

¿Cómo realizar un informe de HPN en citometría de flujo?

El diagnóstico correcto y completo es esencial para un manejo clínico de los pacientes. La citometría de flujo (CMF) se ha convertido en el método de referencia para diagnosticar y monitorizar los pacientes con Hemoglobinuria Paroxística Nocturna (HPN) y enfermedades relacionadas. Sin embargo, se debe de recordar que la CMF no establece por sí misma el diagnóstico y clasificación de la enfermedad, ya que debe de ser correlacionada con datos clínicos.

Con el fin práctico de clarificar la terminología y armonizar la emisión de los informes, el Grupo Español de Citometría de Flujo Hematológica (GECFH) ha elaborado una serie de recomendaciones basadas en la literatura existente y la actividad de los laboratorios clínicos. Además de la información relativa al paciente y origen de la muestra, en el informe específico de citometría se deben de recoger los siguientes puntos:

1. Se recomienda incluir una nota breve sobre el motivo de estudio, antecedentes de transfusión y el tratamiento recibido que debe ser aportada por el médico solicitante.

2. Se debe de incluir el panel de estudio. Se recomiendan paneles validados (por ejemplo, los indicados en ICCS/ESCCA PNH Guidelines) (Illingworth et al., 2018; Illingworth et al., 2019; Marinov et al., 2013; Oldaker et al., 2018; Sutherland et al., 2018).

3. Se recomienda incluir el recuento celular de la muestra al menos de las siguientes poblaciones: linfocitos, monocitos, neutrófilos, eosinófilos y basófilos/otras células nucleadas ya que puede haber discrepancias con el contaje en el autoanalizador.

4. Se debe de informar el tamaño clonal en los neutrófilos y monocitos de forma global (tipo II + III, deficiencia parcial y completa de proteínas ligadas a grupos glicosilfosfatidilinositol (GPI), respectivamente). Con algunos ensayos (por ejemplo, basados en CD157 y FLAER) se pueden identificar células tipo II y tipo III; su valor pronóstico no está establecido, por lo que se puede reportar esta información como nota adicional (Illingworth et al., 2018; Illingworth et al., 2019; Parker et al., 2005; Patriquin et al., 2019; Richards et al., 2022; Villegas et al., 2016).

4.1. Se recomienda informar el tamaño clonal en cifras absolutas en neutrófilos y monocitos por la información adicional aportada al estudio de HPN (Morado et al., 2017).

4.2. Se puede informar sobre el tamaño del clon en eosinófilos, aunque la bibliografía al respecto es escasa y su cuantificación puede ser más inexacta que para neutrófilos y monocitos (Richards et al., 2022).

5. Se debe de informar el tamaño clonal en hematíes, así como los porcentajes de células tipo II y tipo III, ya que presenta repercusión clínica (Illingworth et al., 2018; Illingworth et al., 2019; Morado et al., 2017; Richards et al., 2020; Richards et al., 2022; Villegas et al., 2024).

5.1. En ocasiones, no puede ser posible realizar una discriminación correcta entre las células tipo II y tipo III, debiendo de ser informadas conjuntamente e indicando en una nota adicional el motivo.

5.2. Si se efectúa el estudio en reticulocitos, se debe de informar de la misma manera.

6. La nomenclatura estándar en la línea diagnóstica cuando se detectan células deficientes en proteínas asociadas a GPI en cualquier población es “clon HPN” para aquellos casos que el porcentaje sea superior al 1%, cuando la proporción represente entre 0,1 y 1% de un compartimento celular se prefiere “clon HPN de pequeño tamaño” y finalmente, si la frecuencia es inferior a 0,1% se recomienda el término de “escasas células con fenotipo HPN” (Illingworth et al., 2018; Illingworth et al., 2019).

7. Se debe de informar sobre el límite de detección (LOD) y límite inferior de cuantificación LLOQ (Illingworth et al., 2018; Illingworth et al., 2019, Villegas et al. 2024). Aunque no hay reglas definitivas para establecer un umbral de normalidad (ya que se pueden encontrar células deficientes en proteínas GPI en donantes sanos en el rango de 1 célula por 100.000), con el fin de evitar artefactos, se recomienda un número mínimo de 20 eventos. Por lo tanto, el límite de detección en porcentaje (LOD%) sería $20 \times 100 / \text{células adquiridas}$ excluyendo *debris* y dobletes. De la misma forma, para calcular el límite inferior de cuantificación se requiere un mínimo de 50 eventos, por lo que el LLOQ% sería $50 \times 100 / \text{células adquiridas}$.

7.1. Aquellas poblaciones en las que se el porcentaje se encuentre entre el LOD y el LLOQ se informarán como “detectable pero no cuantificable”.

7.2. Es fundamental indicarlo en todos los estudios, dado que un LLOQ elevado, por ejemplo, superior a 1% implica que la presencia de un clon HPN de pequeño tamaño no puede ser excluido en esa muestra en particular.

8. La conclusión del informe para los casos de diagnóstico debe indicar claramente si existe un clon HPN o si se descarta. Se deben evitar frases que induzcan confusión, especialmente con los términos “positivo” y “negativo” referidos a antígenos individuales únicamente ya que la “negatividad” de expresión es equivalente a la “detección positiva” de células HPN (Illingworth et al., 2018).

9. La conclusión del informe para los casos de seguimiento debe incluir lo referido en el punto 8 y comparar la evolución del clon con los análisis previos en el

laboratorio, indicando la evolución de los clones (Dezern & Borowitz, 2018; Illingworth et al., 2018).

El informe debe indicar, siempre que sea posible, el intervalo recomendado para la repetición del estudio de citometría.

En general, el seguimiento del clon de los pacientes con HPN y evidencia de hemólisis debe ser cada seis meses durante los dos primeros años tras la detección, con valoraciones anuales si la enfermedad se mantiene estable (Dezern & Borowitz, 2018; Killick et al., 2016; Sahin et al., 2016; Villegas et al., 2024). Especialmente, si se ha iniciado tratamiento con inhibidores del complemento se pueden realizar controles cada 3 a 6 meses disminuyendo la frecuencia según clínica y evolución del clon (Kulasekararaj et al., 2023). En lo que respecta a la aplasia medular, se recomienda la reevaluación del clon cada 3 o 6 meses durante el primer año después del diagnóstico según se detecten o no células de HPN, con seguimientos anuales cuando el clon permanezca estable (Kulasekararaj et al., 2024). Finalmente, el clon debe ser reevaluado cuando se observe algún cambio clínico o analítico sugestivo de actividad o progresión de la enfermedad (Dezern & Borowitz, 2018; Illingworth et al., 2018; Killick et al., 2016; Parker et al., 2005; Villegas et al., 2024).

Bibliografía

Dezern, A. E., & Borowitz, M. J. (2018). ICCS/ESCCA consensus guidelines to detect GPI-deficient cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and related disorders part 1 - clinical utility. *Cytometry B Clin Cytom*, 94(1), 16-22. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21608>

Illingworth, A., Marinov, I., Sutherland, D. R., Wagner-Ballon, O., & DelVecchio, L. (2018). ICCS/ESCCA consensus guidelines to detect GPI-deficient cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and related disorders part 3 - data analysis, reporting and case studies. *Cytometry B Clin Cytom*, 94(1), 49-66. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21609>

Illingworth, A. J., Marinov, I., & Sutherland, D. R. (2019). Sensitive and accurate identification of PNH clones based on ICCS/ESCCA PNH Consensus Guidelines-A summary. *Int J Lab Hematol*, 41 Suppl 1, 73-81. <https://doi.org/10.1111/ijlh.13011>

Killick, S. B., Bown, N., Cavenagh, J., Dokal, I., Foukaneli, T., Hill, A.,...Haematology, B. S. f. S. i. (2016). Guidelines for the diagnosis and management of adult aplastic anaemia. *Br J Haematol*, 172(2), 187-207. <https://doi.org/10.1111/bjh.13853>

Kulasekararaj, A., Cavenagh, J., Dokal, I., Foukaneli, T., Gandhi, S., Garg, M.,...Committee, B. (2024). Guidelines for the diagnosis and management of adult aplastic anaemia: A British Society for Haematology Guideline. *Br J Haematol*, 204(3), 784-804. <https://doi.org/10.1111/bjh.19236>

Kulasekararaj, A. G., Kuter, D. J., Griffin, M., Weitz, I. C., & Röth, A. (2023). Biomarkers and laboratory assessments for monitoring the treatment of patients with paroxysmal nocturnal

hemoglobinuria: Differences between terminal and proximal complement inhibition. *Blood Rev*, 59, 101041. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2023.101041>

Marinov, I., Kohoutová, M., Tkáčová, V., Lysák, D., Holubová, M., Stehlíková, O.,...Illingworth, A. (2013). Intra- and interlaboratory variability of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria testing by flow cytometry following the 2012 Practical Guidelines for high-sensitivity paroxysmal nocturnal hemoglobinuria testing. *Cytometry B Clin Cytom*, 84(4), 229-236. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21075>

Morado, M., Freire Sandes, A., Colado, E., Subirá, D., Isusi, P., Soledad Noya, M.,...(SIC), P. w. g. o. t. l. S. o. C. (2017). Diagnostic screening of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Prospective multicentric evaluation of the current medical indications. *Cytometry B Clin Cytom*, 92(5), 361-370. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21480>

Oldaker, T., Whitby, L., Saber, M., Holden, J., Wallace, P. K., & Litwin, V. (2018). ICCS/ESCCA consensus guidelines to detect GPI-deficient cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and related disorders part 4 - assay validation and quality assurance. *Cytometry B Clin Cytom*, 94(1), 67-81. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21615>

Parker, C., Omine, M., Richards, S., Nishimura, J., Bessler, M., Ware, R.,...Group, I. P. I. (2005). Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*, 106(12), 3699-3709. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-04-1717>

Patriquin, C. J., Kiss, T., Caplan, S., Chin-Yee, I., Grewal, K., Grossman, J.,...Leber, B. (2019). How we treat paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: A consensus statement of the Canadian PNH Network and review of the national registry. *Eur J Haematol*, 102(1), 36-52. <https://doi.org/10.1111/ejh.13176>

Richards, S. J., Dickinson, A. J., Cullen, M. J., Griffin, M., Munir, T., McKinley, C.,...Hillmen, P. (2020). Presentation clinical, haematological and immunophenotypic features of 1081 patients with GPI-deficient (paroxysmal nocturnal haemoglobinuria) cells detected by flow cytometry. *Br J Haematol*, 189(5), 954-966. <https://doi.org/10.1111/bjh.16427>

Richards, S. J., Dickinson, A. J., Newton, D. J., & Hillmen, P. (2022). Immunophenotypic assessment of PNH clones in major and minor cell lineages in the peripheral blood of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cytometry B Clin Cytom*, 102(6), 487-497. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.22094>

Sahin, F., Akay, O. M., Ayer, M., Dal, M. S., Ertop, S., Ilhan, O.,...Saydam, G. (2016). Pesg PNH diagnosis, follow-up and treatment guidelines. *Am J Blood Res*, 6(2), 19-27.

Sutherland, D. R., Illingworth, A., Marinov, I., Ortiz, F., Andreasen, J., Payne, D.,...Keeney, M. (2018). ICCS/ESCCA consensus guidelines to detect GPI-deficient cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and related disorders part 2 - reagent selection and assay optimization for high-sensitivity testing. *Cytometry B Clin Cytom*, 94(1), 23-48. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21610>

Villegas, A., Arrizabalaga, B., Bonanad, S., Colado, E., Gaya, A., González, A.,...Hemoterapia, G. d. T. d. H. d. l. S. E. d. H. y. (2016). [Spanish consensus statement for diagnosis and treatment of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria]. *Med Clin (Barc)*, 146(6), 278.e271-277. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2015.12.012>

Villegas-Martínez A., Ballesteros-Andrés M., Bonanad-Boix S., González-Fernández F.A., Hernández-Rodríguez I., Jarque-Ramos I., Núñez-Vázquez R., Sempere-Talens A., Puerta-Alcalde P., Beneitez-Pastor D., Gaya-Valls A.; Grupo de Trabajo en Hemoglobinuria Paroxística

Nocturna de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia. Estado actual del diagnóstico y el tratamiento de la hemoglobinuria paroxística nocturna. 2024. Sangre. 2024;43(3):116-134. DOI: 10.24875/SANGRE.240000171.