needle aspiration biopsy specimens: examination of 49 cases at one institution, including post-intraperitoneal hyperthermic chemotherapy findings. *Am J Clin Pathol*. 2007 Sep;128(3):414–22.
29. Hassan R, Alexander R, Antman K, Boffetta P, Churg A, Coit D, et al. Current treatment options and biology of peritoneal mesothelioma: meeting summary of the first NIH peritoneal mesothelioma conference. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2006 Nov;17(11):1615–9.
30. Franiel T, Diederichs G, Engelken F, Elgeti T, Rost J, Rogalla P. Multi-detector CT in peritoneal carcinomatosis: diagnostic role of thin slices and multiplanar reconstructions. *Abdom Imaging*. 2009 Feb;34(1):49–54.
31. Marin D, Catalano C, Baski M, Di Martino M, Geiger D, Di Giorgio A, et al. 64-Section multi-detector row CT in the preoperative diagnosis of peritoneal carcinomatosis: correlation with histopathological findings. *Abdom Imaging*. 2010 Dec;35(6):694–700.
32. Rodríguez-Panadero F. Enfermedades de la pleura. Farreras Rozman. *Medicina Interna - Decimoctava edición*. 2016 Elsevier España. Capítulo 80, 745-756.
33. Villena Garrido V, Ferrer Sancho J, Hernández Blasco L, de Pablo Gafas A, Pérez Rodríguez E, Rodríguez Panadero F, et al. [Diagnosis and treatment of pleural effusion]. *Arch Bronconeumol*. 2006 Jul;42(7):349–72.

34. Light RW, Macgregor MI, Luchsinger PC, Ball WC. Pleural effusions: the diagnostic separation of transudates and exudates. *Ann Intern Med.* 1972 Oct;77(4):507–13.
35. Bielsa S, Porcel JM, Castellote J, Mas E, Esquerda A, Light RW. Solving the Light's criteria misclassification rate of cardiac and hepatic transudates. *Respirol Carlton Vic.* 2012 May;17(4):721–6.
36. Rodríguez-Panadero F. Medical thoracoscopy. *Respir Int Rev Thorac Dis.* 2008;76(4):363–72.
37. Qureshi NR, Rahman NM, Gleeson FV. Thoracic ultrasound in the diagnosis of malignant pleural effusion. *Thorax.* 2009 Feb;64(2):139–43.
38. Verbsky J, Routes J. Flow cytometry for the diagnosis of primary immunodeficiencies - UpToDate. Available from: https://www.uptodate.com/contents/flow-cytometry-for-the-diagnosis-of-primary-immunodeficiencies?search=flow%20cytometry&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1
39. Pedreira CE, Costa ES, Lecrevisse Q, van Dongen JJM, Orfao A, EuroFlow Consortium. Overview of clinical flow cytometry data analysis: recent advances and future challenges. *Trends Biotechnol.* 2013 Jul;31(7):415–25.
40. McCoy JP. Basic principles of flow cytometry. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2002 Apr;16(2):229–43.
41. Givan AL. Principles of flow cytometry: an overview. *Methods Cell Biol.* 2001;63:19–50.
42. Mahnke YD, Roederer M. Optimizing a multicolor immunophenotyping assay. *Clin Lab Med.* 2007 Sep;27(3):469–85, v.
43. Engel P, Boumsell L, Balderas R, Bensussan A, Gattei V, Horejsi V, et al. CD Nomenclature 2015: Human Leukocyte Differentiation Antigen Workshops as a Driving Force in Immunology. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2015 Nov 15;195(10):4555–63.
44. Kappelmayer J, Gratama JW, Karászi É, Menéndez P, Ciudad J, Rivas R, et al. Flow cytometric detection of intracellular myeloperoxidase, CD3 and CD79a: Interaction

between monoclonal antibody clones, fluorochromes and sample preparation protocols. *J Immunol Methods*. 2000 Aug 28;242(1):53–65.

45. Chattopadhyay PK, Gaylord B, Palmer A, Jiang N, Raven MA, Lewis G, et al. Brilliant violet fluorophores: a new class of ultrabright fluorescent compounds for immunofluorescence experiments. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol*. 2012 Jun;81(6):456–66.

46. Baumgarth N, Roederer M. A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. *J Immunol Methods*. 2000 Sep 21;243(1–2):77–97.

47. Roederer M. Compensation in flow cytometry. *Curr Protoc Cytom*. 2002 Dec;Chapter 1:Unit 1.14.

48. Khodaiji S. Newer CBC Parameters of Clinical Significance. In: Saxena R, Pati HP, editors. *Hematopathology: Advances in Understanding* [Internet]. Singapore: Springer; 2019 [cited 2020 Apr 12]. p. 3–25. Available from: https://doi.org/10.1007/978-981-13-7713-6_1

49. Merino A. *Manual de citología de sangre periférica y líquidos biológicos*. 2o edición. Editorial médica Panamericana S.A.; 2020. p221–222.

50. Fleming C. From Manual Microscopy to Automated Cell Counters for First Line Screening of Body Fluids : “But not without a special body fluid mode” [Internet]. 2016 [cited 2020 Apr 12]. Available from: <https://repub.eur.nl/pub/80130>

51. Davidson B, Dong HP, Holth A, Berner A, Risberg B. Flow cytometric immunophenotyping of cancer cells in effusion specimens: diagnostic and research applications. *Diagn Cytopathol*. 2007 Sep;35(9):568–78.

52. 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 May;139(5):672–81.

53. Maetzel D, Denzel S, Mack B, Canis M, Went P, Benk M, et al. Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. *Nat Cell Biol*. 2009 Feb;11(2):162–71.

54. Winter MJ, Nagelkerken B, Mertens AEE, Rees-Bakker HAM, Briaire-de Bruijn IH, Litvinov SV. Expression of Ep-CAM shifts the state of cadherin-mediated adhesions from strong to weak. *Exp Cell Res*. 2003 Apr 15;285(1):50–8.

55. Wenqi D, Li W, Shanshan C, Bei C, Yafei Z, Feihu B, et al. EpCAM is overexpressed in gastric cancer and its downregulation suppresses proliferation of gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2009 Sep;135(9):1277–85.
56. Schmelzer E, Reid LM. EpCAM expression in normal, non-pathological tissues. *Front Biosci J Virtual Libr*. 2008 Jan 1;13:3096–100.
57. Litvinov SV, Velders MP, Bakker HA, Fleuren GJ, Warnaar SO. Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol*. 1994 Apr;125(2):437–46.
58. Went PT, Lugli A, Meier S, Bundi M, Mirlacher M, Sauter G, et al. Frequent EpCam protein expression in human carcinomas. *Hum Pathol*. 2004 Jan;35(1):122–8.
59. Rheinländer A, Schraven B, Bommhardt U. CD45 in human physiology and clinical medicine. *Immunol Lett*. 2018;196:22–32.
60. Chang A, Benda PM, Wood BL, Kussick SJ. Lineage-specific identification of nonhematopoietic neoplasms by flow cytometry. *Am J Clin Pathol*. 2003 May;119(5):643–55.
61. Ferreira-Facio CS, Milito C, Botafogo V, Fontana M, Thiago LS, Oliveira E, et al. Contribution of multiparameter flow cytometry immunophenotyping to the diagnostic screening and classification of pediatric cancer. *PloS One*. 2013;8(3):e55534.
62. Devoe K, Weidner N. Immunohistochemistry of small round-cell tumors. *Semin Diagn Pathol*. 2000 Aug;17(3):216–24.
63. Suassuna JHR, Neves FCD, Hartley RB, Ogg CS, Cameron JS. Immunohistochemical studies of the peritoneal membrane and infiltrating cells in normal subjects and in patients on CAPD. *Kidney Int*. 1994 Aug 1;46(2):443–54.
64. Ganju RK, Sunday M, Tsarwhas DG, Card A, Shipp MA. CD10/NEP in non-small cell lung carcinomas. Relationship to cellular proliferation. *J Clin Invest*. 1994 Nov;94(5):1784–91.
65. Kumar S, Perlman E, Harris CA, Raffeld M, Tsokos M. Myogenin is a specific marker for rhabdomyosarcoma: an immunohistochemical study in paraffin-embedded tissues. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. 2000 Sep;13(9):988–93.

66. Hjerpe A, Ascoli V, Bedrossian CWM, Boon ME, Creaney J, Davidson B, et al. Guidelines for the Cytopathologic Diagnosis of Epithelioid and Mixed-Type Malignant Mesothelioma. *Acta Cytol.* 2015;59(1):2–16.
67. Annunziata J, Miller ML, Park DC, Vlad G, Bhagat G, Alobeid B. Detection of Nonhematologic Neoplasms by Routine Flow Cytometry Analysis. *Am J Clin Pathol.* 2020 Jan 1;153(1):99–104.
68. O’Connell FP, Pinkus JL, Pinkus GS. CD138 (syndecan-1), a plasma cell marker immunohistochemical profile in hematopoietic and nonhematopoietic neoplasms. *Am J Clin Pathol.* 2004 Feb;121(2):254–63.
69. Saqi A, Yun SS, Yu GH, Alexis D, Taub RN, Powell CA, et al. Utility of CD138 (syndecan-1) in distinguishing carcinomas from mesotheliomas. *Diagn Cytopathol.* 2005;33(2):65–70.
70. Dong HP, Holth A, Berner A, Davidson B, Risberg B. Flow cytometric immunophenotyping of epithelial cancer cells in effusions—Technical considerations and pitfalls. *Cytometry B Clin Cytom.* 2007;72B(5):332–43.
71. Roca E, Lacroix R, Judicone C, Laroumagne S, Robert S, Cointe S, et al. Detection of EpCAM-positive microparticles in pleural fluid: A new approach to mini-invasively identify patients with malignant pleural effusions. *Oncotarget.* 2016 Jan 19;7(3):3357–66.
72. 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.* 2018 Oct 25;56(11):272–4.

8. ANEXOS

Letter to the Editor

Jhonatan Wong-Arteta*, Anna Merino, Silvia Torrente, Jesus M. Banales and Luis Bujanda

High fluorescence cell count in ascitic body fluids for carcinomatosis screening

<https://doi.org/10.1515/cclm-2018-0359>

Received February 26, 2018; accepted April 9, 2018

Keywords: ascites; carcinomatosis; high fluorescence cell.

To the Editor,

Malignant ascites is a serious condition, with an overall survival of between 1 and 4 months after diagnosis, and it accounts for 7 to 10% of all cases of ascites [1–3]. The etiology is diverse, but approximately two-thirds of cases have been found to be secondary to carcinomatous ascites. It is important to recognize the presence of malignant cells, but this continues to be a challenge, given their morphological complexity and the difficulty of differentiating them from mesothelial cells and macrophages. The primary objective of this study was to assess the usefulness of counting high fluorescence cells in ascitic fluid for the screening of peritoneal carcinomatosis.

We analyzed all consecutive ascitic fluid samples obtained between November 2015 and September 2017. Samples were collected in 15-mL conical polypropylene tubes without anticoagulant (Falcon), and were processed in the clinical laboratory within 1 h of collection using a Sysmex XN-350® analyzer in “open-body fluid (BF) mode”. Before analysis, the following steps were performed: (1) samples were examined for blood clots, any found being removed using a Pasteur pipette, and (2) each tube was gently rolled between the palms of the hand for 1 min, turning it upside down 10 times in this period. The

total number of high fluorescence cells/ μL was called the HF-BF# and the number of high fluorescence cells per 100 leucocytes the HF-BF%. The total number of high fluorescence cells and leucocytes/ μL was referred to as the total count of nucleated cells (TC-BF#). We reviewed the medical records of the patients from whom ascitic fluid samples had been collected. Patients were considered to have carcinomatous ascites if they met at least one of the following criteria: (1) a computed tomography (CT) based diagnosis of peritoneal carcinomatosis and compatible clinical course, and/or (2) cytology or biopsy (PA) positive for malignant cells from the pathology department. Those fluids in which CT or PA had not been performed were discarded.

Areas under the curves (AUCs) were calculated using MedCalc Version 12.7.0.

A total of 2560 fluid samples were collected, 42% of these (1085/2560) corresponding to ascitic fluid. Based on the criteria stated above, carcinomatosis was identified in 4.3% (47/1085) of cases. All the corresponding patients underwent CT, yielding positive findings in 95.7% (45/47) of cases, while only 66% (31/47) of the ascitic fluid samples with carcinomatosis underwent cytological analysis by the histopathology department, with positive results in 58% of cases (18/31). The lack of cytological analysis for the remaining samples (16/47) was justified based on the positive clinical picture and/or the CT report being considered sufficient to diagnose malignant infiltration. Comparing samples from patients with and without carcinomatosis, we observed that the median TC-BF# (1219 vs. 160; $p < 0.0001$) and HF-BF# (76.5 vs. 14; $p < 0.0001$) were significantly higher in the ascitic fluid samples with carcinomatosis, but differences were not significant for HF-BF% (8.6 vs. 7.8; $p = 0.2$).

The AUCs for the screening of carcinomatosis were: 0.82 for TC-BF# (95% CI, 0.80–0.85; $p = 0.0001$), 0.85 for HF-BF# (95% CI, 0.83–0.87; $p = 0.0001$), and 0.55 for HF-BF% (95% CI, 0.52–0.58; $p = 0.2$). The AUC for HF-BF# was significantly higher than that for HF-BF% ($p < 0.001$) but not than that for TC-BF# ($p = 0.52$). The best cut-off points were TC-BF# $> 341/\mu\text{L}$ and HF-BF# $> 28/\mu\text{L}$, but these were finally chosen based on the greater sensitivity

*Corresponding author: Jhonatan Wong-Arteta, Department of Biochemistry, Donostia University Hospital, University of the Basque Country (UPV/EHU), Dr. Begiristain street 107-115, Arantzazu Building 2nd floor, San Sebastián, Spain, E-mail: wongarteta@gmail.com. <http://orcid.org/0000-0002-4100-4476>

Anna Merino: Biomedical Diagnostic Center, Hospital Clinic of Barcelona, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Silvia Torrente, Jesus M. Banales and Luis Bujanda: Department of Gastroenterology, Donostia University Hospital-Biodonostia Health Research Institute, University of the Basque Country (UPV/EHU), CIBERehd, San Sebastián, Spain

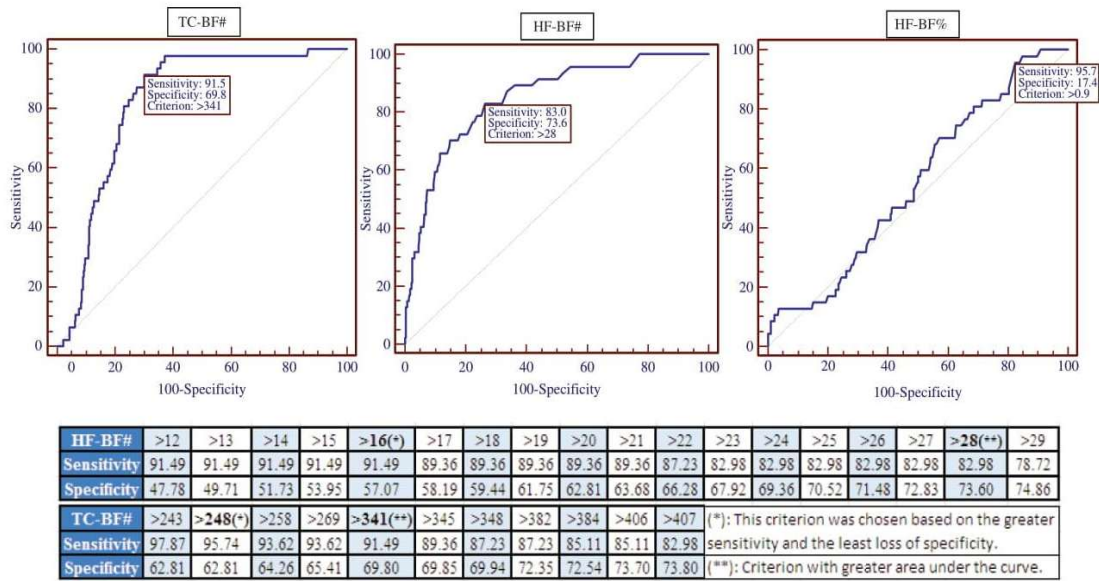


Figure 1: The areas under the receiver operating characteristic curve for TC-BF# (total count of nucleated cells/microliter), HF-BF# (number of high fluorescence cells/microliter) and HF-BF% (number of high fluorescence cells/100 leukocytes) and the cut-off points chosen.

with the least loss of specificity (Figure 1). The combination of TC-BF# $\geq 250/\mu\text{L}$ and HF-BF# $\geq 17/\mu\text{L}$ had a sensitivity, specificity, negative predictive value and positive likelihood ratio of 91%, 77%, 99.5% and 4, respectively (Table 1). When we excluded the cases of ascites associated with portal hypertension due to liver cirrhosis and with paracentesis due to ambulatory peritoneal dialysis, these measures improved. In 8.5% (4/47) cases of carcinomatosis, the algorithm studied was negative (HF-BF# < 17).

To improve the results obtained in this study, the analysis by optical microscopy (OM) performed in the biochemistry laboratory was added. From November 2016 in all the ascitic fluid samples with TC-BF# $\geq 250/\mu\text{L}$ and HF-BF# $\geq 17/\mu\text{L}$ additional smears were prepared by cyto-centrifugation and subsequently stained, determining the presence of malignant cells. This was performed using a Bunsen Citocentrifuga[®] cytocentrifuge with a constant centrifugation speed and duration (28 RCF for 5 min) and a sample volume that varied according to cell density (100 μL for densities of 0–1000/ μL and 50 μL for densities $\geq 1000/\mu\text{L}$). Cell staining was carried out with the Sysmex SP-10 slide maker and stained using the May-Grünwald-Giemsa staining method. Two cytology experts, who were blinded to the clinical data related to each smear, conducted the OM analysis and prepared reports classifying samples as positive or negative for malignant cells. With this procedure, the diagnostic performance improved (see Table 1).

The results of this study demonstrate that the automated analysis of ascitic fluid samples using the Sysmex XN-350[®] analyzer is effective for the screening of carcinomatous ascites, the performance improving further when we exclude ascitic fluid samples from patients with cirrhosis or on ambulatory peritoneal dialysis. The false negatives found (4/47) can be explained by the higher percentage of previous evacuation paracentesis (PEP) in the negative group with respect to the positive group (75 vs. 21%) and within these, the presence of PEP procedure in a time close to the study of the liquid (5 vs. 14 average days).

Microscopy analysis remains the gold standard for the diagnosis of carcinomatous ascites. Previous studies have found sensitivities of cytopathology of 54%–95% [4, 5]. This wide range is mainly related to differences in the type of cancer analyzed, the technique used and the experience of the cytologists. On the other hand, the specificity of this approach is reported to be above 92%. In our study, 58% (18/31) of positive cases were classified as positive by cytopathology.

As described by Labaere et al. [6], we found that analysis of high fluorescence cells with a cut-off of 17 cells/ μL could play an important role in screening for carcinomatosis. In addition, our study provides clinical and radiological parameters that show stronger support for this hypothesis and, also, allows the creation of an algorithm that decreases the amount of smears that should be reviewed by OM (Table 1).

Table 1: Best cut-off points for the detection of peritoneal carcinomatosis.

	S	E	PPV	NPV	LR+	Smears that should be performed
HF-BF# $\geq 17/\mu\text{L}$	91% (80–98%)	57% (53–60%)	8.7% (6–12)	99% (98–100%)	2.1 (1.9–2.4)	46% (494/1085)
TC-BF# $\geq 250/\mu\text{L}$	91% (80–98%)	77% (74–80%)	15% (11–20%)	99.5% (99–100%)	4 (3–4.6)	26% (282/1085)
and HF-BF# $\geq 17/\mu\text{L}$						
TC-BF# $\geq 250/\mu\text{L}$	91% (80–98%)	90% (88–92%)	29% (22–38%)	99.6% (99–100%)	9.2 (8–11)	13% (146/1085)
and HF-BF# $\geq 17/\mu\text{L}$						
no cirrhosis or APD ^a						
TC-BF# $\geq 250/\mu\text{L}$	90.3%	99.6%	93.3%	99.3%	205	
and HF-BF# $\geq 17/\mu\text{L}$	(74–98%)	(98–99.9%)	(78–99%)	(98–99.8%)	(51–819)	
positive OM ^b						

S, sensitivity; E, specificity; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value; LR+, positive likelihood ratio. Smears that would be performed, percentage of smears that would be performed if the described algorithm would be used divided between the total ascitic fluid samples; TC-BF#, total count of nucleated cells/microliter; HF-BF#, number of high fluorescence cells/microliter. ^aNo cirrhosis or APD, patients with cirrhosis and/or ambulatory peritoneal dialysis at the time of analysis were excluded. ^bPositive OM, smear was performed in the Biochemistry laboratory by cytocentrifugation and staining with May-Grünwald-Giemsa to all ascitic liquids from November 2016 that complied with the parameters TC-BF# $\geq 250/\mu\text{L}$ and HF-BF# $\geq 17/\mu\text{L}$, pointing as positive those where a neoplastic infiltrate was found.

Another indirect method of diagnosis is CT imaging. Previous studies indicate a sensitivity of 64%–96% for the diagnosis of peritoneal carcinomatosis [7, 8]. This sensitivity is mainly affected by the size and type of the lesion, the reconstruction of the images and the experience of the radiologist. The specificity of CT imaging reported previously ranges from 91% to 100%, while in our series, 95.7% (45/47) of cases were classified as positive based on CT findings.

Flow cytometry can provide a high sensitivity and specificity compared to immunohistochemical staining, but with a faster response [9].

The strengths of this study include the large number of samples analyzed, the application of diagnostic criteria for peritoneal carcinomatosis and it having being carried out in the context of routine clinical practice. On the other hand, its main limitation has been not having CT imaging and cytological results available for all patients.

In summary, the results of the study presented herein have been demonstrated that high fluorescence cell count is a useful method for the screening of peritoneal carcinomatosis.

Author contributions: All the authors have accepted responsibility for the entire content of this submitted manuscript and approved submission.

Research funding: None declared.

Employment or leadership: None declared.

Honorarium: None declared.

Competing interests: The funding organization(s) played no role in the study design; in the collection, analysis, and

interpretation of data; in the writing of the report; or in the decision to submit the report for publication.

References

1. Becker G, Galandi D, Blum HE. Malignant ascites: systematic review and guideline for treatment. *Eur J Cancer* 2006;42:589–97.
2. Runyon BA, Montano AA, Akriviadis EA, Antillon MR, Irving MA, McHutchison JG. The serum-ascites albumin gradient is superior to the exudate-transudate concept in the differential diagnosis of ascites. *Ann Intern Med* 1992;117:215–20.
3. Runyon BA, Hoefs JC, Morgan TR. Ascitic fluid analysis in malignancy-related ascites. *Hepatology* 1988;8:1104–9.
4. Decker D, Stratmann H, Springer W, Scherling H, Varnai N, Bollmann R. Benign and malignant cells in effusions: diagnostic value of image DNA cytometry in comparison to cytological analysis. *Pathol Res Pract* 1998;194:791–5.
5. Thapar M, Mishra R, Sharma A, Goyal V, Goyal V. Critical analysis of cell block versus smear examination in effusions. *J Cytol* 2009;26:60–4.
6. Labaere D, Boeckx N, Geerts I, Moens M, Van den driessche M. Detection of malignant cells in serous body fluids by counting high-fluorescent cells on the Sysmex XN-2000 hematology analyzer. *Int J Lab Hematol* 2015;37:715–22.
7. Franiel T, Diederichs G, Jan Engelken F, Elgeti T, Rost T, Rogalla P. Multi-detector CT in peritoneal carcinomatosis: diagnostic role of thin slices and multiplanar reconstructions. *Abdom Imaging* 2009;34:49–54.
8. Marin D, Catalano C, Baski M, Di Martino M, Geiger D, Di Giorgio A, et al. 64-Section multi-detector row CT in the preoperative diagnosis of peritoneal carcinomatosis: correlation with histopathological findings. *Abdom Imaging* 2010;35:694–700.
9. Pillai V, Dorfman D. Flow cytometry of nonhematopoietic neoplasms. *Acta Cytol* 2016;60:336–43.



High fluorescence cell count in pleural fluids for malignant effusion screening



Jhonatan Wong-Arteta^{a,b,c,*}, Eva Gil-Rodríguez^a, Raquel Cabezon-Vicente^a,
Edurne Bereciartua-Urbieta^a, Luis Bujanda^{b,d,e,f}

^a Donostia University Hospital, Biochemistry, San Sebastian, País Vasco 20014, Spain

^b University of the Basque Country (UPV-EHU), San Sebastián, País Vasco 20014, Spain

^c Clínica de la Asunción, Hematology, Tolosa, País Vasco 20400, Spain

^d Donostia University Hospital, Gastroenterology, San Sebastián, País Vasco 20014, Spain

^e Biodonostia Health Research Institute, Donostia-san Sebastian, Guipuzcoa 20014, Spain.

^f CIBEREHD, Madrid 28029, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

High fluorescence cell
Malignant pleural effusion
Screening

ABSTRACT

Malignant pleural effusion (MPE) is mainly secondary to pleural metastasis. Its prevalence is 15 to 35% of all the pleural effusions, and the median of survival oscillates between 4 and 6 months, reason why it is very important to know how to diagnose it. The Sysmex XN-350* is an automated hematological analyzer that allows white blood cell count and differentiation, as well as high fluorescence cells (HFC) which includes macrophages, mesothelial and neoplastic cells.

For MPE screening, the best combinations obtained were HF-BF# $\geq 17/\mu\text{L}$ and HF-BF# $> 10/\mu\text{L}$, both in the absence of heart failure and/or low respiratory infection.

The results of this study show that the automated analysis of the pleural fluid with the Sysmex XN-350* analyzer is effective for the screening of the MPE.

To the Editor:

Malignant pleural effusion (MPE) is mainly secondary to pleural metastasis. Its prevalence is 15 to 35% of all the pleural effusions, and the median of survival oscillates between 4 and 6 months, reason why it is very important to know how to diagnose it [1]. Cellular evaluation includes the determination of the number of cells and their differentiation, but the cell identification by microscope review has limitations like being time consuming, which is especially important in an emergency laboratory.

The Sysmex XN-350* is an automated hematological analyzer that allows white blood cells count as well as fluorescence flow cytometry for their differentiation. It uses different dyes to stain the cellular content, which then is exposed to a laser beam that passes through each cell, emitting a scattering of light. For the cellular identification, different parameters are combined such as the frontal scatter, which measures the size; lateral scatter, intracellular complexity; and the fluorescence that measures the nucleic content [3,4]. Combining these parameters and using the “body fluid mode” it is possible to identify neutrophils, eosinophils, monocytes and lymphocytes, excluding from

this differential count the high fluorescence cells (HFC) that includes macrophages, mesothelial and neoplastic cells [5]. In this way, HFC groups cells that, due to their size, complexity and nucleic content, can be differentiated from blood cells.

We have previously published a study for the screening of peritoneal carcinomatosis by the use of high fluorescence cells [6], but since these two types of effusion present different incidences of neoplastic infiltration (pleural effusion 15 to 35%, ascites 7 to 10%) [1,2] we have preferred to develop two different algorithms.

Our objective was to evaluate the utility of counting the high fluorescence cells in pleural liquids for the screening of MPE.

We analyzed consecutively all the pleural liquids obtained between January 2018 and March 2019 from diagnostic thoracentesis. This study was approved by the ethics committee of Donostia University Hospital. Samples were collected in 15 mL conical polypropylene tubes (Falcon), and were processed in the clinical laboratory within 1 h of collection using a Sysmex XN-350* analyzer in “body fluid (BF) mode” [6]. Before analysis, the following steps were performed: (1) samples were examined for blood clots, and (2) each tube was gently rolled between the palms of the hand for 1 min, turning it upside down 10

* Corresponding author at: Urbieta 7, 2C, Hernani, Guipúzcoa, 20120, Basque Country, Spain.
E-mail address: wongarteta@gmail.com (J. Wong-Arteta).

<https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.09.008>

Received 9 September 2019; Received in revised form 9 September 2019; Accepted 10 September 2019

Available online 10 September 2019

0009-8981/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

Table 1
The best combinations of cut-off points for the screening of malignant pleural effusions.

	AUC	S	E	PPV	NPV	LR +	Smears that should be performed
HF-BF# $\geq 17/\mu\text{L}$	0.718	94 (89–97%)	50 (44–55%)	46 (43–48%)	95 (91–97%)	1.9 (1.7–2.1)	64% (324/505)
HF-BF# $> 10/\mu\text{L}$	0.70	98 (94–100%)	42 (37–47%)	43 (41–45%)	98 (94–99%)	1.7 (1.5–1.8)	70% (356/505)
HF-BF# $\geq 17/\mu\text{L}$ No ICC, no infection	0.849	91 (85–95%)	79 (74–83%)	66 (61–71%)	95 (92–97%)	4.3 (3.5–5)	43% (216/505)
HF-BF# $> 10/\mu\text{L}$ No ICC, no infection	0.842	94 (89–97%)	74 (69–79%)	62 (58–66%)	97 (94–98%)	3.7 (3–4.4)	47% (237/505)
HF-BF# $\geq 17/\mu\text{L}$ No ICC, no infection Positive OM	0.918	87 (81–92%)	97 (94–98%)	92 (91–98%)	92 (87–95%)	25 (14–44)	
HF-BF# $> 10/\mu\text{L}$ No ICC, no infection Positive OM	0.925	88 (82–93%)	96 (94–98%)	92 (87–95%)	94 (92–97%)	26 (15–45)	

AUC, area under the curve; S, sensitivity; E, specificity; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value; LR +, positive likelihood ratio. **TC-BF#**, total count of nucleated cells/ μL ; **HF-BF#**, number of high fluorescence cells/ μL . **No ICC, no infection**, exclusion of patients with heart failure and/or low respiratory infection at the time of analysis; **Positive OM**, presence of atypical cells in the smear performed in the Biochemistry laboratory by cytocentrifugation and staining with May Grünwald-Giemsa; **Smears that should be performed**, percentage of smears that would be performed if the described algorithm would be used.

times.

The variables studied were the total number of nucleated cells/ μL (TC-BF#), the total number of high fluorescence cells/ μL (HF-BF#), the number of high fluorescence cells per 100 leucocytes (HF-BF%), the total number of neutrophils (Neut #), the number of neutrophils per 100 leucocytes (Neut%) and the total number of red blood cells (RB #).

We reviewed the medical records of the patients from whom pleural fluid samples had been collected. Patients were considered to have a MPE if they met at least one of the following criteria: (1) neoplastic infiltration associated with pleural effusion diagnosed by computed tomography (CT) and/or (2) positive cytology for malignant cells performed in the department of pathology (PA); in both cases, the presence of radiological pleural effusion and clinical course compatible with neoplastic disease was essential. Those fluids in which neither CT nor AP had been performed were discarded. Areas under the curves (AUCs) were calculated using MedCalc version 12.7.0.

A total of 523 pleural fluids were collected, 18 of which were excluded due to the presence of visible clots. MPE was identified in 31% (156/505). The AUCs for the MPE screening were: 0.78 for HF-BF# (95% CI, 0.75–0.82, $p < .0001$); 0.76 for HF-BF% (95% CI, 0.72–0.80, $p < .0001$); 0.69 for Neut% (95% CI, 0.65–0.73, $p < .0001$); 0.59 for Neut# (95% CI, 0.55–0.64; $p = .0003$); 0.51 for TC-BF# (95% CI, 0.45–0.56, $p = .90$) and 0.52 for RB# (95% CI, 0.47–0.56, $p = .55$).

RB# and TC-BF# were discarded because they were not statistically significant, while HF-BF#, HF-BF%, Neut# and Neut% were analyzed separately and together at different cut-off points, also adding diagnostic suspicion at the time of thoracentesis. For MPE screening, the best combinations obtained were HF-BF# $\geq 17/\mu\text{L}$ and HF-BF# $> 10/\mu\text{L}$, both in the absence of heart failure and/or low respiratory infection (see Table 1).

To improve the results, the analysis by optical microscopy (OM) performed in the biochemistry laboratory was added. Smears were prepared by cyto-centrifugation and subsequently stained. This was performed using a Bunsen Cito-centrifuga[®] cytocentrifuge with a constant centrifugation speed and duration (30 rcf for 5 min) and a sample volume that varied according to cell density (100 μL for densities of 0–1000/ μL and 50 μL for densities $\geq 1000/\mu\text{L}$). Cell staining was carried out with the Sysmex SP-10 slide maker and stained using the May Grünwald-Giemsa staining method. Two cytologists, who were blinded to the clinical data related to each smear, conducted the OM analysis and prepared reports classifying samples as positive or negative for atypical cells.

The results of this study show that the automated analysis of the pleural fluid with the Sysmex XN-350[®] analyzer is effective for the screening of the MPE. The cut-off point of HF-BF# $\geq 17/\mu\text{L}$ was originally published by Labarere et al. [5]. Subsequently, this value was

validated for the screening of peritoneal carcinomatosis [6]. This study maintains the cut-off point of HF-BF# $\geq 17/\mu\text{L}$; but unlike the previous one this focuses on the study of MPE and shows that associating other variables does not clearly improve their diagnostic performance, except those that depend on the clinical data.

The microscopic study from PA continues to be the gold standard for the diagnosis of MPE. Its diagnostic rate varies with the series, which have reported a mean sensitivity of about 60% (40–87%) [7]. A recent study has shown that such sensitivity has not improved despite advances in immunohistochemical methods [8]. On the other hand, the specificity of this technique is higher than 92%. In our study, only 51% (80/156) of the MPE cases were classified as positive by cytopathology, in the rest (76/156) the diagnosis of MPE was based on the presence of pleural effusion with a positive CT report and a clinical picture compatible with neoplastic disease, presenting a median HF-BF# of 45/ μL .

Computed tomography is an important investigation in patients of MPE. The CT features highly suggestive of malignancy are nodular pleural thickening, pleural irregularity, mediastinal pleural thickening, circumferential pleural thickening, and pleural thickness > 10 mm. The reported sensitivity is 36–68% with specificity of 78–100% [9,10].

The strengths of this study include the large number of samples analyzed, the application of clinical, radiological and cytological criteria for the diagnosis of malignant pleural effusion, and having been conducted in the context of routine clinical practice.

The implementation of high fluorescence cells in algorithms for the screening and follow-up of neoplastic effusions would mean earlier diagnosis of MPE, and would allow stricter follow-up in patients with negative PA cytology.

In summary, the screening of neoplastic infiltration in pleural and ascitic fluids is possible using the same cut-off point for high fluorescence cells, which facilitates the implantation of a screening algorithm for the neoplastic serous fluids arriving at the laboratory.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.09.008>.

References

- [1] V. Villena Garrido, E. Cases Viedma, A. Fernández Villar, A. de Pablo Gafas, E. Pérez Rodríguez, J.M. Porcel Pérez, et al., Recommendations of diagnosis and treatment of pleural effusion. Update. Arch. Bronconeumol. Engl. Ed. 50 (6) (2014 Jun 1) 235–249.
- [2] G. Becker, D. Galandi, H.E. Blum, Malignant ascites: systematic review and guideline for treatment, Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990 42 (5) (2006 Mar) 589–597.
- [3] Fluorescence Flow Cytometry - Sysmex Europe GmbH, [Internet]. Available from: <https://www.sysmex-europe.com/academy/knowledge-centre/measurement->

- technologies/fluorescence-flow-cytometry.html.
- [4] WBC differential channel - Sysmex Europe GmbH, [Internet]. Available from: <https://www.sysmex-europe.com/academy/clinic-laboratory/analyser-channels/wbc-differential-channel.html>.
- [5] D. Labaere, N. Boeckx, I. Geerts, M. Moens, M. Van den Driessche, Detection of malignant cells in serous body fluids by counting high-fluorescent cells on the Sysmex XN-2000 hematology analyzer, *Int. J. Lab. Hematol.* 37 (5) (2015 Oct) 715–722.
- [6] J. Wong-Arteta, A. Merino, S. Torrente, J.M. Banales, L. Bujanda, High fluorescence cell count in ascitic body fluids for carcinomatosis screening, *Clin. Chem. Lab. Med.* 56 (11) (2018 Oct 25) 272–274.
- [7] C. Hooper, Y.C.G. Lee, N. Maskell, BTS pleural guideline group. Investigation of a unilateral pleural effusion in adults: British Thoracic Society Pleural Disease Guideline 2010, *Thorax*. 65 (Suppl. 2) (2010 Aug) ii4–17.
- [8] D.T. Arnold, D. De Fonseca, S. Perry, A. Morley, J.E. Harvey, A. Medford, et al., Investigating unilateral pleural effusions: the role of cytology, *Eur. Respir. J.* 52 (5) (2018).
- [9] R. Dixit, K. Agarwal, A. Gokhroo, C.B. Patil, M. Meena, N.S. Shah, et al., Diagnosis and management options in malignant pleural effusions, *Lung India Off. Organ. Indian Chest Soc.* 34 (2) (2017) 160–166.
- [10] R.J. Hallifax, M. Haris, J.P. Corcoran, S. Leyakathalikhhan, E. Brown, D. Srikantharaja, et al., Role of CT in assessing pleural malignancy prior to thoracoscopy, *Thorax*. 70 (2) (2015 Feb) 192–193.

The utility of flow cytometry in the diagnostic work up of malignant effusions due to nonhematopoietic neoplasms

Jhonatan Wong-Arteta^{1,2,3}  | Mercedes Rey⁴ | Larritz Aragón⁴ |
Eva Gil-Rodríguez¹ | Luis Bujanda^{2,5,6,7}

¹Biochemistry, Donostia University Hospital, San Sebastián, País Vasco, Spain

²School of Medicine, University of the Basque Country (UPV-EHU), San Sebastián, País Vasco, Spain

³Hematology, Asuncion Clinic, Tolosa, País Vasco, Spain

⁴Immunology, Donostia University Hospital, San Sebastián, País Vasco, Spain

⁵Gastroenterology, Donostia University Hospital, San Sebastián, País Vasco, Spain

⁶Department of Liver and Gastrointestinal Diseases, Biodonostia Health Research Institute, San Sebastián, País Vasco, Spain

⁷National Institute for the Study of Liver and Gastrointestinal Diseases (CIBERehd), Carlos III National Institute of Health, Madrid, Spain

Correspondence

JhonatanWong-Arteta, School of Medicine, Urbiete 7, 2C, Hernani, Guipúzcoa, 20120, Basque Country, Spain.
Email: wongarteta@gmail.com

Abstract

Malignant pleural effusion and peritoneal carcinomatosis are frequent causes of effusion. Cytological evaluation (PAP-stained slides followed by immunocytochemistry, IHC, if applicable) is currently the gold standard for the diagnosis of malignant effusions, but its sensitivity varies between 40 and 80%, being a time-consuming technique. Although flow cytometry (FC) is not routinely used in the diagnosis or follow-up of nonhematopoietic neoplasms, it has the advantage of being rapidly applicable to fresh samples, potentially decreasing the time for the diagnosis. The main objective of this study was to assess the utility of FC as a confirmatory tool in the diagnosis of neoplastic effusions, based on the expression of EpCAM antibody in tumor cells versus the cytological evaluation. In this work 1,535 serous fluids were collected, of which 101 (68 pleural, 33 ascites) were selected through a screening algorithm and sent to the FC and cytological evaluation. Seventy-three of these samples (46 pleural, 27 ascites) were considered malignant as determined by clinical, cytological and radiological criteria. According to our data, 75% (55/73) of these samples were positive by Cytology/IHC and 74% (54/73) by FC. We noticed that, although the sensitivity, specificity, and area under the curve were similar, the turnaround time was shorter when using FC. Moreover, these results clearly improved by combining both techniques. We conclude that FC provides information about malignant effusions faster than immunohistochemical staining, and we believe that performing both techniques in parallel would improve diagnostic performance.

KEYWORDS

EpCAM, flow cytometry, malignant effusion, nonhematopoietic neoplasms

1 | INTRODUCTION

Malignant pleural effusion and peritoneal carcinomatosis are frequent causes of effusion (15–35%, malignant pleural effusion; 10%, peritoneal carcinomatosis) (Becker, Galandi, & Blum, 2006; Villena Garrido et al., 2014), mainly secondary to metastatic adenocarcinoma of the lung, breast, ovary, and stomach (Lepus & Vivero, 2018; Metzgeroth, Kuhn, Schultheis, Hehlmann, & Hastka, 2008).

Nowadays, cytological evaluation is the gold standard for the diagnosis of malignant effusion. Although carcinomatous cells have a characteristic morphology (Lepus & Vivero, 2018), they are often difficult to differentiate from macrophages and reactive mesothelial cells, which is further complicated if there is a shortage of abnormal cells and/or a significant background of hematologic or mesothelial cells (Yu, Glaser, & Gustafson, 2019). The sensitivity of the conventional morphological examination in diagnosing carcinomatous effusions

varies between 40 and 80%, this discrepancy mainly caused by differences in the experience of the evaluators and the quality of the preparations (Metzgeroth et al., 2008). To improve the diagnostic sensitivity, several additional approaches have been proposed, among these, the IHC has become the most widely used ancillary method in effusion diagnosis, allowing the correct classification of the majority of tumors (Fetsch & Abati, 2001). However, it has the disadvantage of being a time-consuming technique.

Flow cytometry (FC) is widely used in the diagnosis of hematological neoplasms, but despite having demonstrated its potential usefulness, FC is not routinely used in the diagnosis or follow-up of nonhematopoietic neoplasms (Acosta, Pereira, & Arroz, 2016; Davidson, 2016; Dorwal, Moore, Stewart, Harrison, & Monaghan, 2018; Pillai, Cibas, & Dorfman, 2013; Pillai & Dorfman, 2016; van Busselet al., 2018). In concordance, the existing literature about this subject is scarce. FC has the advantage of being rapidly applied to viable cells in fresh specimens, thus decreasing the time for the diagnosis.

The main objective of this study was to assess the utility of flow cytometry as a confirming tool for the cytological studies in the diagnostic workup of nonhematological neoplasms, incorporating this technique after a screening algorithm.

2 | MATERIAL AND METHODS

2.1 | Serous body fluid samples and screening

From April 2018 to September 2019, 1,535 consecutive serous fluids (691 pleural, 844 ascites) were sent from different medical and surgical wards to the Biochemistry laboratory of the Donostia University Hospital for routine diagnostic purposes. Samples were collected in 15-ml conical polypropylene tubes, and the cell count was performed within the first hour after collection using a Sysmex XN-350® analyzer in "body fluid mode."

An algorithm for the screening of neoplastic involvement was applied through the use of high fluorescence cells and conventional cytology (Wong-Arteta, Gil-Rodríguez, Cabezon-Vicente, Bereciartua-Urbiet, & Bujanda, 2019; Wong-Arteta, Merino, Torrente, Banales, & Bujanda, 2018) (Figure 1). The cutoff point was high fluorescence cells >17 per microliter and total nucleated cells >250 per microliter. For conventional cytology, cytopsins were prepared by cytocentrifugation and subsequently stained (May-Grünwald-Giemsa staining method), establishing as positive cytology those that showed signs of cellular atypia: monomorphism, large size, intense basophilia, high nucleus/cytoplasm ratio, irregular nuclear contour, lax chromatin, large nucleoli, formation of tight clusters with loss of intercellular limit, polar vacuolation of cytoplasm, anomalous mitosis, seal rings, and cellular cannibalism (Merino, 2020) (Figure 2). The percentage of cellular atypia was calculated by counting the number of atypical cells within 100 nucleated cells.

Applying this algorithm, 101 of the samples were selected (68 pleural, 33 ascitic), aliquots prepared and sent to the FC and Pathology (PAP-stained and immunohistochemistry) laboratories.

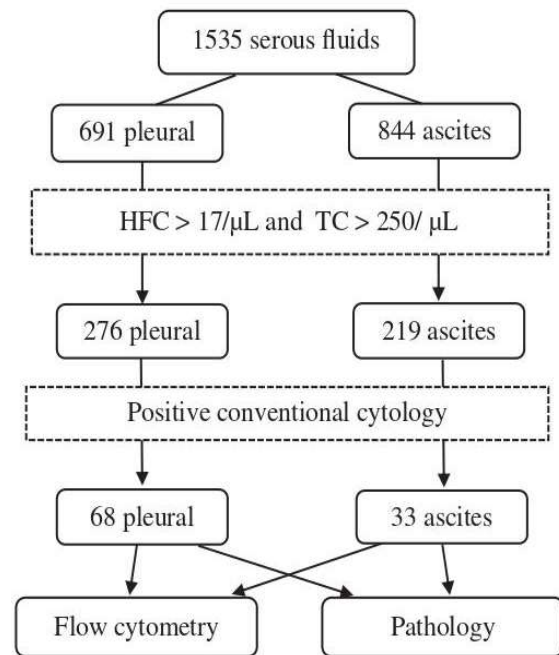


FIGURE 1 Algorithm for the screening of malignant effusion. HFC, high fluorescence cells counted in a Sysmex XN-350® analyzer; TC, total nucleated cells counted in a Sysmex XN-350® analyzer; Positive conventional cytology, smear was performed in the Biochemistry laboratory by cytocentrifugation and staining with May-Grünwald-Giemsa, pointing as positive those where cellular atypia was found. Flow cytometry, analyzed in FACSCanto II flow cytometer (Becton-Dickinson). Pathology, PAP-stained slides followed by immunocytochemistry if applicable

The usefulness of the FC for assessing the presence of non-hematological cells in these samples was determined by comparing the FC results with the final diagnosis of the patient, which included the pathological examination, signs of neoplastic infiltration associated with malignant effusion diagnosed by computed tomography, and clinical course compatible with neoplastic disease.

2.2 | FC

In order to assess the involvement by non-hematological malignant cells of the 101 samples included in the study, FC assays were performed. Briefly, cells were concentrated by sample centrifugation at 1800 rpm 5 min. After discarding the supernatant, 100 μ l of the cell suspension were stained with the following antibodies (Table 1): CD9-V450(Clone M-L13)/CD45-V500(Clone 2D1)/CD71-FITC(Clone LO1.1) /CD99-PE(Clone TŪ12)/CD56-PECy7(Clone NCAM16.2)/CD10-APC(Clone HI10a)/CD81-APCH7(Clone JS-81)/NG2-PE(Clone 7.1)/EpCAM-PE/Clone EBA-1)/CD200-APC(Clone MRC OX-104)/CD14-APCH7(Clone MQPa). All the antibodies were from BD Biosciences (San Jose, CA), except for the NG2-PE antibody, which was provided by Beckman-Coulter(Brea, CA).

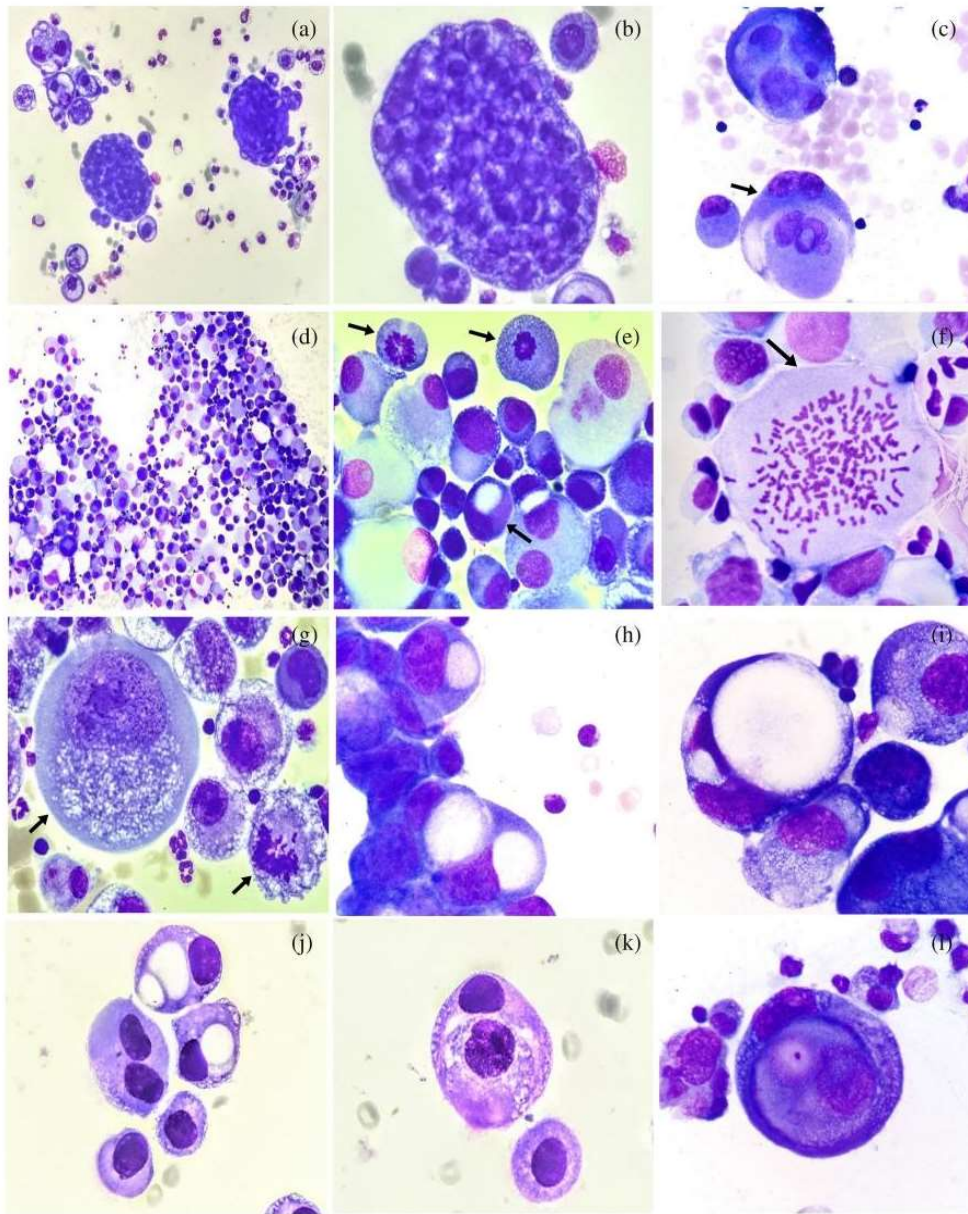


FIGURE 2 Principal signs of cellular atypia. First Line: (a,b) tight clusters with loss of intercellular limit. (c) Large cells; bottom arrow, cellular cannibalism. Pleural effusion of a patient with mesothelioma. Second Line: (d) cell monomorphism. (e,f) upper arrows, increased number of mitosis; bottom arrow: seal ring cell. Ascites fluid of a patient with ovarian adenocarcinoma. Third Line: (g) Left arrow, large cell with polar vacuolation of cytoplasm; right arrow, anomalous mitosis. (h,i) Seal ring cells. Pleural effusion of a patient with lung adenocarcinoma. Fourth Line: (j) Seal ring cells; (k,l) cellular cannibalism. Ascites fluid from a patient with colon adenocarcinoma [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

TABLE 1 Antibody panel for FC detection of non-hematological cell involvement in serous body fluid samples

V-450	V-500	FITC	PE	PerCp Cy5.5	PE Cy7	APC	APC H7
-	45	-	EpCAM	-	56	200	14
-	45	-	NG2	-	56	-	-
9	45	71	99	-	56	10	81

After incubation with the corresponding antibodies 20 min in the dark at room temperature, cells were lysed with 2 ml of FACSlysing solution (BD Biosciences) and washed with 2 ml of FACSFlow (BD Biosciences).

Finally, cells were resuspended in 450 μ l of FACSFlow. Data were collected in a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences) using the FACSDiva acquisition software (BD Biosciences) and analyzed with the Infinicyt software (Cytognos, SAL, Spain).

The gating strategy that we used was based on the ones suggested by Pillai et al. and Acosta et al. for detecting non-hematological cells in the effusions (Acosta et al., 2016; Pillai et al., 2013; Pillai & Dorfman, 2016) (Figure 3). Briefly, a broad initial gate in the FSC versus SSC dot plot ensured that the epithelial tumor cells present in the debris area were not discarded, given the variations in size and cytoplasmic content of these cells. The singlet gate

was then used to eliminate clusters of cells that could interfere and hematopoietic cells CD45+ and CD14+ were gated and excluded from the analysis. The only cells remaining in the analysis were mesothelial cells and EpCAM-positive cells, if present. Back-gating analysis further confirmed that the EpCAM-positive cells were clustered in the FSC versus SSC dot plot, usually in the cellular debris area. The CD45-/EpCAM+ population was referred to the percentage of total acquired events, taking into account the qualitative nature of the population (clustering of the events and intensity of the EpCAM+ signal). The cells identified as neoplastic CD45-/EpCAM+ were diverse in size, presenting variable expression of the rest of the antigens included in the panel, except for CD200, included to identify mesothelial cells (Li, Wang, & Asahina, 2013; Lua & Asahina, 2016; Lua, Li, Pappoe, & Asahina, 2015), which express this antigen with high intensity.

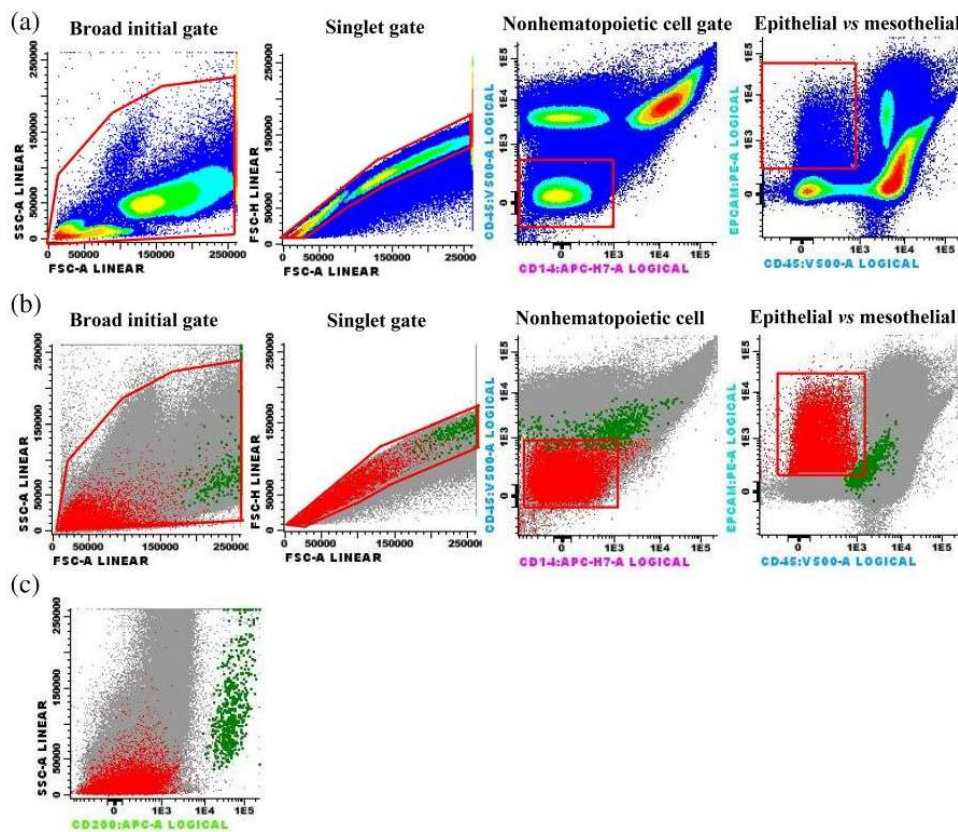


FIGURE 3 Flow cytometric gating strategy for epithelial neoplasms in pleural effusions. Neoplastic cells CD45-/EpCAM+/CD56-/CD200- are depicted in red. The green cells CD200 + hi/EpCAM- correspond to mesothelium. (a) and (b) depict the broad initial gate made in the FSC/SSC dot plot (ensuring that the epithelial tumor cells present in the debris area were not discarded), followed by a singlet gate to eliminate clusters of cells that could interfere in the analysis. The hematopoietic cells CD45+ and CD14+ were also gated and excluded from the analysis. The only cells remaining in the analysis were mesothelial and EpCAM-positive cells, if present. Back-gating analysis further confirmed that the EpCAM-positive cells were widely distributed in the FSC/SSC plot. CD200 expression was restricted to mesothelium, as shown in (c). (Adapted from Pillai and Dorfman, *Acta Cytologica* 2016) [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

TABLE 2 Results obtained by using cytology and flow cytometry after a malignant effusion detection algorithm

	S	E	AUC	Delay
FC	73.9% (62–84%)	100% (88–100%)	0.87 (0.79–0.93)	1 (0–1)
PA	75.3% (64–85%)	100% (88–100%)	0.88 (0.80–0.93)	5 (1–14)
FC&PA	86.3% (76–93%)	100% (88–100%)	0.93 (0.86–0.97)	

Abbreviations: AUC, area under the curve; Delay, median of days of turnaround time to final report; E, specificity; FC&PA, results obtained by using both techniques together; FC, flow cytometry in a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences); PA, PAP-stained slides prepared with the Thin Prep system (Hologic, Boxborough, MA) followed by immunocytochemistry if applicable; S, sensitivity.

2.3 | Pathological examination

Pathological examination was performed on all 101 samples. PAP-stained slides were prepared with the ThinPrep system (Hologic, Boxborough, MA), followed by immunocytochemistry if applicable.

3 | RESULTS

Of the 101 samples (68 pleural, 33 ascites) sent from the Biochemistry laboratory to the pathology and Flow cytometry laboratories for study, 73 (46 pleural, 27 ascites) were considered malignant under clinical-cytological-radiological criteria.

Cytology/immunocytochemistry performed in the Pathology laboratory was positive in 75% (55/73) and FC in 74% (54/73), and no false positives were found. The sensitivity, specificity, area under the curve and turn-around time in median of days were 75, 100%, 0.877 and 5 days for cytology; and 74, 100%, 0.870 and 1 day for FC (Table 2, Figure 4). When comparing both areas under the curve, a difference of 0.00685 was found in favor of cytology, which was not statistically significant ($p = .81$). Moreover, when analyzing the results obtained by combining cytology and FC versus cytology alone, an improvement in sensitivity and specificity was achieved, with a higher area under the curve (0.0548 in favor) statistically significant ($p = .0029$).

Regarding the correlation coefficient, a low and nonsignificant correlation ($r = .1492$; $p = .29$) was observed between the percentage of cellular atypia found by conventional cytology (May-Grünwald-Giemsa) and the percentage of CD45-/EPCAM+ events detected by FC (Figure 5).

We observed discordant cytology and FC results in 17 of the malignant effusions, of which nine were positive cytology /negative FC and eight negative cytology/positive FC. Table 3 provides a detailed description of all the samples studied. Accordingly, Table 4 describes the phenotypic features of different tumors found in our study findings.

4 | DISCUSSION

Nowadays, immunohistochemical analysis remains the most used ancillary method for diagnosis of carcinoma. Nevertheless, it is slow (the response time usually exceeds the median days of hospitalization per patient), with considerable interobserver variability.

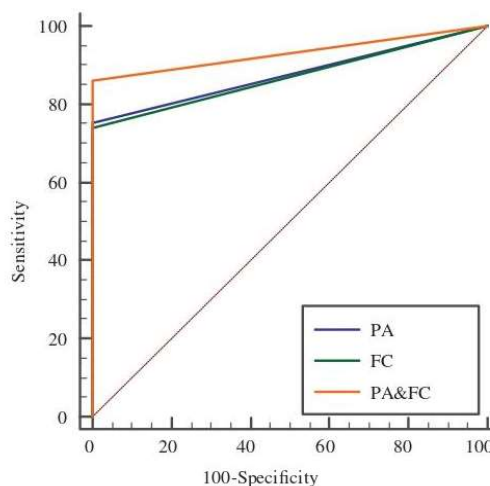


FIGURE 4 Area under the curve for cytology and flow cytometry in the diagnosis of malignant effusions. FC, flow cytometry in a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences); PA, PAP-stained slides prepared with the Thin Prep system (Hologic, Boxborough, MA) followed by immunocytochemistry if applicable; FC&PA, results obtained by using both techniques together [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

In recent years, high fluorescence cells have emerged as useful tools in screening neoplastic effusions (Wong-Arteta et al., 2018; Wong-Arteta et al., 2019). These cells can be detected by Sysmex-XN automated hematological analyzers through fluorescence flow cytometry, grouping cells that, due to their size, complexity and nucleic content (macrophages, mesothelial, and neoplastic cells), can be differentiated from blood cells. Its use facilitates implantation of screening algorithms for the neoplastic serous fluids arriving at the laboratory.

Regarding FC, it is widely used as a tool for the diagnosis of hematological neoplasms, but despite the data pointing to its potential usefulness in the diagnosis of nonhematological processes (Acosta et al., 2016; Davidson, 2016; Dorwal et al., 2018; Pillai et al., 2013; Pillai & Dorfman, 2016; van Bussel et al., 2018), it is not routinely used in daily practice and the literature about this issue remains quite scarce. Some of the advantages of FC are being a sensitive, reproducible, fast, and cost-effective method, with an excellent correlation with cytology. In addition, FC allows simultaneous analysis of the expression of multiple antigens on the surface of thousands of cells in

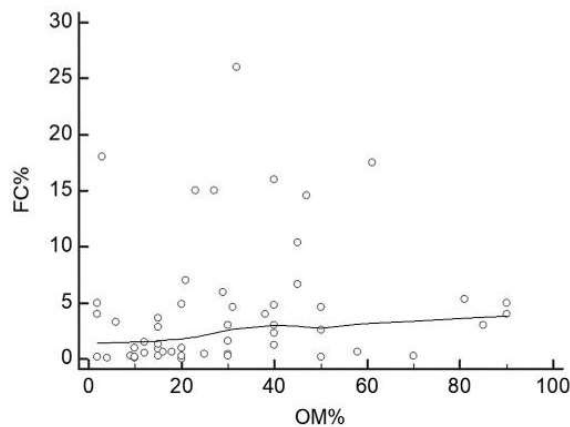


FIGURE 5 Correlation between the percentage of atypical cells and the CD45-/EPCAM+ events. FC%, percentage of CD45-/EPCAM+ events detected by flow cytometry; OM%, percentage of atypical cells found by conventional cytology (May-Grünwald-Giemsa)

comparison with IHC and provides diagnostic information of other nonmalignant cell populations present in the sample, such as lymphocytes and monocytes/macrophages. As an example, a study performed in pleural effusions showed that a CD163+/CD14+ macrophage population higher than 3.65% was associated to malignant effusion diagnosis with sensitivity and specificity of 81.2 and 100%, respectively (Wang et al., 2015).

Regarding the FC detection of nonhematological cells, although several antigens have been tested over the years, EpCAM (epithelial cell adhesion molecule) has emerged as the best marker to detect epithelial cells by FC (Maetzel et al., 2009). EpCAM, also known as Ber-EP4, CD326 or MOC31, is a 40 kDa transmembrane cell surface glycoprotein with cell adhesion function, which during neoplasm development, negatively modulates cadherin-mediated cell adhesion resulting in an anti-adhesive effect (Winter et al., 2003), and therefore enabling the cellular migration that is required for metastasis (Wenqi et al., 2009). EpCAM is expressed in normal epithelial cells, except for epidermal keratinocytes, gastric parietal cells, myoepithelial cells, thymic cortical epithelium, and hepatocytes (Schmelzer & Reid, 2008) and at a higher level in most epithelial neoplasms, but is not expressed on normal or neoplastic mesothelial or hematopoietic cells (Litvinov, Velders, Bakker, Fleuren, & Warnaar, 1994; Went et al., 2004). Given that epithelial cells are not seen in normal serous cavity fluids, the detection of them in a patient with suspicion of an epithelial neoplasm provides extremely valuable information.

Bispecific anti-EpCAM/CD3 antibodies are being used or under study. In this regard, Catumaxomab is effective for the treatment of malignant ascites (Hodge & Badgwell, 2019) and Solitomab is being tested in clinical trials for patients with relapsed/refractory solid tumors not amenable to standard therapy (Kebenko et al., 2018). In this context, FC could be potentially useful in determining the level of EpCAM expression and its correlation with treatment response when these therapeutic antibodies are used. Interestingly, it has been

reported that, in certain tumor types, such as urothelial carcinoma of the bladder or breast cancers, overexpression of EpCAM is associated with an advanced stage of the disease and linked to worse overall survival, pointing to a prognostic value for EpCAM (Patriarca, Macchi, Marschner, & Mellstedt, 2012).

In addition to EpCAM expression, several other antigens have been studied regarding nonhematological processes. Among the antigens included in our panel, CD56 (expressed by a variety of normal cells, including a range of neuroectodermal derivatives and natural killer cells) was proven useful for the identification of nonhematopoietic small round blue cell tumors CD45-/CD56+ (Kussick, Wood, & Li, 2001). A strong CD56 expression predicted a carcinoma with neuroendocrine features, whereas the lack of this antigen suggested the diagnosis of non-small cell carcinoma (Chang, Benda, Wood, & Kussick, 2003). Although we did not receive in our lab any effusion suspicious of neuroblastoma, we had the opportunity to search for infiltration in bone marrow samples of patients affected by this tumor, in which we observed indeed a strong CD56 expression in the CD45-tumor cells, along with CD81 and CD9 expression (both included in our panel). Regarding NG2 (neuron glia antigen-2), it has been associated with germ cell tumors (Ferreira-Facioet et al., 2013). On the subject of CD99, this antigen is expressed on many neoplasms, including Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumor, T-andB-lymphoblastic leukemias/lymphomas, desmoplastic small round cell tumor, mesenchymal chondrosarcoma and rhabdomyosarcoma, among others. The strong expression of CD99 on a CD45- cell population is abnormal and suggestive of a nonhematopoietic neoplasm. Although CD71 is not a common tumor marker, it is upregulated in proliferating cells (such as tumor cells), and is also expressed by normal mesothelium (Suassuna, Neves, Hartley, Ogg, & Cameron, 1994). Regarding CD10, its expression has been documented in clear cell renal cell carcinoma, hepatocellular carcinoma, some gynecologic tumors, and germ cell tumor (Devoe & Weidner, 2000; Ferreira-Facioet et al., 2013; Ganju, Sunday, Tsarwhas, Card, & Shipp, 1994).

Some groups have previously proposed different panels to identify nonhematopoietic neoplasms by FC. Pillai et al., proposed a simplified panel that included CD45, CD14 and EpCAM, with a sensitivity and specificity comparable to cytology (Pillai et al., 2013). Chang et al., suggests the inclusion of cytokeratin, CD56, EpCAM, myogenin and CD99 in the panel (Chang et al., 2003). Regarding myogenin, a protein expressed in early fetal skeletal muscle differentiation, is a highly sensitive and specific marker for the diagnosis of rhabdomyosarcomas (Kumar, Perlman, Harris, Raffeld, & Tsokos, 2000). Kentrou et al. proposed a panel that included EpCAM, CD56, CD71 and EMA (Epithelial Membrane Antigen, MUC1) (Kentrou et al., 2011). EMA expression has been detected in carcinomas, mesothelioma, and mesothelial cells (Hjerpe et al., 2015). According to Dong et al., the inclusion of EpCAM, EMA, CD14, and CD45 in the panel would be sufficient for diagnostic purposes (Dong, Holth, Bemer, Davidson, & Risberg, 2007). In addition, Davidson et al. proposes a panel that includes EpCAM, N-cadherin, CD45, and CD14 to address the characterization of malignant non-hematological effusions, along with antibodies against EMA, B72.3 (TAG-72), AH6 (Lewis^x antigen) and HB-Tn(Tn carbohydrate

TABLE 3 Description of the 101 samples

ID	Gender	Age	Type	OM%	PA	PA-t	IHC	FC%	Other antigens	CT	Final diagnosis
1	Male	91	Pleural	45	Neg	6		6.7 ^a		Pos	AML
2	Female	45	Pleural	85	Pos	8	EpCAM+	3	CD71/CD81/CD9	Pos	Breast carcinoma
3	Female	51	Pleural	70	Pos	2	EpCAM+	0.3	CD81/CD9	Pos	Breast carcinoma
4	Female	91	Pleural	30	Pos	1	EpCAM+	1.6	CD10	Pos	Breast carcinoma
5	Male	53	Ascitic	20	Pos	1	EpCAM+	0.02		Pos	Carcinoma of unknown primary
6	Female	82	Ascitic	12	Pos	4	EpCAM+	1.52		Neg	Cholangiocarcinoma
7	Male	66	Pleural	68	Pos	12	EpCAM-	0		Pos	Cholangiocarcinoma
8	Male	72	Pleural	40	Neg	12		4 ^a		Pos	CLL
9	Female	85	Ascitic	4	Neg	4	EpCAM+	0.11		Pos	Colon carcinoma
10	Female	75	Ascitic	15	Pos	8	EpCAM+	1.3		Pos	Colon carcinoma
11	Male	57	Pleural	3	Neg	3		18 ^a		Pos	DLBCL
12	Male	66	Pleural	58	Pos	11	EpCAM+	0.65		Pos	Esophagus carcinoma
13	Male	73	Pleural	20	Pos	1	EpCAM+	4.9		Pos	Follicular thyroid carcinoma
14	Female	86	Ascitic	6	Pos	4	EpCAM+	3.27		Pos	Gastric carcinoma
15	Male	71	Pleural	30	Pos	5	EpCAM+	0.46		Pos	Gastric carcinoma
16	Male	71	Pleural	25	Pos	10	EpCAM+	0.48		Pos	Gastric carcinoma
17	Female	89	Pleural	8	Neg	7	EpCAM-	0		Pos	Mesothelioma
18	Male	42	Pleural	60	Neg	11	EpCAM-	0		Pos	Mesothelioma
19	Male	74	Pleural	16	Neg	6	EpCAM-	0		Pos	Mesothelioma
20	Male	73	Pleural	20	Pos	7	EpCAM-	0		Pos	Mesothelioma
21	Male	86	Pleural	6	Neg	6		0		Pos	Non-biopsied lung cancer
22	Male	76	Ascitic	15	Pos	1	EpCAM+	0.31		Pos	Non-biopsied lung cancer
23	Female	93	Pleural	50	Neg	3	EpCAM+ (focal)	2.6	CD56/CD71/ CD81/CD9	Pos	NSCLC
24	Female	90	Pleural	4	Neg	5	EpCAM+ (focal)	0		Pos	NSCLC
25	Male	88	Pleural	50	Neg	6	EpCAM+ (focal)	0.16		Pos	NSCLC
26	Male	79	Pleural	29	Neg	6	EpCAM+ (focal)	0		Pos	NSCLC
27	Male	67	Pleural	32	Pos	5	EpCAM-	0		Pos	NSCLC
28	Male	70	Pleural	30	Pos	12	EpCAM+	3		Pos	NSCLC
29	Female	63	Pleural	2	Pos	5	EpCAM+	0.2		Pos	NSCLC
30	Male	63	Pleural	40	Pos	7	EpCAM+	3.02		Pos	NSCLC
31	Female	71	Pleural	81	Pos	4	EpCAM+	5.35		Pos	NSCLC
32	Female	73	Pleural	30	Pos	5	EpCAM+	0.25		Pos	NSCLC
33	Male	67	Pleural	50	Pos	10	EpCAM+	4.6		Pos	NSCLC
34	Male	55	Pleural	18	Pos	7	EpCAM-	0		Pos	NSCLC
35	Male	65	Pleural	27	Pos	2	EpCAM+	15	CD9	Pos	NSCLC
36	Female	57	Pleural	9	Pos	4	EpCAM+	0.3		Pos	NSCLC
37	Male	54	Pleural	15	Pos	9	EpCAM+	1.6		Pos	NSCLC
38	Male	68	Pleural	10	Pos	1	EpCAM+	0.19		Pos	NSCLC
39	Male	90	Pleural	10	Pos	4	EpCAM+	0.07		Pos	NSCLC
40	Male	63	Pleural	31	Pos	4	EpCAM+	4.64		Pos	NSCLC
41	Male	70	Pleural	32	Pos	9	EpCAM+	26		Pos	NSCLC
42	Male	72	Pleural	61	Pos	9	EpCAM+	17.5		Neg	NSCLC
43	Female	37	Pleural	40	Pos	7	EpCAM+	1.24		Pos	NSCLC
44	Male	79	Pleural	21	Pos	2	EpCAM+	7		Pos	NSCLC
45	Female	66	Pleural	40	Pos	7	EpCAM+	2.29		Pos	NSCLC
46	Male	80	Ascitic	18	Pos	6	EpCAM+	0.6		Pos	NSCLC

(Continues)

TABLE 3 (Continued)

ID	Gender	Age	Type	OM%	PA	PA-t	IHC	FC%	Other antigens	CT	Final diagnosis
47	Male	79	Ascitic	16	Pos	6	EpCAM+	0.6		Pos	NSCLC
48	Male	63	Ascitic	15	Pos	12	EpCAM+	0.9		Pos	NSCLC
49	Male	77	Ascitic	45	Pos	6	EpCAM+	10.4		Pos	NSCLC
50	Female	69	Ascitic	2	Neg	4	EpCAM+	0		Pos	Ovarian serous carcinoma
51	Female	61	Ascitic	14	Neg	3	EpCAM-	0		Pos	Ovarian serous carcinoma
52	Male	69	Ascitic	20	Neg	6	EpCAM+	0.23		Pos	Ovarian serous carcinoma
53	Female	88	Ascitic	90	Pos	2	EpCAM+ (focal)	5	CD9	Pos	Ovarian serous carcinoma
54	Female	82	Ascitic	2	Pos	6	EpCAM+	4	CD9	Pos	Ovarian serous carcinoma
55	Female	82	Ascitic	38	Pos	6	EpCAM+	4	CD9	Pos	Ovarian serous carcinoma
56	Female	73	Ascitic	15	Pos	5	EpCAM+	2.83	CD56	Neg	Ovarian serous carcinoma
57	Female	73	Ascitic	29	Pos	11	EpCAM+	5.92	CD56	Pos	Ovarian serous carcinoma
58	Female	73	Ascitic	23	Pos	7	EpCAM+	14.96	CD56	Pos	Ovarian serous carcinoma
59	Female	70	Pleural	5	Pos	6	EpCAM-	0		Pos	Ovarian serous carcinoma
60	Female	63	Ascitic	6	Pos	8	EpCAM-	0		Pos	Ovarian serous carcinoma
61	Female	80	Ascitic	40	Pos	3	EpCAM+	4.83		Pos	Ovarian serous carcinoma
62	Female	63	Ascitic	14	Pos	5	EpCAM+	0		Pos	Ovarian serous carcinoma
63	Male	70	Ascitic	10	Pos	7	EpCAM+	1		Pos	Pancreatic carcinoma
64	Female	62	Ascitic	15	Pos	3	EpCAM+	3.65	CD81/CD9	Pos	Pancreatic carcinoma
65	Female	86	Ascitic	20	Pos	7	EpCAM+	1		Pos	Peritoneal serous carcinoma
66	Female	82	Ascitic	90	Pos	5	EpCAM+	4	CD9	Pos	Peritoneal serous carcinoma
67	Female	63	Pleural	4	Neg	3	EpCAM-	0		Pos	Poorly differentiated gastric carcinoma
68	Male	64	Pleural	3	Neg	7	EpCAM-	0		Pos	Poorly differentiated larynx carcinoma
69	Male	62	Pleural	8	Pos	3	EpCAM-	0	CD56/CD99	Pos	Primary lung sarcoma
70	Male	73	Pleural	12	Neg	3	EpCAM+	0.56		Pos	SCLC
71	Male	68	Pleural	47	Pos	7	EpCAM+	14.55	CD56	Pos	SCLC
72	Male	66	Ascitic	2	Pos	6	EpCAM+	5	CD9	Pos	Urothelial carcinoma
73	Male	73	Pleural	80	Pos	12	EpCAM-	0		Pos	Urothelial carcinoma
74	Female	71	Ascitic	5	Neg	8		0		Neg	Abdominal surgery
75	Male	55	Pleural	4	Neg	2		0		Neg	Cirrhosis
76	Female	86	Ascitic	8	Neg	4		0		Neg	Cirrhosis
77	Female	62	Ascitic	9	Neg	10		0		Neg	Cirrhosis
78	Male	70	Ascitic	8	Neg	4		0		Neg	Cirrhosis
79	Male	82	Ascitic	6	Neg	3		0		Neg	Cirrhosis
80	Male	82	Pleural	1	Neg	4		0		Neg	Congestive heart failure
81	Male	68	Pleural	4	Neg	5		0		Neg	Congestive heart failure
82	Male	89	Pleural	5	Neg	7		0		Neg	Congestive heart failure
83	Male	76	Pleural	4	Neg	5		0		Neg	Congestive heart failure
84	Male	64	Pleural	4	Neg	5		0		Neg	Congestive heart failure
85	Female	63	Pleural	4	Neg	2		0		Neg	Congestive heart failure
86	Male	42	Pleural	1	Neg	4		0		Neg	Congestive heart failure
87	Female	73	Pleural	0	Neg	12		0		Neg	Congestive heart failure
88	Male	62	Pleural	16	Neg	5		0		Neg	Eosinophilic pleural effusion
89	Male	81	Pleural	30	Neg	5		0		Pos	Lymph node tuberculosis
90	Male	73	Pleural	2	Neg	5		0		Neg	Pharmacological
91	Female	65	Pleural	5	Neg	7		0		Neg	Pleuritis
92	Male	83	Pleural	4	Neg	4		0		Neg	Pneumonia

TABLE 3 (Continued)

ID	Gender	Age	Type	OM%	PA	PA-t	IHC	FC%	Other antigens	CT	Final diagnosis
93	Male	60	Pleural	6	Neg	5		0		Neg	Pneumonia
94	Female	80	Pleural	5	Neg	4		0		Neg	Pneumonia
95	Male	65	Pleural	40	Neg	3		0		Neg	Pneumonia
96	Male	59	Pleural	25	Neg	3		0		Neg	Pneumonia
97	Male	48	Pleural	4	Neg	2		0		Neg	Polytrauma
98	Female	73	Ascitic	2	Neg	1		0		Neg	Portal hypertension
99	Female	43	Pleural	2	Neg	4		0		Neg	Pulmonary hypertension
100	Male	67	Pleural	2	Neg	5		0		Neg	Thoracic surgery
101	Female	63	Pleural	2	Neg	7		0		Neg	Thoracic surgery

Abbreviations: AML, acute myeloid leukemia; Pos, positive; CLL, chronic lymphocytic leukemia; CT, signs of neoplastic infiltration associated with malignant effusion diagnosed by computed tomography; DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma; FC%, percentage of CD45-/EpCAM + events detected by cytometry; Final diagnosis, diagnosis made according to the clinical course and the complementary studies; IHC, immunohistochemistry positivity for EpCAM performed on liquid sample and/or biopsy; Neg, negative; NSCLC, non-small cell lung carcinoma; OM%, percentage of cellular atypia calculated by counting the number of atypical cells within 100 nucleated cells; Other antigens, lists the non-EpCAM positive antigens; PA, cytology performed in the Pathology laboratory; PA-t, turnaround time in days for PA; SCLC, small cell lung cancer.

^aHematopoietic neoplasms in which EpCAM is negative.

TABLE 4 Phenotypic profiles in diverse non-hematological neoplasms

	CD45	EpCAM	CD10	CD56	CD71	CD81	CD9
Most carcinomas	-	+	-	-	-	-	-
Non-small cell lung carcinoma	-	+	-	-/+	-/+	-/+	-/+
Ovarian serous carcinoma	-	+	-	-/+	-	-	-/+
Breast carcinoma	-	+	-/+	-	-/+	+/-	+/-
Pancreatic carcinoma	-	+	-	-	-	-/+	-/+
Peritoneal serous carcinoma	-	+	-	-	-	-	-/+
Small cell lung cancer	-	+	-	-/+	-	-	-
Urothelial carcinoma	-	+	-	-	-	-	-/+
Primary lung sarcoma	-	-	-	+	-	-	+

antigen) (Davidson, 2016). According to this author, carcinoma cells expressed 3 of the 4 epithelial markers (EpCAM, B72.3, AH6 and HB-Tn) in 77% of the cases studied.

Interestingly, a recent work reported that, in addition to lacking CD45, nonhematological neoplasms frequently expressed CD56, CD117, or CD138 (Annunziata et al., 2020). In this context, CD138 is a robust marker of epithelial differentiation, and the expression of this antigen has been reported in several non-hematological, nonepithelial tumors (such as melanoma, leiomyosarcoma, synovial sarcoma, epithelioid sarcomas, gastrointestinal stromal tumors, and malignant epithelioid schwannomas) (O'Connell, Pinkus, & Pinkus, 2004). Accordingly, CD138 was useful to distinguish between carcinoma and mesothelioma (Saqi et al., 2005). Regarding CD117, it can be expressed (along with CD56, CD99, and CD90) in Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumor (Chang et al., 2003). CD117 expression strongly correlates with a high-grade carcinoma (small cell or large cell neuroendocrine carcinoma), being absent in carcinoid tumors, and they used this marker as an adjunct to CD56, as their coexpression in the context of non-hematological neoplasms is a defining feature of neuroendocrine differentiation (Annunziata et al., 2020).

On the matter of the further classification of the malignant effusion, according to Pillai et al. (2013), the inclusion of additional markers in the panel would allow the determination of the tissue of origin of the neoplasm.

Mesothelial cells (MCs) coat the surface of viscera and the parietal walls of cavities, secreting a lubricant that prevents friction between organs. Normally low percentages of MCs are found in serous fluids (pleural, ascites, pericardial), but the percentage of these cells can increase in inflammatory processes, which adds difficulty to the liquid analysis due to its morphological resemblance with the malignant cells. Although MCs express a wide range of phenotypic markers, such as vimentin, cytokeratins, E-cadherin, N-cadherin, calretinin, Zo-1, β -catenin, Wilm's tumor protein 1 (WT1), mesothelin and podoplanin (Kawanishi, 2016), the information and the reagents available to identify mesothelioma and normal mesothelial cells by FC are very scarce. In this regard, CD200 makes it possible to identify and separate MCs easily by their high intensity expression (Li, Wang, & Asahina, 2013; Lua, & Asahina 2016; Lua, Li, Pappoe, & Asahina, 2015), being able to focus the analysis on positive EpCAM events. Aside from CD200, markers such as WT-1 and calretinin have

been used to identify and exclude mesothelial cells from the analysis, and CD71 is also expressed by reactive mesothelial cells, along with desmin (Kentrou et al., 2011).

Moreover, it has been reported that mesothelioma is negative for EpCAM, thus this antigen is also useful for distinguishing mesothelioma from carcinoma (Chang et al., 2003; Robinson & Royston, 1993; Soosay, Griffiths, Papadaki, Happerfield, & Bobrow, 1991). Nevertheless, it is worth noting that FC is unable to conclusively determine whether the epithelial cells detected in the sample are malignant or not. According to a work by Pillai et al. (2013), a proliferation marker such as Ki-67 or DNA content analysis for aneuploidy can be used in flow cytometry to differentiate between reactive and malignant epithelial cells, keeping in mind that some reactive mesothelial cells can show a high proliferation index or aneuploidy.

While hematopoietic elements occupy well-established regions in the forward versus side scatter plot, epithelial elements are variable in size and cytoplasmic complexity, which determines its presence in any region of the scatter plot. Interestingly, many of the EpCAM-positive events are found in the debris region. It is assumed that these EpCAM events represent fragmented tumor cells (Pillai & Dorfman, 2016) or extracellular vesicles containing antigen from the parent cell (Roca et al., 2016). In this regard, it has been suggested that preparing cells for FC on ice with gentle manipulation might keep the malignant cells intact (Pillai et al., 2013).

Regarding the weak correlation between the percentage of cellular atypia found by conventional cytology and the CD45-/EpCAM+ events reported by FC, it could be due to several reasons, one of them being the fact that the smear is performed as soon as the sample arrives the laboratory, thus the count is based on the total number of nucleated intact cells, while FC is typically done two or more hours after the cell count, and CD45-/EpCAM+ events are reported on the total number of events, incorporating nucleated, non-nucleated, intact and fragmented cells.

Finally, another factor to consider is the downregulation of EpCAM expression during epithelial-mesenchymal transition (EMT). EMT is a process that modifies the adhesion molecules expressed by the cell, allowing it to adopt a migratory and invasive behavior. The reverse of this process, mesenchymal-epithelial transition (MET), is associated with a loss of this migratory freedom. In the context of malignancy, EMT is the dissociation of carcinoma cells from primary carcinomas, which subsequently migrate and disseminate to distant sites; and MET is the cessation of migration, inducing the same cells to proliferate and seed the new tumor. The experimental models tend to consider a dramatic change in the expression of selected epithelial and mesenchymal markers to confirm EMT: E-cadherin, occludins, and cytokeratins are the most commonly used markers for the epithelial trait and N-cadherin and vimentin for the mesenchymal. In recent years, it has been seen that there is a greater flexibility in this transitional process, and cells are no longer thought to oscillate between the full epithelial and full mesenchymal states, but rather, they move through a spectrum of intermediary phases (Nieto, Huang, Jackson, & Thiery, 2016). Accordingly, cells could linger in intermediary stages, and may frequently undergo a partial EMT trait. Whereas many

studies use the co-expression of epithelial and mesenchymal markers to define the hybrid state, in an analysis of 43 ovarian cancer cell lines, only 50% of cells with an intermediate phenotype (coexpressing cytokeratin and vimentin) induced N-cadherin (Huang et al., 2013).

Being aware of the heterogeneity of the intermediate states of EMT, and taking into account that carcinomatous cells can lose EpCAM expression due to this process (Hyun et al., 2016), it is possible to explain why some malignant effusions with positive conventional cytology (May-Grünwald-Giemsa staining) and/or PAP-cytology/IHC have negative FC results. It has been suggested that using EpCAM antibodies against different epitopes of the molecule would increase the chance of its detection in metastatic carcinoma effusions (Carneiro et al., 2019). In addition, some poorly differentiated epithelial tumors downregulate the expression of EpCAM (Pillai et al., 2013), potentially leading to contradictory data between FC and cytology. On the contrary, the contradictory negative cytology and positive FC results in some effusions can be due to the greater number of events analyzed (100 to 200 in cytology vs. up to one million in FC).

To conclude, in routine work some cytological examinations are reported as suspicious or atypical based on certain characteristics (Figure 2), but this information is not sufficient for a diagnosis, because for the clinical decision, these results are considered negative. Our data show that by incorporating FC to routine diagnostic workup of nonhematological neoplasms it is possible to quickly analyze a serous fluid in suspicious cases, allowing the detection of cells which can be labeled as positive with a greater degree of confidence.

FC is a useful ancillary test for cytological examination, providing faster results when compared to immunohistochemical staining, being able to identify those malignant cells that were not detected with a cytological exam alone. The combined use of both techniques improves overall diagnostic accuracy.

ORCID

Jhonatan Wong-Arteta  <https://orcid.org/0000-0002-4100-4476>

REFERENCES

- Acosta, M., Pereira, J., & Arro, M. (2016). Screening of carcinoma metastasis by flow cytometry: A study of 238 cases. *Cytometry. Part B, Clinical Cytometry*, 90(3), 289–294.
- Annunziata, J., Miller, M. L., Park, D. C., Vlad, G., Bhagat, G., & Aloheid, B. (2020). Detection of nonhematologic neoplasms by routine flow cytometry analysis. *American Journal of Clinical Pathology*, 153(1), 99–104.
- Becker, G., Galandi, D., & Blum, H. E. (2006). Malignant ascites: Systematic review and guideline for treatment. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 42(5), 589–597.
- Carneiro, F. P., Muniz-Junqueira, M. I., De Vasconcelos, C. M., De Araújo, O. Í., Soares, A. C., De Vargas, H. N., ... Motoyama, A. B. (2019). Anti-EpCAM antibodies for detection of metastatic carcinoma in effusions and peritoneal wash. *Oncology Letters*, 18(2), 2019–2024.
- Chang, A., Benda, P. M., Wood, B. L., & Kussick, S. J. (2003). Lineage-specific identification of nonhematopoietic neoplasms by flow cytometry. *American Journal of Clinical Pathology*, 119(5), 643–655.
- Davidson, B. (2016). Malignant nonhematological effusion characterization by flow cytometry. *Acta Cytologica*, 60(4), 365–371.

- Devoe, K., & Weidner, N. (2000). Immunohistochemistry of small round-cell tumors. *Seminars in Diagnostic Pathology*, 17(3), 216–224.
- Dong, H. P., Holth, A., Berner, A., Davidson, B., & Risberg, B. (2007). Flow cytometric immunophenotyping of epithelial cancer cells in effusions—Technical considerations and pitfalls. *Cytometry. Part B, Clinical Cytometry*, 72B(5), 332–343.
- Dorwal, P., Moore, H., Stewart, P., Harrison, B., & Monaghan, J. (2018). CD326 (EpCAM) testing by flow cytometric BerEP4 antibody is a useful and rapid adjunct to histopathology. *Cytometry. Part B, Clinical Cytometry*, 94(3), 536–541.
- Ferreira-Facio, C. S., Milito, C., Botafogo, V., Fontana, M., Thiago, L. S., Oliveira, E., ... Costa, E. S. (2013). Contribution of multiparameter flow cytometry immunophenotyping to the diagnostic screening and classification of pediatric cancer. *PLoS ONE*, 8(3), e55534.
- Fetsch, P. A., & Abati, A. (2001). Immunocytochemistry in effusion cytology: A contemporary review. *Cancer*, 93(5), 293–308.
- Ganju, R. K., Sunday, M., Tsarwhas, D. G., Card, A., & Shipp, M. A. (1994). CD10/NEP in non-small cell lung carcinomas. Relationship to cellular proliferation. *The Journal of Clinical Investigation*, 94(5), 1784–1791.
- Hjerpe, A., Ascoli, V., Bedrossian, C. W. M., Boon, M. E., Creaney, J., Davidson, B., ... Papanicolaou Society of Cytopathology. (2015). Guidelines for the cytopathologic diagnosis of epithelioid and mixed-type malignant mesothelioma. *Acta Cytologica*, 59(1), 2–16.
- Hodge, C., & Badgwell, B. D. (2019). Palliation of malignant ascites. *Journal of Surgical Oncology*, 120(1), 67–73.
- Huang, R. Y.-J., Wong, M. K., Tan, T. Z., Kuay, K. T., Ng, A. H. C., Chung, V. Y., ... Thiery, J. P. (2013). An EMT spectrum defines an anoikis-resistant and spheroidogenic intermediate mesenchymal state that is sensitive to e-cadherin restoration by a src-kinase inhibitor, saracatinib (AZD0530). *Cell Death & Disease*, 4(11), e915–e915.
- Hyun, K.-A., Koo, G.-B., Han, H., Sohn, J., Choi, W., Kim, S.-I., ... Kim, Y. S. (2016). Epithelial-to-mesenchymal transition leads to loss of EpCAM and different physical properties in circulating tumor cells from metastatic breast cancer. *Oncotarget*, 7(17), 24677–24687.
- Kawanishi, K. (2016). Diverse properties of the mesothelial cells in health and disease. *Pleura and Peritoneum*, 1(2), 79–89.
- Kebenko, M., Goebeler, M.-E., Wolf, M., Hasenburger, A., Seggewiss-Bernhardt, R., Ritter, B., ... Fiedler, W. (2018). A multicenter phase 1 study of solitomab (MT110, AMG 110), a bispecific EpCAM/CD3 T-cell engager (BiTE®) antibody construct, in patients with refractory solid tumors. *Oncoimmunology*, 7(8), e1450710.
- Kentrou, N. A., Tsagarakis, N. J., Tzanetou, K., Damala, M., Papadimitriou, K. A., Skoumi, D., ... Paterakis, G. (2011). An improved flow cytometric assay for detection and discrimination between malignant cells and atypical mesothelial cells, in serous cavity effusions. *Cytometry. Part B, Clinical Cytometry*, 80B(5), 324–334.
- Kumar, S., Perlman, E., Harris, C. A., Raffeld, M., & Tsokos, M. (2000). Myogenin is a specific marker for rhabdomyosarcoma: An immunohistochemical study in paraffin-embedded tissues. *Modern Pathology*, 13(9), 988–993.
- Kussick, S. J., Wood, B. W., & Li, Y. (2001). Using antibodies to CD56 and CD45 to identify nonhematopoietic small blue round cell tumors by flow cytometry. *American Journal of Clinical Pathology*, 116, 279.
- Lepus, C. M., & Vivero, M. (2018). Updates in effusion cytology. *Surgical Pathology Clinics*, 11(3), 523–544.
- Li, Y., Wang, J., & Asahina, K. (2013). Mesothelial cells give rise to hepatic stellate cells and myofibroblasts via mesothelial-mesenchymal transition in liver injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(6), 2324–2329.
- Litvinov, S. V., Velders, M. P., Bakker, H. A., Fleuren, G. J., & Warnaar, S. O. (1994). Ep-CAM: A human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule. *The Journal of Cell Biology*, 125(2), 437–446.
- Lua, I., & Asahina, K. (2016). The role of Mesothelial cells in liver development. *Injury, and Regeneration Gut Liver*, 10(2), 166–176.
- Lua, I., Li, Y., Pappoe, L. S., & Asahina, K. (2015). Myofibroblastic conversion and regeneration of mesothelial cells in peritoneal and liver fibrosis. *The American Journal of Pathology*, 185(12), 3258–3273.
- Maetzel, D., Denzel, S., Mack, B., Canis, M., Went, P., Benk, M., ... Gires, O. (2009). Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. *Nature Cell Biology*, 11(2), 162–171.
- Merino, A. (2020). In Citología de líquidos biológicos (serosos y cefalorraquídeo) y su utilidad diagnóstica. (Ed.), *Manual de Citología de Sangre Periférica y Líquidos Biológicos, 2nd Ed.* (pp. 221–222). Editorial Médica Panamericana S.A. <https://www.medicapanamericana.com/es/libro/Manual-de-Citologia-de-sangre-periferica-y-Liquidos-Biologicos-incluye-version-digital>.
- Metzgeroth, G., Kuhn, C., Schultheis, B., Hehlmann, R., & Hastka, J. (2008). Diagnostic accuracy of cytology and immunocytochemistry in carcinomatous effusions. *Cytopathology*, 19(4), 205–211.
- Nieto, M. A., Huang, R. Y.-J., Jackson, R. A., & Thiery, J. P. (2016). EMT: 2016. *Cell*, 166(1), 21–45.
- O'Connell, F. P., Pinkus, J. L., & Pinkus, G. S. (2004). CD138 (syndecan-1), a plasma cell marker immunohistochemical profile in hematopoietic and nonhematopoietic neoplasms. *American Journal of Clinical Pathology*, 121(2), 254–263.
- Patriarca, C., Macchi, R. M., Marschner, A. K., & Mellstedt, H. (2012). Epithelial cell adhesion molecule expression (CD326) in cancer: A short review. *Cancer Treatment Reviews*, 38(1), 68–75.
- Pillai, V., Cibas, E. S., & Dorfman, D. M. (2013). A simplified flow cytometric immunophenotyping procedure for the diagnosis of effusions caused by epithelial malignancies. *American Journal of Clinical Pathology*, 139(5), 672–681.
- Pillai, V., & Dorfman, D. M. (2016). Flow cytometry of nonhematopoietic neoplasms. *Acta Cytologica*, 60(4), 336–343.
- Robinson, R. J., & Royston, D. (1993). Comparison of monoclonal antibodies Aua1 and Ber Ep4 with anti-CEA for detecting carcinoma cells in serous effusions and distinguishing them from mesothelial cells. *Cytopathology*, 4(5), 267–271.
- Roca, E., Lacroix, R., Judicone, C., Laroumagne, S., Robert, S., Cointe, S., ... Dignat-George, F. (2016). Detection of EpCAM-positive microparticles in pleural fluid: A new approach to mini-invasively identify patients with malignant pleural effusions. *Oncotarget*, 7(3), 3357–3366.
- Saqi, A., Yun, S. S., Yu, G. H., Alexis, D., Taub, R. N., Powell, C. A., & Borczuk, A. C. (2005). Utility of CD138 (syndecan-1) in distinguishing carcinomas from mesotheliomas. *Diagnostic Cytopathology*, 33(2), 65–70.
- Schmelzer, E., & Reid, L. M. (2008). EpCAM expression in normal, non-pathological tissues. *Frontiers in Bioscience: A Virtual Library of Medicine*, 13, 3096–3100.
- Soosay, G. N., Griffiths, M., Papadaki, L., Happerfield, L., & Bobrow, L. (1991). The differential diagnosis of epithelial-type mesothelioma from adenocarcinoma and reactive mesothelial proliferation. *The Journal of Pathology*, 163(4), 299–305.
- Suassuna, J. H. R., Neves, F. C. D., Hartley, R. B., Ogg, C. S., & Cameron, J. S. (1994). Immunohistochemical studies of the peritoneal membrane and infiltrating cells in normal subjects and in patients on CAPD. *Kidney International*, 46(2), 443–454.
- van Bussel, M. T. J., Pluim, D., Bol, M., Beijnen, J. H., Schellens, J. H. M., & Brandsma, D. (2018). EpCAM-based assays for epithelial tumor cell detection in cerebrospinal fluid. *Journal of Neuro-Oncology*, 137(1), 1–10.
- Villena Garrido, V., Cases Viedma, E., Fernández Villar, A., de Pablo, G. A., Pérez Rodríguez, E., Porcel Pérez, J. M., ... Valdés Cuadrado, L. (2014). Recommendations of diagnosis and treatment of pleural effusion. Update. *Archivos de Bronconeumología*, 50(6), 235–249.
- Wang, F., Yang, L., Gao, Q., Huang, L., Wang, L., Wang, J., ... Zhang, Y. (2015). CD163+CD14+ macrophages, a potential immune biomarker for malignant pleural effusion. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 64(8), 965–976.

- Wenqi, D., Li, W., Shanshan, C., Bei, C., Yafei, Z., Feihu, B., ... Daiming, F. (2009). EpCAM is overexpressed in gastric cancer and its downregulation suppresses proliferation of gastric cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 135(9), 1277–1285.
- Went, P. T., Lugli, A., Meier, S., Bundi, M., Mirlacher, M., Sauter, G., & Dimhofer, S. (2004). Frequent EpCam protein expression in human carcinomas. *Human Pathology*, 35(1), 122–128.
- Winter, M. J., Nagelkerken, B., Mertens, A. E. E., Rees-Bakker, H. A. M., Briare-de Bruijn, I. H., & Litvinov, S. V. (2003). Expression of Ep-CAM shifts the state of cadherin-mediated adhesions from strong to weak. *Experimental Cell Research*, 285(1), 50–58.
- Wong-Arteta, J., Gil-Rodríguez, E., Cabezon-Vicente, R., Bereciartua-Urbieto, E., & Bujanda, L. (2019). High fluorescence cell count in pleural fluids for malignant effusion screening. *Clinica Chimica Acta. International Journal of Clinical Chemistry*, 499, 115–117.
- Wong-Arteta, J., Merino, A., Torrente, S., Banales, J. M., & Bujanda, L. (2018). High fluorescence cell count in ascitic body fluids for carcinoma screening. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 56(11), 272–274.
- Yu, G. H., Glaser, L. J., & Gustafson, K. S. (2019). Role of ancillary techniques in fluid cytology. *Acta Cytologica*, 24, 1–11.

How to cite this article: 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*. 2020;1–12. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21886>