

# Analiza cytometryczna materiału z biopsji transbronchialnej węzła chłonnego u chorych na sarkoidozę płuc

Cytometric analysis of transbronchial lymph node biopsy in patients with lung sarcoidosis

Rafał Sokołowski,<sup>1</sup> Michał Rząd,<sup>2</sup> Elżbieta Rutkowska,<sup>3</sup> Karina Jahnz-Różyk<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Klinika Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii, Alergologii i Immunologii Klinicznej CSK MON WIM w Warszawie; kierownik: prof. dr hab. n med. Karina Jahnz-Różyk

<sup>2</sup> I Wydział Lekarski Uniwersytetu Medycznego w Warszawie; Studenckie Koło Naukowe przy Klinice Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii, Alergologii i Immunologii Klinicznej CSK MON WIM; opiekun koła: lek. Rafał Sokołowski

<sup>3</sup> Pracownia Hematologii i Cytometrii Przepływowej CSK MON WIM w Warszawie; kierownik: dr n med. Elżbieta Rutkowska

**Streszczenie.** Sarkoidoza płuc jest uogólnioną chorobą ziarniniakową o nieznanej etiologii, której często towarzyszy limfadenopatia śródpiersia. Jedną z metod pomocnych w diagnostyce różnicowej sarkoidozy jest ocena cytologiczna materiału pochodzącego z dróg oddechowych oraz oznaczenie w nim stosunku limfocytów T pomocniczych (CD4) do limfocytów T supresorowych/cytotoksycznych (CD8). Celem pracy była ocena cytometryczna materiału pochodzącego z biopsji transbronchialnej węzła chłonnego, pobranego z użyciem techniki TBNB-EBUS, oraz ocena jej przydatności w diagnostyce chorych na sarkoidozę płuc. Rozpoznanie sarkoidozy ustalono u 12 z 23 badanych chorych z limfadenopatią śródpiersia. U chorych na płucną postać sarkoidozy w badanym materiale istotnie częściej stwierdzano zwiększony odsetek limfocytów CD8+ (19,34 ± 7,98%, mediana 19,8%). Objawy zapalenia stawów występowały natomiast istotnie częściej u chorych ze zwiększonym odsetkiem limfocytów T CD3+ (64,49 ± 11,9%; mediana 65,85%). Wykazano, że cytometria przepływowa materiału cytologicznego z TBNB-EBUS w powiązaniu z danymi klinicznymi jest przydatna w diagnostyce sarkoidozy płuc.

**Słowa kluczowe:** cytometria przepływowa, limfocyty CD4/CD8, ultrasonografia wewnątrzskrzelowa

**Abstract.** Lung sarcoidosis is a generalized granulomatous disease with an unknown etiology, often accompanied by mediastinal lymphadenopathy. One of the methods helpful in differential diagnosis of sarcoidosis is the cytological evaluation of the material originating from the respiratory tract, and determining the ratio of helper T cells (CD4) to suppressor/cytotoxic T lymphocytes (CD8). The aim of the study was a cytometric evaluation of the material from the transbronchial lymph node biopsy, taken using the TBNB-EBUS technique (called transbronchial nodi biopsy), and assessment of its usefulness in the diagnosis of patients with lung sarcoidosis. The diagnosis of sarcoidosis was made in 12 of 23 studied patients with mediastinal lymphadenopathy. In patients with pulmonary sarcoidosis an increased percentage of CD8+ lymphocytes was found significantly more often (19.34% ± 7.98%, median 19.8%) in the examined material. However, symptoms of arthritis were significantly more frequent in patients with an increased percentage of CD3+ T lymphocytes (64.49% ± 11.9%, median 65.85%). The study showed that flow cytometry of cytological material with TBNB-EBUS in conjunction with clinical data is useful in the diagnosis of lung sarcoidosis.

**Key words:** endobronchial ultrasound, flow cytometry, lymphocytes CD4/CD8

Nadesłano: 3.12.2018. Przyjęto do druku: 29.01.2019

Nie zgłoszono sprzeczności interesów.

Lek. Wojsk., 2019; 97 (2): 118–122

Copyright by Wojskowy Instytut Medyczny

#### Adres do korespondencji

lek. Rafał Sokołowski  
Klinika Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii,  
Alergologii i Immunologii Klinicznej CSK MON WIM  
ul. Szaserów 128, 04-141 Warszawa  
tel. +48 261 816 581  
e-mail: rsokolowski@wim.mil.pl

## Wstęp

Sarkoidoza płuc jest uogólnioną chorobą ziarniniakową o nieznannej etiologii. Charakteryzuje się powiększeniem węzłów chłonnych śródpiersia oraz rozszanymi zmianami w płucach. Może przebiegać również z zajęciem innych narządów, np. wzroku, wątroby czy skóry.

Choroba dotyczy głównie młodych chorych w wieku 20–29 lat, a drugi szczyt zachorowań występuje przede wszystkim wśród kobiet po 50. roku życia.

Rozpoznanie sarkoidozy ustala się na podstawie badania klinicznego, badań obrazowych oraz badania histopatologicznego, w którym należy wykazać obecność nieserowaciejących ziarniniaków w zajętych tkankach. Konieczne jest wykluczenie innych chorób ziarniniakowych oraz miejscowego odczynu sarkoidalnego [1,2].

Tworzenie ziarniny sarkoidalnej odbywa się z udziałem wielu mechanizmów immunologicznych. Nieznany antygen fagocytowany jest przez makrofagi lub komórki dendrytyczne, a następnie prezentowany za pośrednictwem układu HLA (*human leukocyte antigen*) receptorom limfocytów T (głównie CD4+). Gromadzenie komórek następuje w wyniku ich redystrybucji z krwi oraz miejscowego namnażania. W procesach tych rolę odgrywają cytokiny, m.in. interleukina-2 (IL-2), interleukina-15 (IL-15) i interleukina-16 (IL-16). Ziarnina sarkoidalna zbudowana jest z komórek nabłonkowych i wielojądrowych komórek olbrzymich, ale dominują limfocyty CD4+; występują również pojedyncze CD8+ i sporadycznie limfocyty B [2,3].

Dotychczas jedną z metod diagnostycznych wykonywanych w różnicowaniu limfadenopatii śródpiersia było płukanie oskrzelowo-pęcherzykowe (*bronchoalveolar lavage* – BAL). BAL jest metodą pozyskiwania materiału komórkowego i niekomórkowego z powierzchni nabłonka obwodowych dróg oddechowych, tzw. przestrzeni oskrzelowo-pęcherzykowej. W praktyce zastosowanie znajduje ocena odsetka limfocytów CD4+ i CD8+ z wyczeniem stosunku CD4/CD8. W szczególnych przypadkach podejrzenia rozrostu chłonnego celowe może być również zastosowanie markerów limfocytów B (CD19, CD20).

Skład komórkowy materiału z BAL nie jest patognomiczny dla sarkoidozy. Całkowita liczba komórek może być prawidłowa lub nieznacznie zwiększona [4].

Ze względu na rozwój nowych metod diagnostycznych możliwe jest także uzyskanie materiału z biopsji cytologicznej węzła chłonnego śródpiersia. Skład komórek w materiale z TBNB-EBUS (*transbronchial needle aspiration endobronchial ultrasound*) węzła chłonnego oceniano na razie w nielicznych publikacjach [5].

Jednocześnie brak jest badań w zakresie oceny pozostałych elementów węzła oraz ich znaczenia w ocenie zaawansowania objawów sarkoidozy.

## Cel pracy

Celem pracy była ocena przydatności cytometrii przepływowej biopsji węzła w diagnostyce sarkoidozy płucnej.

## Materiał i metoda

Badaniem objęto 23 chorych (10 kobiet, 13 mężczyzn) w wieku  $42 \pm 15,3$  roku z podejrzeniem sarkoidozy I i II° wysuniętym na podstawie badania tomograficznego klatki piersiowej. W tej grupie u 6 chorych stwierdzono zespół Löfgrena. U chorych wykonano badanie endoskopowe drzewa oskrzelowego za pomocą aparatu OLYMPUS (Olympus UC260FW, Olympus Co Ltd., Tokyo, Japan). Stosowano miejscowe znieczulenie jamy ustnej i gardła (10% roztwór lidokainy) i drzewa oskrzelowego (2% roztwór lidokainy) oraz analgesodację, która obejmowała dożylnie podanie 2,5 mg midazolamu, 0,05 mg fentanylu i 0,5 mg atropiny.

Stację węzłową typowano na podstawie analizy badania tomograficznego. Ostatecznego typowania dokonywał operator spośród węzłów poszczególnych grup: tchawicznych górnych (grupa 2), tchawicznych dolnych (grupa 4), podostrogowych (grupa 7) oraz międzypłatowych (grupa 11). Wybrano węzły powyżej 1 cm w osi krótkiej oraz węzły z nietypowym obrazem sonograficznym (hipoechogeniczność, zatarta wnęka).

W czasie rzeczywistym wykonano biopsję transbronchialną TBNB EBUS węzłów śródpiersia za pomocą igły G 21–22 Olympus. Materiał do badania histopatologicznego był utrwalany w 96% alkoholu (cytologia) lub 10% formalinie (cytoblok). Materiał do analizy cytometrycznej zabezpieczano w 3 ml 0,9% roztworu NaCl. Do próbek cytometrycznych typu Falcon dodano 100  $\mu$ l badanej zawiesiny komórkowej oraz odpowiednią objętość przeciwciał monoklonalnych w ilości zalecanej przez producenta. Tak przygotowane próbki poddano akwizycji i analizie za pomocą cytometru przepływowego FACS Canto II oraz oprogramowania DIVA 8.0 i programu do analizy danych INFINICYT. Do znakowania komórek stosowano antyludzkie przeciwciała mysie: CD4 FITC, CD5 PE, CD3 PerCP-Cy5-5, CD19 PE-Cy7, CD8 APC, CD16, APC-H7, HLA-DR, V450, CD45, V500, CD79b PerCP-Cy5-5, CD10 APC, CD38 APC-H7, CD20 V450 (Becton Dickinson), a do oceny klonalności łańcuchów lekkich immunoglobulin limfocytów B przeciwciała lambda FITC i kappa PE (Dako).

W badanym materiale oznaczono procentowy odsetek leukocytów i poszczególnych subpopulacji limfocytów, immunofenotyp limfocytów B oraz rozkład procentowy łańcuchów lekkich immunoglobulin wśród limfocytów B (CD4, CD8, CD19, NK, monocyty, granulocyty, łańcuchy lekkie).

**Tabela 1. Rozkład komórek w cytometrii (średnie ±SD)**  
**Table 1. Cell distribution in cytometry (mean ±SD)**

lp.	oznaczany parametr	rozkład procentowy (%) ±SD
1	limfocyty	84,72 ±17,351
2	CD4+	43,122 ±12,99
3	CD8+(%)	13,95 ±5,65
4	CD4/CD8	3,57 ±1,88
5	limfocyty B CD19+	25,01 ±14,64
6	limfocyty NK CD3-CD16+	2,49 ±1,59
7	monocyty (%)	2,76 ±3,71
8	granulocyty (%)	12,33 ±15,73
9	łańcuchy kappa(%)	53,34 ±13,55
10	łańcuchy lambda(%)	40,37 ±10,77
11	k/l	1,29 ±0,42

### Analiza statystyczna wyników badań

W analizie stosowano podstawowe statystyki opisowe, wyznaczając średnie, mediany i odchylenia standardowe dla poszczególnych komórek uzyskanych z biopsji węzła chłonnoego.

Test U Manna-Whitneya zastosowano w celu wykazania różnic w badaniu komórkowości węzła w zależności od lokalizacji narządowej sarkoidozy.

### Wyniki badań

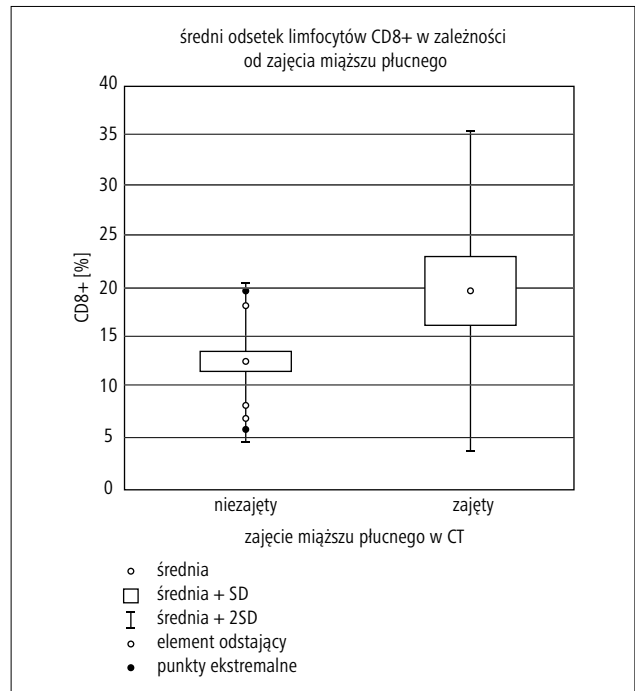
Sarkoidozę potwierdzono u 12 z 23 badanych chorych. Rozkład badanych komórek z cytometrii przedstawiono w tabeli 1.

Wyniki badania cytometrycznego powiązano z obrazem klinicznym chorych. Wykazano częstsze występowanie większej liczby limfocytów CD8+ (19,34 ±7,98%; mediana 19,8%) w przypadku zajęcia miąższu płuca (CTk1p+). Różnica była istotna statystycznie (p <0,05) (ryc. 1.).

Większa liczba limfocytów T CD3+ (64,49 ±11,9%; mediana 65,85%) występowała natomiast częściej u chorych z objawami zapalenia stawów (ST+). Różnica była zbliżona do istotności statystycznej (p =0,0545) (ryc. 2.).

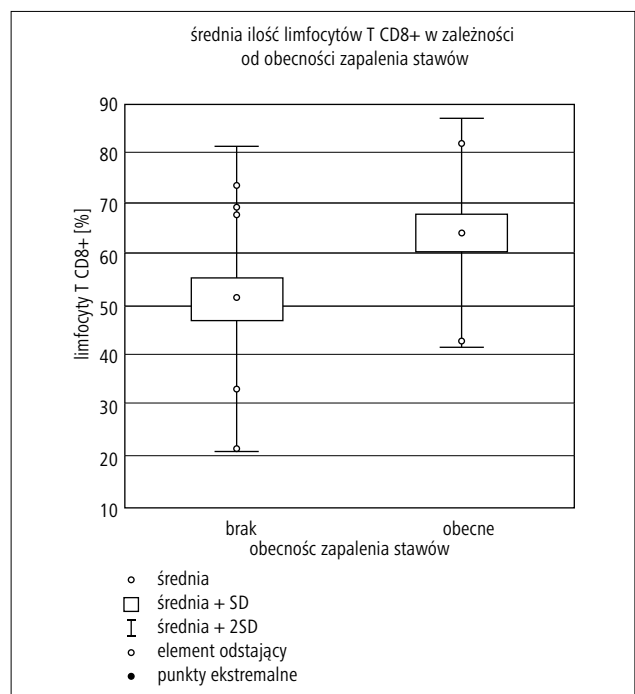
### Dyskusja

Rozpoznanie różnicowe sarkoidozy opiera się na obrazie klinicznym, obrazie radiologicznym klatki piersiowej oraz wykazaniu obecności ziarniniaków z komórek nabłonkowatych bez martwicy [2]. Zaleconą metodą



**Rycina 1.** Odsetek limfocytów CD8+ w zależności od zmian płucnych, p <0,05

**Figure 1.** Percentage of CD8+ lymphocytes depending on pulmonary lesions, p <0.05



**Rycina 2.** Odsetek limfocytów T CD3+ w zależności od obrazu klinicznego zapalenia stawów, p = 0,0545

**Figure 2.** Percentage of CD3+ T lymphocytes depending on clinical manifestation of arthritis, p = 0.0545

diagnostyczną jest biopsja węzłów chłonnych pod kontrolą ultrasonografii wewnątrzoskrzelowej (TBNA EBUS). Jest to wysoce skuteczna metoda diagnostyczna, charakteryzująca się czułością w granicach 88–95%, zaś wartość predykcji wyników ujemnych wynosi 86–95% [1].

Tak duża swoistość i czułość dotyczy zarówno diagnostyki oraz różnicowania chorób nowotworowych (przerzuty raka płuca do węzłów), jak i diagnostyki chorób śródmiąższowych. Zabieg cechuje także małe ryzyko powikłań. Metoda ta przewyższa skutecznością wynik ślepej biopsji węzłów śródpiersia, która wykonywana jest po analizie obrazu tomograficznego klatki piersiowej. Skuteczność diagnostyczna ślepej biopsji wynosi 73,1%, a skuteczność TBNA EBUS 95,8% [6,7].

U chorych, u których nie udało się uzyskać potwierdzenia histopatologicznego, pozostaje obserwacja kliniczna objawów. Dopuszcza się rozpoznanie sarkoidozy na podstawie objawów w przypadku sarkoidozy ostrej przebiegającej pod postacią zespołu Löfgrena, charakteryzującego się podwyższoną ciepłotą ciała, zapaleniem stawów, rumieniem guzowatym oraz limfadenopatią śródpiersia w badaniu obrazowym klatki piersiowej.

Technika TBNA EBUS pozwala na zróżnicowanie sarkoidozy i procesu nowotworowego, których prezentacja kliniczna i radiologiczna może być podobna, i które mogą występować jednocześnie. Dlatego dobiera się takie metody diagnostyczne, które w przypadku negatywnego wyniku badania histopatologicznego pozwolą doprecyzować rozpoznanie, a choremu oszczędzą diagnostycznego zabiegu operacyjnego, jakim jest biopsja chirurgiczna płuca [8].

Płukanie oskrzelowo-pęcherzykowe i analiza komórkowości w aspiracie mają ugruntowaną pozycję w diagnostyce chorób śródmiąższowych płuc. Wykazanie w aspiracie oskrzelowym stosunku komórek CD4/CD8 >3,5 w powiązaniu z danymi klinicznymi pozwala na rozpoznanie sarkoidozy. Dane literaturowe podają, że skuteczność tej metody mieści się w granicach 40–60% (czułość 52%, swoistość 94%). Istnieje jednak grupa chorych z sarkoidozą potwierdzoną za pomocą chirurgicznej biopsji płuca, u których stosunek CD4/CD8 wynosił około 1 [9].

Istnieją także doniesienia, że duży stosunek CD4/CD8 stwierdzony w aspiracie oskrzelowym jest związany z nasilonym występowaniem klinicznych oraz radiologicznych cech sarkoidozy [8].

Ciekawą alternatywą dla BAL jest badanie cytometrii przepływową materiału komórkowego z biopsji cienkoigłowej. Metoda ta może stanowić jeden z najwcześniejszych elementów diagnostyki różnicowej nowotworów chłonnych lub zmian przerzutowych w węzłach śródpiersia [10,11].

Cytometria przepływowa umożliwia analizę kilku parametrów morfologiczno-immunofenotypowych jednocześnie. Jest metodą szybką, w której analizuje się

immunofenotyp z użyciem liczniejszych przeciwciał monoklonalnych (MoAg) niż w badaniach immunohistochemicznych, umożliwiającą równoczesną ocenę co najmniej 4 antygenów w jednej próbce oraz ocenę porównawczą względnej gęstości antygenów na komórkach nowotworowych i limfocytach T lub B w zawiesinie [12,13]. Metoda ta ma również ogromne znaczenie u chorych z obciążeniami klinicznymi, z przeciwwskazaniami, a także w przypadku trudno dostępnych dla niej miejsc do biopsji chirurgicznej, takich jak przestrzeń zaotrzewnowa czy śródpiersie przednie. Cytometria przepływowa materiału z biopsji aspiracyjnej umożliwia również szybkie jednoznaczne wykluczenie rozpoznania chłoniaka nieziarnicznego (*non-Hodgkin lymphoma* – NHL) w nowotworach drobnokomórkowych (mięsaki, raki drobnokomórkowe) [14].

Stosunek CD4/CD8 oznaczony metodą cytometrii przepływowej z materiału uzyskanego z biopsji węzła chłonnego śródpiersia jest większy (u 52% badanych) niż oznaczony w materiale z BAL (u 45% badanych) u chorych na sarkoidozę. Wskazuje to na większą czułość tej metody wykonywanej na biopsji węzłowej. Jednocześnie wskaźnik CD4/CD8 różni się i jest zdecydowanie większy w zależności od stadium radiologicznego sarkoidozy [5].

W grupie badanej wykazano większą liczbę limfocytów u chorych z nasileniem objawów klinicznych (zapalenie stawów) i radiologicznych (zajęcie mięszu płucnego). Wydaje się, że cytometria biopsji może mieć znaczenie w ocenie patomechanizmu zmian sarkoidalnych oraz obrazu klinicznego choroby. Wnioski należy wyciągać bardzo ostrożnie, gdyż w literaturze prezentowano zróżnicowane opinie, np. Ruiz i wsp., analizując materiał z BAL oraz biopsji węzłowej, stwierdzili, że wskaźnik CD4/CD8 nie umożliwia wiarygodnej diagnostyki różnicowej [15]. Taka rozbieżność może wynikać z metody laboratoryjnej, ale zdaniem autorów przede wszystkim z nieodpowiedniego doboru biopsji węzła. Węzeł chłonny z ziarniną sarkoidalną jest powiększony, a jego obraz ultrasonograficzny charakteryzuje się zatartą wnęką i hipoechogeniczną strukturą. Należy mieć na względzie, że w trakcie badania chorych z limfadenopatią śródpiersia podejrzanych o sarkoidozę możliwe jest występowanie węzłów zmienionych sonograficznie (o opisanym powyżej obrazie) oraz innych, powiększonych, ale o prawidłowej strukturze.

Opracowano cechy sonograficzne węzła chłonnego wysoce podejrzanego o charakter przerzutowy zmian nowotworowych; są to: heterogeniczny wzór, okrągły kształt, wyraźny margines i brak centralnej struktury wnęki [7]. W ocenie struktury węzła chłonnego podczas EBUS można także skorzystać z wzorców naczyniowych obrazu, stosując metodę Dopplera. Ich podział uwzględnia nasilenie przepływu od małego do dużego. Badanie

to charakteryzuje się dużą czułością, wskazując na zmiany chorobowe (nowotworowe) [16].

Dotychczas nie opracowano wzorca sonograficznego węzła chłonnego występującego w chorobach śródmiąższowych płuc. Autorzy wspomnianego powyżej badania wykorzystują niektóre wymienione powyżej nieprawidłowe cechy (m.in. brak struktur wnęki) węzła chłonnego do wskazania lokalizacji piętra węzłowego poddawanego biopsji.

Nie potwierdzono przydatności innych składników węzła, które oznaczano w cytometrii w diagnostyce sarkoidozy, ale ich znaczenie jest duże w diagnostyce chorób nowotworowych, zwłaszcza chłoniaków [17].

## Wnioski

Rozwój ultrasonografii wewnątrzskrzelowej otworzył nowy rozdział w pulmonologii interwencyjnej. Umożliwił przeprowadzenie celowanej biopsji węzłów chłonnych śródpiersia z zachowaniem wysokiego profilu bezpieczeństwa. Jednocześnie uzyskany bioptat węzłowy stał się nie tylko materiałem do oceny histopatologicznej. Z powodzeniem wykorzystuje się go do cytometrii przepływowej. Metoda ta pozwala z dużą czułością określić typ limfocytów węzła chłonnego. Nadaje się także do diagnostyki różnicowej limfadenopatii śródpiersia, m.in. u chorych z podejrzeniem sarkoidozy, zwłaszcza z nietypowym obrazem klinicznym. Postęp w opracowaniu markerów komórkowych limfocytów węzła chłonnego ułatwi i przyspieszy sprawną diagnostykę limfadenopatii oraz guzów śródpiersia.

## Piśmiennictwo

1. von Bartheld MB, Dekkers OM, Szlubowski A, et al. Endosonography vs conventional bronchoscopy for the diagnosis of sarcoidosis: the GRANULOMA randomized clinical trial. *JAMA*, 2013; 309 (23): 2457–2464
2. Costabel U, Hunninghake GW, on behalf of the Sarcoidosis Statement Committee. ATS/ERS/WASOG statement on sarcoidosis. *Eur Respir J*, 1999; 14 (4): 735
3. Ravaglia C, Gurioli C, Casoni GL, et al. Sarcoid-like lesion is a frequent benign cause of lymphadenopathy in neoplastic patients. *Eur Respir J*, 2013; 41 (3): 754–755
4. Technical recommendations and guidelines for bronchoalveolar lavage (BAL). Report of the European Society of Pneumology Task Group. *Eur Respir J*, 1989; 2 (6): 561–585
5. Akao K, Minezawa T, Yamamoto N, et al. Flow cytometric analysis of lymphocyte profiles in mediastinal lymphadenopathy of sarcoidosis. *PLOS ONE*, 2018;13(11):
6. Tremblay A, Stather DR, MacEachern P, et al. A Randomized Controlled Trial of Standard vs Endobronchial Ultrasonography-Guided Transbronchial Needle Aspiration in Patients With Suspected Sarcoidosis. *Chest*, 2009; 136 (2): 340–346
7. Yasufuku K, Chiyo M, Sekine Y, et al. Real-time endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration of mediastinal and hilar lymph nodes. *Chest*, 2004; 126 (1): 122–128
8. Danila E, Norkūnienė J, Jurgauskienė L, et al. Diagnostic role of BAL fluid CD4/CD8 ratio in different radiographic and clinical forms of pulmonary sarcoidosis. *Clin Respir J*. 2009; 3 (4): 214–221
9. Costabel U. CD4/CD8 ratios in bronchoalveolar lavage fluid: of value for diagnosing sarcoidosis? *Eur Respir J*, 1997; 10 (12): 2699–2700
10. Austin RM, Birdsong GG, Sidawy MK, et al. Fine needle aspiration is a feasible and accurate technique in the diagnosis of lymphoma. *J Clin Oncol*, 2005; 23 (35): 9029–9030
11. Koss LG, Woyke S, Olszewski W. Aspiration biopsy: cytologic interpretation and histologic bases. Igaku-Shoin Medical Pub, NewYork 1984: 215–238
12. Rymkiewicz G. Diagnostyka cytometryczna w hematologii. In: Dmoszyńska A, Robak T, Hus I, eds. Podstawy hematologii. Czelej, Lublin 2015: 111–139
13. Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood*, 2008; 111 (8): 3941–3967
14. Rymkiewicz G. Cytometria przepływowa w diagnostyce nowotworów układu chłonnego. In: Wojtukiewicz MZ, Deptała A, eds. Problemy hematologiczne u chorych na nowotwory. TerMedia, Poznań 2014: 117–144
15. Ruiz SJ, Zhang Y, Mukhopadhyay S. CD4/CD8 Ratio in Mediastinal Lymph Nodes Involved by Sarcoidosis: Analysis of Flow Cytometry Data Obtained by Endobronchial Ultrasound-guided Transbronchial Needle Aspiration. *J Bronchology Interv Pulmonol*, 2016; 23 (4): 288–297
16. Nakajima T, Anayama T, Shingyoji M, et al. Vascular image patterns of lymph nodes for the prediction of metastatic disease during EBUS-TBNA for mediastinal staging of lung cancer. *J Thorac Oncol*, 2012; 7 (6): 1009–1014
17. Galán J, Martín I, Carmona I, et al. The utility of multiparametric flow cytometry in the detection of primary effusion lymphoma (PEL). *Cytometry B Clin Cytom*, 2018