

REVISTA O UNIVERSO OBSERVÁVEL

**COMPARACIÓN DE LOS PROTOCOLOS DE CITOMETRÍA DE
FLUJO CONVENCIONAL Y EUROFLOW PARA LA DETECCIÓN DE
ENFERMEDAD RESIDUAL MÍNIMA EN LA LEUCEMIA
LINFOBLÁSTICA AGUDA DE CÉLULAS B PEDIÁTRICA**

**COMPARISON OF EUROFLOW AND CONVENTIONAL FLOW
CYTOMETRY PROTOCOLS FOR MINIMAL RESIDUAL DISEASE
DETECTION IN PEDIATRIC B-CELL ACUTE LYMPHOBLASTIC
LEUKEMIA**

Mamani C., William¹
Maldonado N., Katherine²

Revista o Universo Observável

DOI: 10.69720/29660599.2025.000254

ISSN: 2966-0599

¹Universidad Continental.

E-mail: wmamanic@contienental.edu.pe

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2388-8340>

²Universidad Nacional De San Agustin.

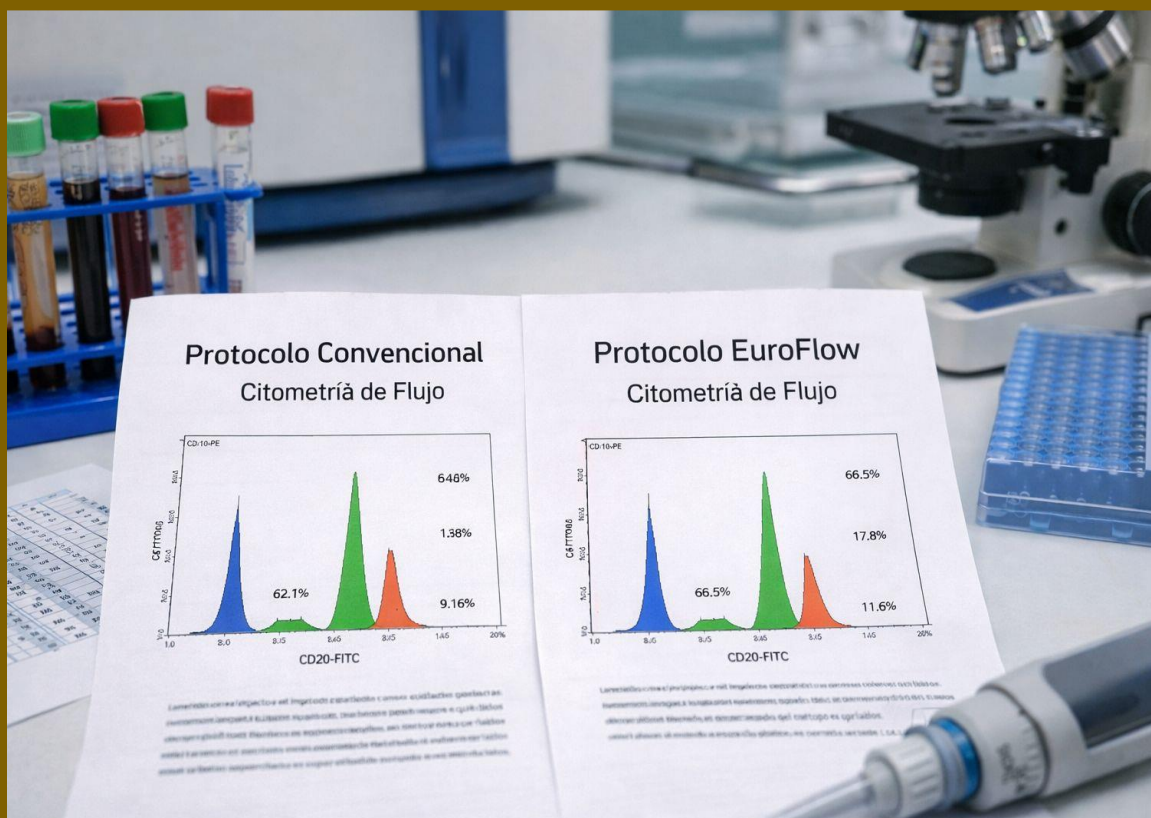
E-mail: kathemaldo@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-3095-2603>



COMPARACIÓN DE LOS PROTOCOLOS DE CITOMETRÍA DE FLUJO CONVENCIONAL Y EUROFLOW PARA LA DETECCIÓN DE ENFERMEDAD RESIDUAL MÍNIMA EN LA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE CÉLULAS B PEDIÁTRICA

Mamani C., William e Maldonado N., Katherine



PERIÓDICO CIENTÍFICO INDEXADO INTERNACIONALMENTE

ISSN

International Standard Serial Number
2966-0599

www.ouniversoobservavel.com.br

Editora e Revista

O Universo Observável

CNPJ: 57.199.688/0001-06

Naviraí – Mato Grosso do Sul

Rua: Botocudos, 365 – Centro

CEP: 79950-000

RESUMEN

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es la neoplasia hematológica maligna más frecuente en la infancia, y su pronóstico está fuertemente relacionado con el seguimiento de la enfermedad mínima residual (ERM). La citometría de flujo (CF) es el estándar de oro para la detección de ERM, pero los métodos varían ampliamente entre laboratorios, lo que a menudo conduce a discrepancias en la sensibilidad y la confiabilidad. Este estudio tuvo como objetivo comparar cuantitativa y cualitativamente dos protocolos de citometría de flujo, el método estandarizado EuroFlow y un protocolo convencional desarrollado en laboratorio, para la detección de ERM en pacientes pediátricos con LLA de células B. Se analizaron un total de 228 muestras de médula ósea de 76 pacientes pediátricos en IREN SUR. Los resultados, comparados con una referencia externa (protocolo INSNSB), mostraron que 35,5 % de los pacientes eran positivos para ERM, predominantemente en los subgrupos de mujeres y niños mayores (11 a 15 años). El protocolo EuroFlow demostró una precisión constante del 100% en todos los estratos de edad y sexo, mientras que el método convencional mostró una precisión disminuida, cayendo al 83,3% en el grupo femenino de 11 a 15 años. Fundamentalmente, ambos protocolos mantuvieron una especificidad (precisión) del 100%. El análisis de correlación indicó una concordancia diagnóstica perfecta para EuroFlow ($\kappa = 1,000$) y una correlación cuantitativa superior con la referencia para linfoblastos B normales ($R = 0,9798$). Estos hallazgos establecen de manera concluyente EuroFlow como el protocolo más confiable y sólido para la detección de ERM en un entorno clínico, recomendando su adopción para estandarizar la práctica diagnóstica y mejorar la predicción de recaídas.

Palabras Clave: leucemia linfoblástica aguda, enfermedad residual mínima, citometría de flujo, EuroFlow, estandarización.

ABSTRACT

Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) is the most frequent hematological malignancy in childhood, and its prognosis is strongly linked to the monitoring of Minimal Residual Disease (MRD). Flow cytometry (FC) is the gold standard for MRD detection, but methods vary widely between laboratories, often leading to discrepancies in sensitivity and reliability. This study aimed to quantitatively and qualitatively compare two flow cytometry protocols—the standardized EuroFlow method and a conventional, laboratory-developed protocol—for MRD detection in pediatric B-cell ALL patients. A total of 228 bone marrow samples from 76 pediatric patients at IREN SUR were analyzed. The results, benchmarked against an external reference (INSNSB protocol), showed that 35.5% of patients were MRD-positive, predominantly in the female and older pediatric (11–15 years) subgroups. The EuroFlow protocol demonstrated a consistent 100% accuracy across all age and sex strata, whereas the conventional method showed diminished accuracy, falling to 83.3% in the female 11–15 years group. Crucially, both protocols maintained 100% specificity (precision). Correlation analysis indicated perfect diagnostic concordance for EuroFlow ($\kappa=1.000$) and superior quantitative correlation with the reference for normal B-lymphoblasts ($R=0.9798$). These findings conclusively establish EuroFlow as the more reliable and robust protocol for MRD detection in a clinical setting, recommending its adoption to standardize diagnostic practice and improve relapse prediction.

Keywords: Acute lymphoblastic leukemia, minimal residual disease, flow cytometry, EuroFlow, standardization.

INTRODUCCIÓN

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) sigue siendo el cáncer más prevalente entre los niños en todo el mundo. Los avances en la quimioterapia multiagente han mejorado drásticamente las tasas de supervivencia a cinco años, que ahora se acercan al 90% en los países de ingresos altos. Sin embargo, la recaída sigue siendo la principal causa de fracaso del tratamiento y mortalidad. La detección precisa y oportuna de células leucémicas residuales, conocida como enfermedad residual mínima (ERM) o enfermedad residual medible (ERM), se reconoce universalmente como el factor pronóstico más crítico en el tratamiento de la LLA [7], [9]. El estado de ERM, generalmente definido por un umbral de $\geq 0,01$ % o 10^{-4} células leucémicas, guía la estratificación del riesgo y los ajustes de intensidad

del tratamiento, particularmente en las fases posteriores a la inducción y la consolidación.

La citometría de flujo multiparamétrica (MFC) se ha convertido en la técnica preferida para el monitoreo de MRD debido a su alta sensibilidad (capaz de detectar de 10^{-4} a 10^{-5} células), velocidad y costo relativamente bajo en comparación con métodos moleculares como la PCR [11]. MFC permite una caracterización precisa de las células leucémicas mediante el análisis simultáneo de múltiples marcadores antigénicos para identificar poblaciones celulares aberrantes e inmaduras. Se basa en la identificación de inmunofenotipos asociados a la leucemia (LAIP) o en el seguimiento de los patrones de expresión aberrantes de los antígenos precursores de células B, como CD10, CD19, CD34 y CD45, para discriminar entre blastos

leucémicos residuales y precursores de células B en regeneración normal [8].

A pesar de su utilidad, un desafío importante en MFC para MRD es la alta variabilidad en los resultados entre laboratorios, a menudo derivada de diferencias en los paneles de anticuerpos, la preparación de muestras, la configuración de compensación y las estrategias de análisis de datos [6]. Para abordar esto, el consorcio europeo EuroFlow desarrolló y validó protocolos altamente estandarizados, robustos y reproducibles. El enfoque EuroFlow exige el uso de combinaciones de anticuerpos de 8 a 12 colores premezcladas y altamente optimizadas, configuración estandarizada del instrumento y control de calidad (utilizando perlas CS&T) y la técnica de "bulklysis" para la preparación de muestras, lo que garantiza una recuperación celular óptima y una variación técnica reducida [10], [12].

Este estudio fue diseñado para proporcionar una validación basada en la evidencia para implementar protocolos estandarizados en un centro oncopediátrico regional. Específicamente, realizamos una comparación directa del protocolo estandarizado EuroFlow con un protocolo no estandarizado de uso convencional para detectar ERM en pacientes pediátricos con LLA de células B en IREN SUR, con el objetivo de determinar qué método proporciona una eficiencia superior en términos de exactitud y precisión frente a un estándar de laboratorio de referencia externo (protocolo INSNSB).

1. METODOLOGÍA O MATERIALES Y METODOS

A. Diseño del estudio y población

Esta investigación empleó un diseño comparativo, transversal a nivel explicativo, analizando las métricas de desempeño de dos protocolos de citometría de flujo. La población de estudio estuvo constituida por pacientes pediátricos (de 3 a 16 años) con diagnóstico confirmado de LLA de células B en seguimiento postratamiento en el Instituto Regional de Enfermedades Neoplásicas del Sur (IREN SUR), Arequipa, Perú.

Se recogieron un total de 228 muestras de médula ósea como duplicados de 76 pacientes durante sus controles rutinarios entre julio de 2023 y junio de 2025. Los criterios de inclusión exigieron un diagnóstico confirmado de LLA de células B y la disponibilidad de aspirado fresco de médula ósea. Los criterios de exclusión incluyeron muestras con celularidad inadecuada o aquellas procesadas más de 24 horas después de la extracción. El protocolo INSNSB sirvió como estándar de oro externo para la validación diagnóstica.

B. Procesamiento de muestras y citometría de flujo

Se recogieron muestras de médula ósea (5-6 ml) en tubos K3 EDTA. Todas las muestras se sometieron a un control de calidad de rutina para determinar la viabilidad celular. Una porción del aspirado de médula ósea se procesó simultáneamente a través de los protocolos convencionales y EuroFlow en IREN SUR, mientras que el duplicado se envió al laboratorio de referencia (INSNSB). Las muestras fueron alícuotas, codificadas y procesadas. El citómetro de flujo FACSCanto II fue validado y preparado diariamente.

1) Protocolo EuroFlow:

El enfoque estandarizado de EuroFlow utilizó un panel optimizado de 8 a 12 colores dirigido a marcadores clave de linaje de células B y LAIP (p. ej., CD10, CD19, CD34, CD38, CD45, CD20, CD81, CD66c/CD123, CD73/CD304). La diferencia técnica crucial fue la implementación de la técnica de Bulklysis. Este método implica un paso de lisis de glóbulos rojos a granel seguido de tinción, que se sabe que maximiza significativamente el número total de eventos recolectados, mejorando el poder estadístico para detectar eventos raros. Se adquirió un mínimo estricto de 1×10^6 eventos utilizando un citómetro de flujo FACSCanto II. El análisis de los datos se realizó utilizando la estrategia estandarizada de compuerta EuroFlow dentro del software Infinicyt.

2) Protocolo convencional:

Este protocolo utilizó un panel de anticuerpos comercial con marcadores similares al panel EuroFlow. Sin embargo, la preparación de muestras se basó en un método tradicional de lisis y lavado, que a menudo da como resultado rendimientos celulares más bajos en comparación con la bulklysis. El objetivo mínimo de adquisición de eventos fue menor, generalmente 5×10^5 eventos. El análisis se realizó manualmente utilizando protocolos de compuerta estándar, que son más susceptibles a la variabilidad entre operadores.

C. Análisis estadístico

El resultado primario fue el estado de ERM, dicotomizado en positivo ($\geq 0,01\%$ de células leucémicas) o negativo ($<0,01\%$ de células leucémicas). Las muestras se estratificaron por grupo de edad (1-5, 6-10 y 11-15 años) y sexo.

Las métricas de rendimiento se calcularon utilizando el resultado de INSNSB como estado verdadero:

Precisión: Mide la proporción de clasificaciones correctas (Verdaderos Positivos + Verdaderos Negativos) en relación con todos los casos:

Exactitud = $(VP + VN) / (VP + VN + FP + FN)$

Precisão (valor predictivo positivo): mide la probabilidad de que un resultado positivo de la prueba sea realmente positivo:

$$\text{Precisión} = (\text{VP}) / (\text{VP} + \text{FP})$$

Concordancia diagnóstica: evaluada mediante el coeficiente Kappa (κ) de Cohen.

Correlación cuantitativa: Evaluada mediante el coeficiente de correlación de Pearson (R).

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Demografía de los pacientes y prevalencia de ERM

Entre los 76 pacientes pediátricos, 27 se clasificaron como positivos para ERM ($\geq 0,01\%$), lo que resultó en una prevalencia general de 35,5 %.

C. Exactitud y análisis de precisión

El rendimiento comparativo con el protocolo de referencia del INSNSB mostró diferencias críticas en la precisión diagnóstica:

Tabla 1. rendimiento comparativo con el protocolo de referencia del INSNSB.

Protocolo	Precisión	Índice
general	(Concordancia Diagnóstica)	
EuroFlow	100%	1.000 (Perfecto)
Convencional	97.37%	0.942 (Casi perfecto)

El protocolo EuroFlow logró una precisión perfecta (100%) en todos los subgrupos de edad y sexo, lo que indica cero falsos negativos (FN). Por el contrario, la precisión del protocolo convencional disminuyó en subgrupos específicos, especialmente al 90% en hombres de 6 a 10 años y al 83,3% en mujeres de 11 a 15 años, debido a la presencia de falsos negativos. Ambos protocolos demostraron una precisión excepcional (100% de valor predictivo positivo) en todos los subgrupos.

D. Coeficientes de correlación

El coeficiente de correlación de Pearson (R) para la detección cuantitativa de linfoblastos B mostró una asociación muy alta para todas las comparaciones ($p < 0,05$). Para los linfoblastos B normales, EuroFlow mostró una correlación superior con el control ($R = 0,9798$) en comparación con el protocolo convencional ($R = 0,9460$).

DISCUSIÓN

El hallazgo principal de este estudio es la superioridad estadística y clínicamente significativa del protocolo EuroFlow en términos de precisión diagnóstica y concordancia. Lograr una precisión del 100% y una concordancia perfecta de Kappa ($\kappa = 1.000$) con el protocolo de referencia estándar de oro posiciona a EuroFlow como el método

Los casos positivos fueron ligeramente más altos en mujeres (14 casos) que en hombres (13 casos). La mayor frecuencia de ERM positiva se observó en el grupo de edad de 6 a 10 años (14 casos) y en el grupo de 11 a 15 años (10 casos).

B. Comparación cuantitativa de protocolos

Se compararon los porcentajes medios ($\bar{X} \pm E.D.$) de linfoblastos B patológicos y normales. Si bien el protocolo EuroFlow arrojó sistemáticamente valores medios ligeramente más altos en todos los subgrupos (patológicos: $28,77 \pm 37,54$ vs. convencionales: $27,85 \pm 36,46$), las pruebas estadísticas no confirmaron diferencias estadísticamente significativas en la detección cuantitativa de blastocitos entre los dos protocolos ($p > 0,05$).

inequívocamente confiable para la detección de ERM en esta cohorte.

La disminución observada en la precisión del protocolo convencional en subgrupos específicos de edad y sexo (por ejemplo, 83,3% en mujeres de 11 a 15 años) es crítica, ya que indica una propensión a generar resultados falsos negativos. En la monitorización de la LLA, un resultado falso negativo conlleva un alto riesgo clínico, lo que puede conducir a errores de tratamiento y recaídas. Las ventajas técnicas de EuroFlow, como la técnica de Bulklysis y las estrategias de activación estandarizadas, son probablemente responsables de su mayor capacidad para detectar de manera confiable las células MRD de baja frecuencia en todas las variaciones demográficas.

Si bien los resultados cuantitativos no mostraron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de blastocitos detectados ($p > 0,05$), la diferencia cualitativa en la precisión diagnóstica es primordial. El estudio valida el impulso internacional para la estandarización en citometría de flujo. La adopción del protocolo EuroFlow puede minimizar significativamente el ruido técnico y maximizar la utilidad clínica de los resultados de la ERM, lo que

lleva a una mejor toma de decisiones clínicas basada en la evidencia.

3. CONCLUSIONES

En relación con el objetivo del artículo o pregunta de investigación. Un párrafo por cada conclusión.

La prevalencia general de enfermedad residual mínima ($\geq 0,01$ %) en la cohorte pediátrica de LLA-B estudiada fue de 35,5 %, con un ligero predominio en los subgrupos de mujeres y niños mayores (11–15 años).

Cuantitativamente, los protocolos EuroFlow y convencionales mostraron porcentajes medios equivalentes de linfoblastos B patológicos, pero solo EuroFlow logró una concordancia diagnóstica estadísticamente perfecta.

CONTRIBUCIÓN DE AUTORÍA

En concordancia con la taxonomía establecida internacionalmente para la asignación de créditos a autores de artículos científicos (<https://credit.niso.org/>). Los autores declaran sus contribuciones en la siguiente matriz:

El protocolo EuroFlow demostró una precisión del 100% y del 100% en todos los estratos de edad y sexo, lo que confirma su confiabilidad superior.

El protocolo convencional mostró una notable disminución de la precisión (tan baja como 83,3%) debido a los resultados falsos negativos, lo que estableció a EuroFlow como el protocolo técnicamente superior y clínicamente más fiable para la detección de ERM en la población de LLA de células B.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que **no existe ningún conflicto de intereses**, financiero, profesional o personal, que pudiera haber influido de manera inapropiada en el desarrollo, análisis o publicación del presente estudio.

	Ma Idonado v. n. n.	N. v. n. n.	Ma mani v. n. n.	C. v. n. n.
Participar activamente en:				
Conceptualización				
Análisis formal				
Adquisición de fondos				
Investigación				
Metodología				
Administración del proyecto				
Recursos				
Redacción –borrador original				
Redacción –revisión y edición				
La discusión de los resultados				
Revisión y aprobación de la versión final del trabajo.				

REFERENCIAS

- ## REFERENCIAS
- [1] Aronoff, S., (1989). Sistemas de información geográfica: una perspectiva de gestión. Ottawa: Publicaciones WDL.
- [2] Álvarez-Zúñiga, C. D., Garza-Veloz, I., Martínez-Rendón, J., Ureño-Segura, M., Delgado-Enciso, I., y Martínez-Fierro, M. L. (2023). Biomarcadores circulantes relacionados con el diagnóstico y pronóstico de la leucemia linfoblástica aguda progenitora de células B. *Cánceres*, 15(16), 4186.
<https://doi.org/10.3390/cancers15164186>.
- [3] Cossarizza, A., Chang, H. D., Radbruch, A., Acs, A., Adam, D., Adam-Klages, S., Agace, W. W., Aghaeepour, N., Akdis, M., Allez, M., Almeida, L. N., Alvisi, G., Anderson, G., Andrä, I., Annunziato, F., Anselmo, A., Bacher, P., Baldari, C. T., Bari, S. Zychlinsky, A. (2019). Directrices para el uso de la citometría de flujo y la clasificación celular en estudios inmunológicos (segunda edición). *Revista Europea de Inmunología*, 49(10), 1457-1973.
<https://doi.org/10.1002/eji.201970107>.
- [4] De Smith, A. J., Jiménez-Morales, S. y Mejía-Aranguré, J. M. (2024). El riesgo genético de

- leucemia linfoblástica aguda y sus implicaciones para los niños de origen latinoamericano. *Fronteras en oncología*, 13. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1299355>.
- [5] Ekpa, Q. L., Akahara, P. C., Anderson, A. M., Adekoya, O. O., Ajayi, O. O., Alabi, P. O., Okobi, O. E., Jaiyeola, O. y Ekanem, M. S. (2023). Una revisión de la leucemia linfocítica aguda (LLA) en la población pediátrica: evaluación de las tendencias actuales y los cambios en las pautas en la última década. *Cureus*, 15(12), e49930. <https://doi.org/10.7759/cureus.49930>.
- [6] Glier, H., Heijnen, I., Hauwel, M., Dirks, J., Quarroz, S., Lehmann, T., Rovo, A., Arn, K., Matthes, T., Hogan, C., Keller, P., Dudkiewicz, E., Stüssi, G. y Fernández, P. (2019). Estandarización de la citometría de flujo de 8 colores en diferentes instrumentos de citómetro de flujo: un estudio de viabilidad en laboratorios clínicos en Suiza. *Revista de Métodos Inmunológicos*, 475, 112348. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2017.07.013>.
- [7] Juárez-Avendaño, G., Méndez-Ramírez, N., Luna-Silva, N. C., Gómez-Almaguer, D., Pelayo, R. y Balandrán, J. C. (2021). Marcadores moleculares y celulares de enfermedad residual medible en la leucemia linfoblástica aguda. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 78(3), 159-170. <https://doi.org/10.24875/BMHIM.20000155>.
- [8] Kruse, A., Abdel-Azim, N., Kim, H. N., Ruan, Y., Phan, V., Ogana, H., Wang, W., Lee, R., Gang, E. J., Khazal, S. y Kim, Y. M. (2020). Detección de enfermedad residual mínima en la leucemia linfoblástica aguda. *Revista internacional de ciencias moleculares*, 21(3), 1054. <https://doi.org/10.3390/ijms21031054>.
- [9] Pieters, R., Mullighan, C. G. y Hunger, S. P. (2023). Avanzar en el diagnóstico y la terapia para alcanzar la cura universal en la LLA infantil. *Revista de oncología clínica: revista oficial de la Sociedad Estadounidense de Oncología Clínica*, 41 (36), 5579-5591. <https://doi.org/10.1200/JCO.23.01286>.
- [10] Theunissen, P., Mejsstrikova, E., Sedek, L., Van der Sluijs-Gelling, A. J., Gaipa, G., Bartels, M., Da Costa, E. S., Kotrová, M., Novakova, M., Sonneveld, E., Buracchi, C., Bonaccorso, P., Oliveira, E., Marvelde, J. G. T., Szczepanski, T., Lhermitte, L., Hrusak, O., Lecrevisse, Q., Grigore, G. E.,... Van der Velden, V. H. J. (2016). Citometría de flujo estandarizada para mediciones de ERM altamente sensibles en leucemia linfoblástica aguda de células B. *Sangre*, 129(3), 347-357. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-07-726307>.
- [11] Van Dongen, J. J. M., Van Der Velden, V. H. J., Brüggemann, M. y Orfao, A. (2015). Diagnóstico de enfermedad residual mínima en la leucemia linfoblástica aguda: necesidad de tecnologías sensibles, rápidas y estandarizadas. *Sangre*, 125(26), 3996-4009. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-03-580027>.
- [12] Verbeek, M. W. C. y van der Velden, V. H. J. (2024). El panorama evolutivo de la monitorización de la enfermedad residual mínima por citometría en la leucemia linfoblástica aguda de precursores de células B. *Revista internacional de ciencias moleculares*, 25(9), 4881. <https://doi.org/10.3390/ijms250948>