

Avanços técnicos no diagnóstico e no monitoramento de hemoglobinúria paroxística noturna por citometria de fluxo

Technical advances in flow cytometry-based diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria

Rodolfo Patussi Correia¹, Laiz Cameirão Bento¹, Ana Carolina Apelle Bortolucci¹, Anderson Marega Alexandre¹, Andressa da Costa Vaz¹, Daniela Schimidell¹, Eduardo de Carvalho Pedro¹, Fabricio Simões Perin¹, Sonia Tsukasa Nozawa¹, Cláudio Ernesto Albers Mendes¹, Rodrigo de Souza Barroso¹, Nydia Strachman Bacal^{1,2}

RESUMO

Objetivo: Discutir as melhorias técnicas no diagnóstico e no acompanhamento laboratorial de hemoglobinúria paroxística noturna para a validação da técnica de citometria de fluxo de alta sensibilidade.

Métodos: Estudo retrospectivo, que envolveu a análise de dados laboratoriais de 745 pacientes com hipótese diagnóstica e/ou acompanhamento de hemoglobinúria paroxística noturna por citometria de fluxo. **Resultados:** Os avanços técnicos não só reduziram o custo do ensaio, mas também melhoraram a identificação e a resolução da citometria de fluxo para a detecção de clone hemoglobinúria paroxística noturna. **Conclusão:** A citometria de fluxo de alta sensibilidade possibilitou a identificação do tipo e do tamanho de clone de hemoglobinúria paroxística noturna, especialmente em amostras com pequeno clone.

Descritores: Hemoglobinúria paroxística/diagnóstico; Citometria de fluxo/métodos; Desenvolvimento tecnológico

ABSTRACT

Objective: To discuss the implementation of technical advances in laboratory diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria for validation of high-sensitivity flow cytometry protocols. **Methods:** A retrospective study based on analysis of laboratory data from 745 patient samples submitted to flow cytometry for diagnosis and/or monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Results:** Implementation of technical advances reduced test costs and improved flow cytometry resolution for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clone detection. **Conclusion:** High-sensitivity flow cytometry allowed more sensitive determination

of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clone type and size, particularly in samples with small clones.

Keywords: Hemoglobinuria, paroxysmal/diagnosis; Flow cytometry/methods; Technological development

INTRODUÇÃO

A hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) é um defeito clonal raro da célula tronco hematopoética. A doença afeta todas as linhagens de células sanguíneas e tem incidência estimada em 1,3 novo caso por milhão de habitantes/ano. A etiologia reside em uma mutação somática adquirida no gene da fosfatidilinositolglicana classe-A (PIGA - *phosphatidylinositol glycan class A*), que codifica uma enzima essencial para a biossíntese das âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI - *glycophosphatidylinositol*). A incapacidade de produzir uma enzima funcional resulta em deficiência completa ou parcial de proteínas de membrana ancoradas por GPI.⁽¹⁻⁴⁾

O fator acelerador de degradação (DAF - *decay accelerating factor*; CD55) das proteínas ancoradas por GPI e o inibidor da lise de membrana (MIRL - *membrane inhibitor of reactive lysis*; CD59) são responsáveis pelas manifestações clínicas e laboratoriais associadas à HPN.^(5,6) Tais proteínas impedem a ativação da C3 convertase e inibem a formação do complexo de ata-

¹ Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, SP, Brasil.

² Centro de Hematologia de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

Autor correspondente: Rodolfo Patussi Correia – Avenida Albert Einstein, 627/701, bloco E, 2º andar – Morumbi – CEP: 05652-900 – São Paulo, SP, Brasil – Tel.: (11) 2151-2108 – E-mail: rodolfoptc@gmail.com

Data de submissão: 3/2/2016 – Data de aceite: 26/6/2016

Conflitos de interesse: não há.

DOI: 10.1590/S1679-45082016AO3641



que à membrana, protegendo as hemácias normais da lise mediada por complemento.⁽³⁾ As células sanguíneas com expressão reduzida de CD55 e CD59 são sensíveis à lise mediada pela ativação do complemento, que culmina na manifestação clínica da doença.

A tríade clássica de manifestações clínicas da HPN se caracteriza por hemólise intravascular, trombose em locais incomuns e insuficiência de medula óssea. A gravidade da hemólise depende do tamanho do clone HPN, e pacientes com hemólise grave geralmente necessitam de transfusão sanguínea. A ocorrência de hemoglobinúria e a baixa contagem de leucócitos aumentam a gravidade da doença, devido à perda urinária crônica de ferro e à maior suscetibilidade à infecção. Eventos trombóticos são tidos como um mau indicador prognóstico e constituem a principal causa de óbito em pacientes afetados por HPN.⁽⁷⁾

O tratamento eficaz da HPN depende do diagnóstico clínico e laboratorial correto.⁽⁷⁾ A citometria de fluxo (CF) é o padrão-ouro para o diagnóstico e monitoramento da HPN, mesmo em pacientes com clones pequenos. Trata-se de uma técnica de alta sensibilidade e especificidade, e de rápida execução, que permite a análise qualitativa e quantitativa de proteínas ancoradas por GPI.⁽⁸⁾ Entretanto, a padronização da técnica de CF é fundamental para a obtenção de resultados precisos. Diretrizes técnicas validadas para o diagnóstico e o monitoramento da HPN por CF foram disponibilizadas na literatura.^(3,9)

Até 2004, o diagnóstico da HPN em nosso laboratório de CF era baseado na análise da expressão antigênica de CD14, CD55 e CD59 por CF com duas cores. Em dezembro de 2012, a técnica foi aprimorada por meio da implementação de melhorias nas fases analíticas e elaboração do relatório final, da introdução de novos marcadores fenotípicos e da aquisição de novos citômetros de fluxo. Este artigo descreve nossos 10 anos de experiência na detecção de clones HPN por CF e os avanços técnicos recentes que permitiram o refinamento dos procedimentos, com melhora da resolução do ensaio e determinação mais precisa do tipo e do tamanho de clones em linhagem eritroides e mieloides, principalmente em pacientes com clones pequenos.

OBJETIVO

Discutir a implementação de avanços técnicos no diagnóstico e no acompanhamento laboratorial da hemoglobinúria paroxística noturna para validação da técnica de citometria de fluxo de alta sensibilidade, além de apresentar análise comparativa de diferentes protocolos e respectivos custos.

MÉTODOS

Coleta de dados

Estudo retrospectivo baseado em dados de CF de 745 pacientes, cujas amostras foram analisadas entre janeiro de 2004 e junho de 2014. O conjunto de dados incluiu 426 pacientes do sexo feminino, com idade variando de 1 a 97 anos (mediana de 43 anos). A CF foi realizada para diagnóstico ou monitoramento de HPN em todos os casos.

Anticorpos monoclonais para detecção de hemoglobinúria paroxística noturna por citometria de fluxo

Por muitos anos, nosso laboratório de CF utilizou um ensaio de duas cores com painéis específicos de anticorpos conjugados com fluorocromos para o diagnóstico de HPN (Quadro 1). Acompanhando a evolução técnica, nossos procedimentos foram atualizados, enfatizando-se o emprego de novos marcadores e novos equipamentos (Quadro 2).

Quadro 1. Marcadores empregados na detecção de clones de hemoglobinúria paroxística noturna por citometria de fluxo (Epics XL-MCL e Cytomics FC500; Beckman Coulter) antes da atualização técnica

Células alvo	Anticorpo e fluorocromo	Clone	Fabricante
Eritrócitos (ensaio com duas cores)	CD59 FITC	P282E	Beckman Coulter
	CD235a-PE	11E4B-7-6	Beckman Coulter
	CD55 PE	JS11KSC2.3	Beckman Coulter
Neutrófilos (ensaio com duas cores)	CD59 FITC	P282E	Beckman Coulter
	CD55 PE	JS11KSC2.3	Beckman Coulter
	CD13 PE	366	Coulter Clone
	CD15 FITC	80H5	Beckman Coulter
Monócitos (ensaio com duas cores)	CD64 FITC	22	Beckman Coulter
	CD14 PE	MØP9	Becton Dickinson

FITC: isotiocianato de fluoresceína; PE: ficoeritrina.

Quadro 2. Marcadores empregados na detecção de clones de hemoglobinúria paroxística noturna por citometria de fluxo (citômetros de fluxo Cytomics FC500 e Navios flow cytometer - Beckman Coulter) após a atualização técnica

Células alvo	Anticorpo e fluorocromo	Clone	Fabricante
Eritrócitos (ensaio com duas cores)	CD235a-FITC	11E4B-7-6	Beckman Coulter
	CD59-PE	MEM-43	Invitrogen
Neutrófilos (ensaio com quatro cores)	FLAER Alexa Fluor 488	NA	Cedarlane
	CD24 PE	ALB9	Beckman Coulter
	CD45 ECD	J33	Beckman Coulter
	CD15 PE-Cy5	80H5	Beckman Coulter
Monócitos (ensaio com quatro cores)	FLAER Alexa Fluor 488	NA	Cedarlane
	CD14 PE	RMO52	Beckman Coulter
	CD45 ECD	J33	Beckman Coulter
	CD64 PE-Cy5	22	Beckman Coulter

FITC: isotiocianato de fluoresceína; PE: ficoeritrina; FLAER: proaerolisina marcada com fluoresceína; PE-Cy5: ficoeritrina-cianina 5.

Todos os anticorpos conjugados com fluorocromos empregados nos testes foram titulados antes do uso para determinação da concentração ideal de saturação da ligação antígeno-anticorpo.⁽¹⁰⁾ Cabe ressaltar a importância de se respeitarem as especificações de tais produtos (fornecedores, clones, diluição e titulação).⁽³⁾

Ajustes do citômetro de fluxo

Os citômetros de fluxo foram ajustados de acordo com os nossos procedimentos operacionais padrão. Para avaliação de eritrócitos, a voltagem foi determinada empregando-se sangue periférico normal não corado para melhor definição dos ângulos dispersão frontal

(FSC - *forward scatter*) e lateral (SSC - *side scatter*), segundo escala logarítmica, e da posição/voltagem negativa nos canais FL1 e FL2. As amostras foram coradas isoladamente com CD235a-FITC (FL1 *versus* FL2) e CD59-PE (FL2 *versus* FL1) para compensação do sistema de duas cores. A marcação concomitante com CD235a-FITC e CD59-PE foi empregada para verificação e otimização dos ajustes.

Para avaliação de leucócitos, os ajustes de voltagem para FSC e SSC (escala linear) e a posição negativa nos canais fotomultiplicadores foram determinados empregando-se sangue periférico normal não corado. A compensação automática foi realizada mediante coloração isolada com proaerolisina marcada com fluoresceína (FLAER) Alexa Fluor 488, CD45PE, CD45ECD, CD45PE-Cy5 e CD45PE-Cy7, previamente titulados. O ajuste fino foi realizado empregando-se as combinações descritas no quadro 2 para neutrófilos e monócitos.

As associações entre os diferentes protocolos e a sensibilidade diagnóstica foram investigadas empregando-se o teste χ^2 . A análise comparativa dos protocolos foi baseada nos testes de correlação e regressão linear. O nível de significância adotado foi de 5%.

Procedimentos técnicos

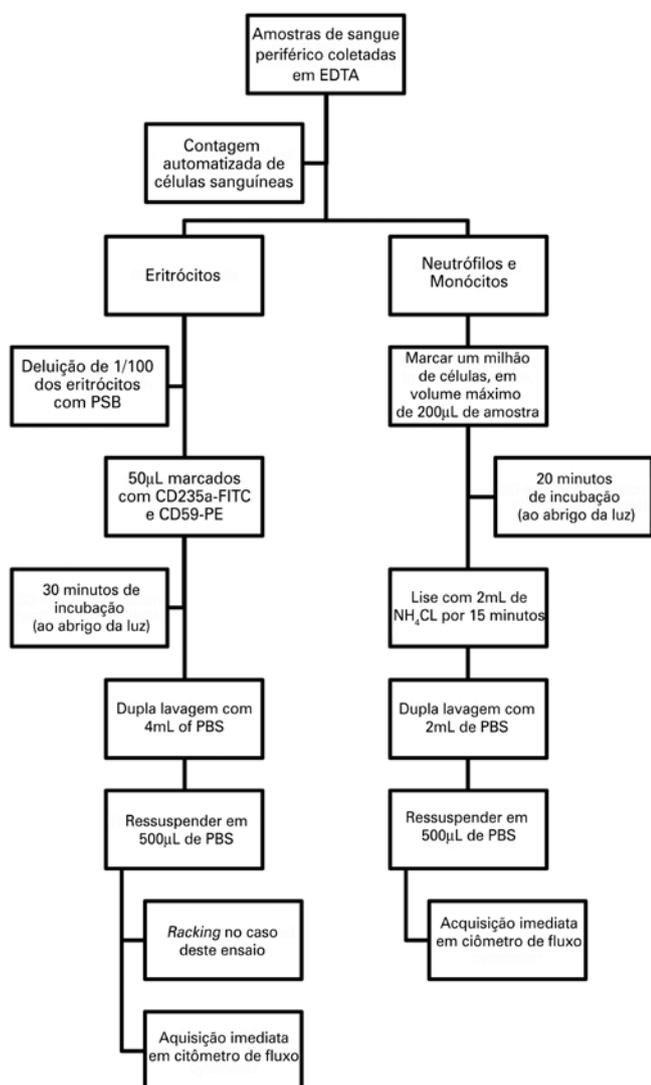
Os procedimentos técnicos empregados na detecção de clones HPN por CF após as atualizações técnicas encontram-se resumidos na figura 1.

RESULTADOS

Impacto dos avanços técnicos na resolução da citometria de fluxo para detecção de hemoglobinúria paroxística noturna

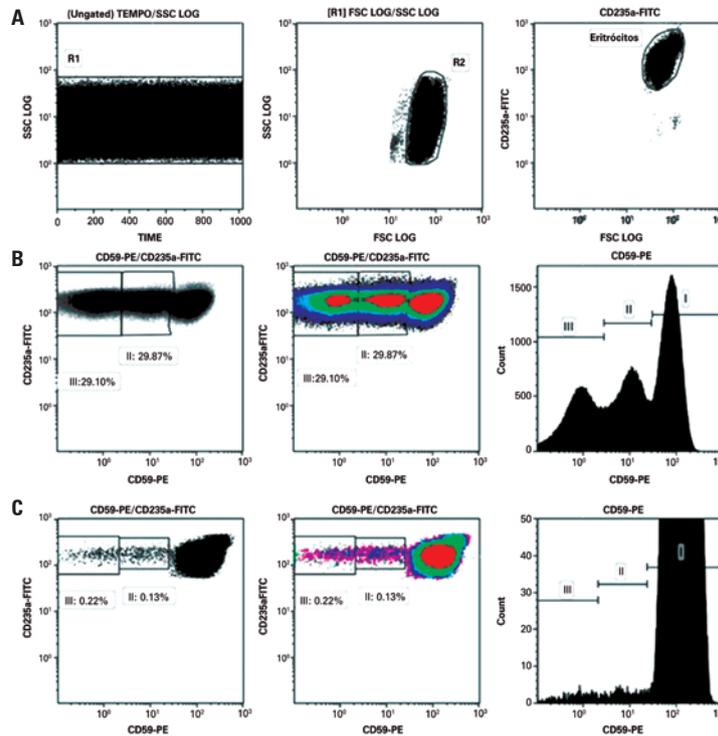
A resolução dos dados de CF foi fundamental para a diferenciação de populações normais e HPN em misturas de partículas com intensidade diferente de sinal. Antes da implementação dos avanços técnicos, o CD55/CD59 (eritrócitos e neutrófilos) e o CD14 (monócitos) eram usados com sucesso na detecção de clones HPN; entretanto, a resolução não era adequada. Por esse motivo, uma amostra de sangue periférico normal era sempre corada para servir de referência na identificação de populações HPN positivas e negativas.

A introdução de novos marcadores (Quadro 2) e o aprimoramento dos procedimentos técnicos (Figura 1) permitiram identificar clones HPN em alta resolução, com sensibilidade de 0,01%, além da caracterização de diferentes clones com base na deficiência total ou parcial de proteínas ancoradas por GPI (Figuras 2 e 3).



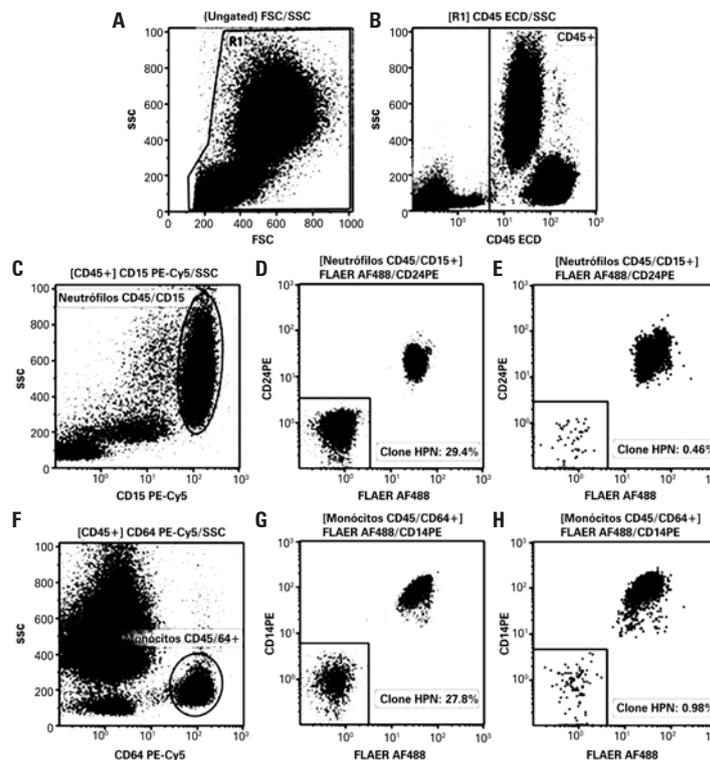
EDTA: ácido etilenodiaminotetracético; PBS: tampão fosfato salino; FITC: isotiocianato de fluoresceína; PE: ficoeritrina; NH₄CL: cloreto de amônio.

Figura 1. Procedimentos técnicos padronizados empregados na detecção de clones de hemoglobinúria paroxística noturna por citometria de fluxo



FSC: dispersão frontal (*forward scatter*); SSC: dispersão lateral (*side scatter*); FITC: isotiocianato de fluoresceína; PE: ficoeritrina.

Figura 2. Resolução dos dados de citometria de fluxo na investigação de hemoglobinúria paroxística noturna em linhagens eritroides após a implementação dos avanços técnicos. A análise por citometria de fluxo e as estratégias de *gating* empregadas foram baseadas nas recomendações de Sutherland et al.⁽¹¹⁾ (A) *Gating* sequencial para detecção correta de eritrócitos CD235a positivos. Tal estratégia de *gating* é importante para a eliminação de problemas no sistema fluídico (*Side scatter long versus tempo*) e agregação eritrocitária. (B e C) Diferentes clones de hemoglobinúria paroxística noturna com base na expressão de CD59. Conjuntos de dados contendo gráficos de pontos, gráficos de densidade e histogramas são úteis para melhor detecção e caracterização de diferentes clones de hemoglobinúria paroxística noturna

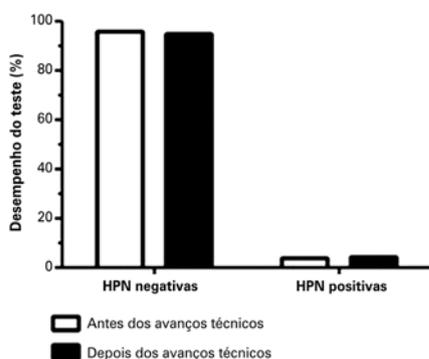


FSC: dispersão frontal (*forward scatter*); SSC: dispersão lateral (*side scatter*); FITC: isotiocianato de fluoresceína; PE: ficoeritrina; HPN: hemoglobinúria paroxística noturna.

Figura 3. Resolução dos dados de citometria de fluxo na investigação de hemoglobinúria paroxística noturna em neutrófilos e monócitos após a implementação dos avanços técnicos. (A, B, C e F) Estratégias de *gating* empregadas na identificação de neutrófilos e monócitos. (D, E, G e H) Tamanho do clone de hemoglobinúria paroxística noturna em neutrófilos CD45/CD15+ (D e E) e monócitos CD45/CD64+ (G e H), com base na expressão de proaerolisina marcada com fluoresceína e CD24 e proaerolisina marcada com fluoresceína e CD14, respectivamente

Desempenho dos protocolos de detecção de hemoglobínúria paroxística noturna antes e depois da implementação de avanços técnicos

A comparação do desempenho dos protocolos de detecção de HPN foi baseada no número de casos positivos detectados antes e depois da implementação de avanços técnicos. Foram consideradas apenas as amostras positivas ou negativas analisadas para fins de diagnóstico, excluindo-se as analisadas para monitoramento. De um total de 745 amostras analisadas antes da atualização técnica, 573 (76,9%) foram selecionadas, contra 172 após a atualização. Os clones HPN foram detectados em 4% (23/573) e 4,7% (8/172) amostras analisadas antes e depois da implementação de avanços técnicos, respectivamente. Entretanto, as diferenças não alcançaram significância estatística ($p=0,714$) (Figura 4).



HPN: hemoglobínúria paroxística noturna.

Figura 4. Desempenho dos protocolos de detecção de hemoglobínúria paroxística noturna antes e depois da implementação de avanços técnicos. A frequência de amostras negativas e positivas não diferiu de forma significativa entre os protocolos ($p=0,714$)

Uso alternativo do CD157 para detecção de hemoglobínúria paroxística noturna

Diversas proteínas ancoradas por GPI podem ser usadas na investigação de HPN por CF. Estudos recentes empregando amostras sanguíneas HPN estabilizadas revelaram desempenho superior de algumas dessas proteínas na detecção de leucócitos HPN em relação aos marcadores CD14, CD16, CD24 e FLAER.⁽¹²⁾ Dados recentes de literatura mostraram que o CD157 é um marcador dotado de alta sensibilidade e especificidade, além de potencialmente útil para a detecção de HPN, podendo inclusive ser usado para avaliar a expressão de proteínas ligadas ao GPI em neutrófilos e monócitos na mesma reação.^(13,14)

Para efeito de padronização do procedimento citado,⁽¹⁴⁾ um protocolo baseado no uso de um único tubo contendo cinco conjugados para análise simultânea de neutrófilos e monócitos foi validado em nosso labora-

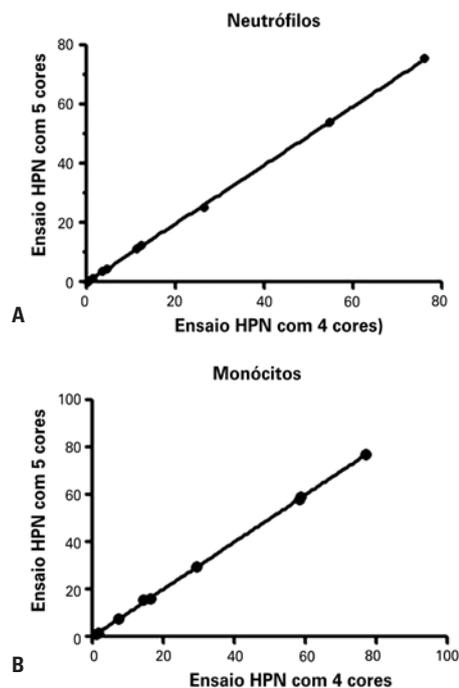
tório. Os marcadores empregados encontram-se descritos no quadro 3. Foram utilizados os citômetros de fluxo Cytomics FC500 e *Navios flow cytometer* (Beckman Coulter).

Quadro 3. Ensaio com cinco cores em tubo único para investigação de hemoglobínúria paroxística noturna em leucócitos

Células alvo	Anticorpo e fluorocromo	Clone	Fabricante
Neutrófilos e monócitos (ensaio com cinco cores)	FLAER Alexa Fluor 488	NA	Cedarlane
	CD157 PE	SY11B5	Exbio
	CD64 ECD	22	Beckman Coulter
	CD15 PE-Cy5	80H5	Beckman Coulter
	CD45PE-Cy7	J33	Beckman Coulter

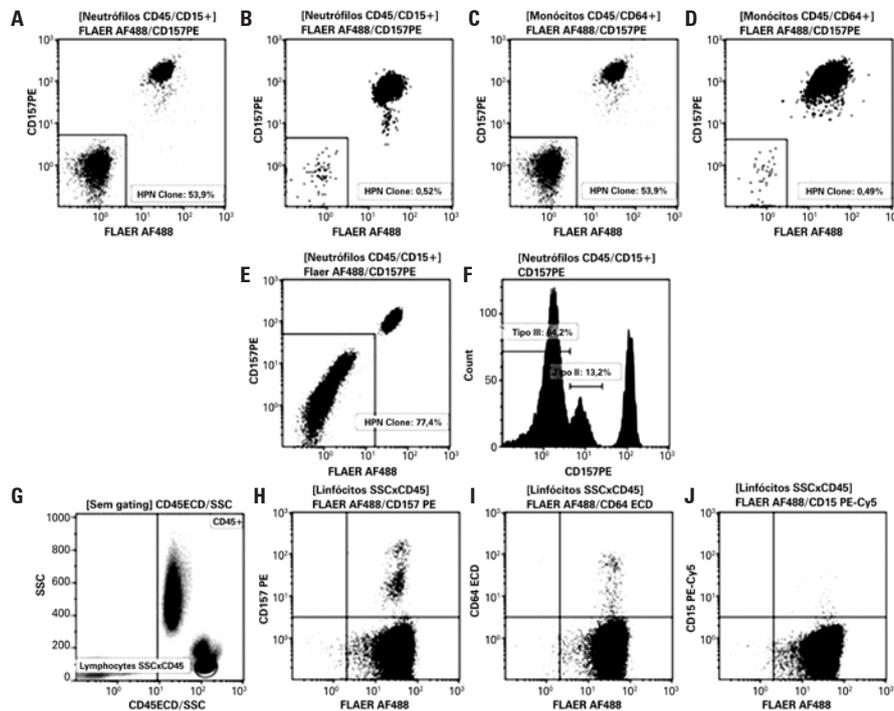
FLAER: proaerolisina marcada com fluoresceína; NA: não se aplica; PE: ficoeritrina; PE-Cy5: ficoeritrina-cianina 5; PE-Cy7: ficoeritrina-cianina 7.

Para efeito de comparação de desempenho, 20 amostras foram analisadas empregando-se o ensaio atual (quatro cores em dois tubos) e o ensaio com cinco cores em um único tubo. Clones de tamanhos diferentes foram detectados em neutrófilos (0,2% a 76,0%) e monócitos (0,9% a 77,0%) em dez amostras, sem diferença estatística entre os tamanhos dos clones HPN detectados pelos dois métodos (Figuras 5 e 6). As dez amostras restantes foram negativas em ambos os ensaios.



HPN: hemoglobínúria paroxística noturna.

Figura 5. Comparação do tamanho dos clones de hemoglobínúria paroxística noturna detectados por ensaios com quatro cores em dois tubos e cinco cores em um único tubo. (A e B) Correlações entre neutrófilos CD15+ (A) e monócitos CD64+ (B) e diferentes tamanhos de clones de hemoglobínúria paroxística noturna. A significância estatística foi investigada por testes de correlação e regressão linear ($R^2=0,9998$; $p<0,0001$)



FLAER: ficoeritrina; HPN: hemoglobinúria paroxística noturna; SSC: *side scatter*.

Figura 6. Análise de leucócitos pelo ensaio de cinco cores em um único tubo descrito no quadro 3. As estratégias de *gating* empregadas para identificação de neutrófilos e monócitos encontram-se descritas na figura 3. (A, B, C e D) Tamanho do clone hemoglobinúria paroxística noturna em neutrófilos CD45/CD15+ (A e B) e monócitos CD45/CD64+ (C e D), com base na expressão de proerolisina marcada com fluoresceína e CD157. (E e F) Amostras contendo clones de hemoglobinúria paroxística noturna tipos II e III detectados em linhagens mielóides por ensaios baseados em proerolisina marcada com fluoresceína e CD157. (G, H, I e J) Linfócitos (SSC×CD45) empregados como controle interno para avaliação de procedimentos técnicos, desempenho dos reagentes e ajustes do citômetro de fluxo

Amostras obtidas de um programa de avaliação externa de qualidade (*United Kingdom National External Quality Assessment Service*; UK NEQAS) também foram avaliadas para efeito de validação. Como exemplo, ensaios baseados em FLAER e CD157 revelaram 0,12% de células em neutrófilos CD15+ em uma das amostras em questão. Tal resultado mostrou-se compatível com a faixa de 0,08% a 0,13% proposta nos ensaios de HPN do UK NEQAS.

Impacto dos avanços técnicos sobre os custos do teste para hemoglobinúria paroxística noturna

Os três cenários de avanços técnicos descritos acima foram submetidos à análise pelo método de custeio baseado em atividades (*ABC - activity-based costing*)⁽¹⁵⁾ para determinação do impacto da implementação de avanços técnicos sobre o custo dos testes. O método ABC elimina as variações de rentabilidade e estabelece políticas de preço com base em custos e processos, incluindo análise de custos variáveis (materiais de consumo, com fracionamento e estimativa de desperdício), fixos (serviços médicos e técnicos, infraestrutura e depreciação) e administrativos.

Variáveis importantes, como tempo de incidência do laser, aquisição e análise de dados de CF, custo de re-

agentes e materiais de consumo, e tempo de utilização e custos dos serviços médicos e técnicos, foram consideradas na análise comparativa dos procedimentos técnicos. Os resultados revelaram redução significativa de custos. Os custos do ensaio com duas cores mostraram-se 37,0% mais altos do que os do ensaio com quatro cores, e 45,0% mais altos do que os do ensaio com cinco cores em tubo único. Os custos do ensaio com quatro cores foram 12,7% mais altos do que os do ensaio com cinco cores em tubo único (Figura 7).

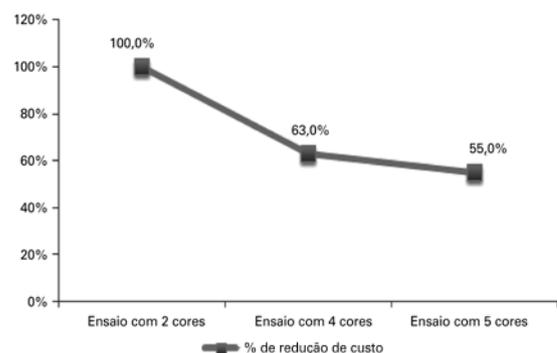


Figura 7. Custeio baseado em atividades. A redução nos custos do teste para hemoglobinúria paroxística noturna foi associada aos procedimentos técnicos. O ensaio de duas cores foi considerado o ponto de partida para a análise comparativa dos procedimentos técnicos deste estudo (ensaio com quatro cores em dois tubos, e com cinco cores em um único tubo)

DISCUSSÃO

Este estudo retrospectivo retrata nossa experiência de 10 anos na detecção de clones HPN por meio de CF e discute avanços técnicos recentes, cuja implementação levou ao aumento da resolução e da sensibilidade na detecção de clones HPN de pequeno tamanho. Para tal, as recomendações listadas em diretrizes internacionais foram acatadas e os procedimentos técnicos devidamente atualizados.^(3,8,9,14,16-18)

Nos ensaios de leucócitos, o maior avanço no diagnóstico e, principalmente, no monitoramento de clones HPN se deveu ao uso de FLAER, por sua maior precisão e sensibilidade. Acredita-se que tal marcador seja capaz de detectar clones pequenos em níveis de aproximadamente 0,5%,⁽¹⁷⁾ especialmente em casos de neutropenia grave, anemia aplásica (AA) e síndromes mielodisplásicas (SMD).⁽¹⁹⁻²¹⁾ A substituição do CD55/CD59 por FLAER/CD14 (monócitos) ou FLAER/CD24 (neutrófilos) em nossos procedimentos levou à melhora da resolução dos dados de CF (Figuras 3E a 3H), principalmente no que se refere a clones de pequeno tamanho.

Um ensaio consagrado de alta sensibilidade para detecção de leucócitos HPN (ensaio com cinco cores em tubo único)⁽¹⁴⁾ foi recentemente validado em nosso laboratório de CF (Figura 6). A comparação de 20 amostras analisadas por este e pelo ensaio com quatro cores em dois tubos revelou altos níveis de correlação (Figura 5). Clones HPN de tamanho semelhante foram detectados em 10 das 20 amostras analisadas por ambos os métodos, enquanto nas 10 amostras restantes nenhum clone foi detectado.

Curiosamente, o CD157 mostrou-se capaz de detectar leucócitos HPN tipo II (Figuras 6E a 6F), fato esse já relatado em estudos prévios,^(3,14) embora de significado clínico ainda desconhecido.^(3,9,14) A detecção de leucócitos HPN tipo II não se restringe ao emprego do CD157; marcadores como CD55, CD59, CD24 (neutrófilos) e até mesmo CD14 (monócitos) também podem ser utilizados para tal fim.

O maior desafio técnico envolvido na análise de eritrócitos reside na combinação de diferentes anticorpos conjugados sem induzir agregação eritrocitária importante que possa prejudicar a detecção de clones HPN tipos II e III. Embora o CD55 e o CD59 sejam os mais tradicionais, os anticorpos CD235 a e CD59 conjugados com FITC e PE, respectivamente, são os marcadores mais bem estabelecidos.⁽⁹⁾ O emprego de tal combinação melhorou a resolução nas análises de eritrócitos (Figura 2). Cabe frisar que, antes da implementação de avanços técnicos como titulação e diluição adequada de marcadores de eritrócitos e *racking* das amostras antes da aquisição de dados, a diferenciação entre clones HPN tipos II e III não era possível, principalmente nos clones pequenos.

Eritrócitos HPN tipos II e III apresentam níveis diferentes de sensibilidade à ação lítica do complemento,⁽²²⁾ e sua correta identificação guarda relação com as manifestações clínicas e sintomas da doença. Manifestações clínicas associadas à hemólise intravascular foram relatadas em pacientes com mais de 20% de células HPN tipo III.⁽³⁾

O monitoramento do tamanho do clone é importante para o tratamento do paciente. O monitoramento de casos com evidências de pequenos clones requer ensaios de CF de alta resolução e sensibilidade. A técnica descrita neste artigo mostrou-se capaz de detectar clones HPN pequenos (Figuras 3E a 3H e Figuras 6B a 6D), permitindo a aquisição de um milhão de eventos com sensibilidade de 0,01%.⁽¹⁶⁾ Entretanto, cabe ressaltar que clones grandes podem ser adequadamente detectados e monitorados por meio de ensaios de alta precisão e baixa sensibilidade.

A detecção de clones HPN pequenos e subclínicos em pacientes com AA e SMD foi relatada.^(7,21) O monitoramento do tamanho do clone é importante, uma vez que alguns pacientes, principalmente os acometidos por AA, podem responder à terapia imunossupressora; além disso, a expansão do clone HPN pode desencadear manifestações clínicas relacionadas à HPN.^(19,20)

Além de inovação técnica, a atualização dos protocolos de CF proporcionou redução importante dos custos dos testes para HPN, conforme indicam os resultados da análise de custeio (Figura 7). A redução dos custos mostrou-se associada à diminuição do tempo de preparo das amostras, à aquisição e análise dos dados, ao menor custo dos reagentes e materiais de consumo, e à diminuição do tempo de utilização e custos dos serviços médicos e técnicos. Por motivos de confidencialidade, não foi possível traduzir a redução de custos em valor de moeda. Entretanto, tomando-se o ponto de partida para a análise comparativa (ensaio com duas cores; Figura 7) como 100%, seria possível atribuir ao mesmo um valor em moeda nacional (por exemplo, R\$ 1,00) para efeito de cálculo da redução de custos em valor monetário. Além disso, o sangue periférico normal deixou de ser usado como controle interno, passando-se a empregar populações HPN negativas e positivas na avaliação dos procedimentos técnicos, desempenho dos anticorpos/reações e ajustes da CF (Figuras 6G a 6J).

Nosso laboratório, passou a integrar os programas de avaliação externa de qualidade UK NEQAS e *College of American Pathologists* em novembro de 2004 e abril de 2006, respectivamente. Em abril de 2013, passamos a participar também do programa UK NEQAS HPN *High-Resolution*. Cabe destacar o papel de tais programas na avaliação da qualidade, desempenho e sensibilidade dos testes para HPN. A implementação de ações corretivas e o refinamento contínuo com base nos resultados dos programas de avaliação externa de qualidade

nos permitiram aprimorar os protocolos de detecção de HPN por CF.

CONCLUSÃO

A metodologia de citometria de fluxo empregada no diagnóstico da hemoglobinúria paroxística noturna em nosso laboratório foi atualizada de acordo com as recomendações disponibilizadas na literatura para procedimentos técnicos, análise e interpretação de dados, elaboração do relatório final e avaliação de fidedignidade. A implementação de novas estratégias metodológicas resultou em refinamento das técnicas de análise para diagnóstico e/ou monitoramento da hemoglobinúria paroxística noturna, com melhor resolução e detecção de clones de hemácias e leucócitos, e caracterização mais precisa de seu tipo e tamanho, principalmente em amostras contendo clones pequenos (citometria de fluxo de alta sensibilidade). Além disso, a atualização técnica promoveu redução significativa de custos.

AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos ao Dr. Robert Sutherland, por sua importante contribuição no desenvolvimento de testes de hemoglobinúria paroxística noturna de alta sensibilidade em nosso laboratório de citometria de fluxo.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Rodolfo Patussi Correia e Laiz Cameirão Bento contribuíram igualmente para o desenvolvimento da ideia original do manuscrito, análise dos dados, elaboração da redação, confecção das figuras, análise estatística e revisão final do manuscrito.

Ana Carolina Apelle Bortolucci, Anderson Marega Alexandre, Andressa da Costa Vaz, Daniela Schimidell, Eduardo de Carvalho Pedro, Fabricio Simões Perin, Sonia Tsukasa Nozawa e Cláudio Ernesto Albers Mendes, contribuíram para o levantamento dos dados, análise dos dados de citometria de fluxo, validação do CD157 e confecção das figuras.

Rodrigo de Souza Barroso contribuiu para a correlação dos dados laboratoriais com dados clínicos e para a revisão final do manuscrito.

Nydia Strachman Bacal contribuiu para o desenvolvimento da ideia original do manuscrito, análise dos dados, correlação dos dados laboratoriais com dados clínicos e para a revisão final do manuscrito.

REFERÊNCIAS

1. Bessler M, Mason PJ, Hillmen P, Luzzatto L. Mutations in the PIG-A gene causing partial deficiency of GPI-linked surface proteins (PNH II) in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol.* 1994;87(4):863-6.
2. Bessler M, Mason PJ, Hillmen P, Miyata T, Yamada N, Takeda J, et al. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH) is caused by somatic mutations in the PIG-A gene. *EMBO J.* 1994;13(1):110-7.
3. Borowitz MJ, Craig FE, Digiuseppe JA, Illingworth AJ, Rosse W, Sutherland DR, Wittwer CT, Richards SJ; Clinical Cytometry Society. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom.* 2010;78(4):211-30.
4. Malvezzi M, Azambuja AP, Orfao A. Hemoglobinúria paroxística noturna. In: Duarte A, Sales MM, Vasconcelos D, editores. *Citometria de fluxo aplicações no laboratório clínico e de pesquisa.* São Paulo: Atheneu; 2013.
5. Motoyama N, Okada N, Yamashina M, Okada H. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria due to hereditary nucleotide deletion in the HRF20 (CD59) gene. *Eur J Immunol.* 1992;22(10):2669-73.
6. Nicholson-Weller A, March JP, Rosenfeld SI, Austen KF. Affected erythrocytes of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria are deficient in the complement regulatory protein, decay accelerating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983;80(16):5066-70.
7. Parker C, Omine M, Richards S, Nishimura J, Bessler M, Ware R, Hillmen P, Luzzatto L, Young N, Kinoshita T, Rosse W, Socié G; International PNH Interest Group. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood.* 2005;106(12):3699-709. Review.
8. Höchsmann B, Rojewski M, Schrezenmeier H. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH): higher sensitivity and validity in diagnosis and serial monitoring by flow cytometric analysis of reticulocytes. *Ann Hematol.* 2011;90(8):887-99.
9. Sutherland DR, Keeney M, Illingworth A. Practical guidelines for the high-sensitivity detection and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom.* 2012;82(4):195-208.
10. Tanqri S, Vall H, Kaplan D, Hoffman B, Purvis N, Porwit A, Hunsberger B, Shankey TV; ICSH/ICCS Working Group. Validation of cell-based fluorescence assays: practice guidelines from the ICSH and ICCS - part III - analytical issues. *Cytometry B Clin Cytom.* 2013;84(5):291-308. Review.
11. Sutherland DR, Illingworth A, Keeney M, Richards SJ. High-sensitivity detection of PNH red blood cells, red cell precursors, and white blood cells. *Curr Protoc Cytom.* 2015;72:6.37.1-30.
12. Richards SJ, Whitby L, Cullen MJ, Dickinson AJ, Granger V, Reilly JT, et al. Development and evaluation of a stabilized whole-blood preparation as a process control material for screening of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom.* 2009;76(1):47-55.
13. Hernández-Campo PM, Almeida J, Sánchez ML, Malvezzi M, Orfao A. Normal patterns of expression of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins on different subsets of peripheral blood cells: a frame of reference for the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cytometry B Clin Cytom.* 2006;70(2):71-81.
14. Sutherland DR, Acton E, Keeney M, Davis BH, Illingworth A. Use of CD157 in FLAER-based assays for high-sensitivity PNH granulocyte and PNH monocyte detection. *Cytometry B Clin Cytom.* 2014;86(1):44-55.
15. Cooper R, Kaplan RS. Measure costs right: make the right decisions. *Harvard Business Review.* 1988;66(5):96-103.
16. Hedley BD, Keeney M. Technical issues: flow cytometry and rare event analysis. *Int J Lab Hematol.* 2013;35(3):344-50. Review.
17. Sutherland DR, Kuek N, Davidson J, Barth D, Chang H, Yeo E, et al. Diagnosing PNH with FLAER and multiparameter flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom.* 2007;72(3):167-77.
18. Fletcher M, Sutherland DR, Whitby L, Whitby A, Richards SJ, Acton E, et al. Standardizing leucocyte PNH clone detection: an international study. *Cytometry B Clin Cytom.* 2014;86(5):311-8.
19. Tichelli A, Gratwohl A, Nissen C, Speck B. Late clonal complications in severe aplastic anemia. *Leuk Lymphoma.* 1994;12(3-4):167-75.
20. Sugimori C, Chuho T, Feng X, Yamazaki H, Takami A, Teramura M, et al. Minor population of CD55-CD59- blood cells predicts response to immunosuppressive therapy and prognosis in patients with aplastic anemia. *Blood.* 2006;107(4):1308-14.
21. Dunn DE, Tanawattanacharoen P, Bocconi P, Nagakura S, Green SW, Kirby MR, et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria cells in patients with bone marrow failure syndromes. *Ann Intern Med.* 1999;131(6):401-8.
22. Rosse WF, Hoffman S, Campbell M, Borowitz M, Moore JO, Parker CJ. The erythrocytes in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria of intermediate sensitivity to complement lysis. *Br J Haematol.* 1991;79(1):99-107.