

CAT
Critically Appraised Topic

Titel: Paroxismale nachtelijke hemoglobinurie

Author: Marina Mukovnikova
Supervisor: Nancy Boeckx
Search/methodology verified by:
Date: 13/03/12

CLINICAL BOTTOM LINE

PNH is een zeldzame vorm van hemolytische anemie die een impact op kwaliteit van leven en mortaliteit heeft en hoogwaarschijnlijk ondergediagnosticeerd is. PNH is frequent geassocieerd met AA en MDS-RA en evolutie van AA naar PNH en vice versa wordt tegenwoordig beschouwd als een natuurlijk proces. De screening en de opvolging van AA en MDS-RA patiënten naar de aanwezigheid van PNH klonen heeft een klinische en prognostische implicatie. Flowcytometrie is de gouden standaard in de diagnose van PNH. Multiparameter FLAER- gebaseerde assay op WBC (granulocyten en monocytten) wordt beschouwd als de beste strategie voor de diagnose van klassieke PNH en de opvolging van de grootte van PNH klone. Hoog sensitieve flowcytometrische assay is nodig voor de diagnose van subklinische PNH en de opvolging van (zeer) kleine klonen ikv AA en MDS-RA. Flowcytometrie op RBC kan een bijkomende waarde hebben om type II erythrocyten te identificeren bij een gekende PNH patiënt.

CLINICAL/DIAGNOSTIC SCENARIO

Paroxysmale Nachtelijke Hemoglobinurie (*PNH*) is een verworven hemolytische anemie die gekenmerkt is (in de klassieke vorm) door de aanvallen van intravasculaire hemolyse en hemoglobinurie. PNH komt het meest voor bij volwassenen tussen 30 en 50 jaar, maar de aandoening kan op iedere leeftijd voorkomen. Ongeveer 10% van PNH patiënten zijn jonger dan 21 jaar.³¹ De ziekte komt iets vaker voor bij vrouwen dan bij mannen (de verhouding is 1,2 tot 1). PNH is een zeer zeldzame ziekte, de juiste incidentie is niet bekend. In de VS is de incidentie geschat op 2-5 nieuwe gevallen per een miljoen inwoners, in Nederland wordt het ieder jaar bij 40-80 patiënten vastgesteld. Door het feit dat PNH een zeldzame ziekte is en dat naast de klassieke vorm ook subklinische vormen van PNH bestaan, is de reële incidentie mogelijks onderschat.

PNH is een klonale aandoening van de multipotente hematopoïetische stamcel. Genetische mutatie van *PIG-A gen* (phosphatidylinositol glycan class A) gelegen op chromosoom X ligt aan de basis van de pathogenese. Daar het product van *PIG-A gen* essentieel is voor de eerste stap van het GPI- anker synthese, wordt de laatste volledig geblokkeerd. Het gevolg ervan is het ontbreken van alle GPI- verankerde eiwitten die normaliter via het GPI- anker aan de celmembraan gebonden zijn. Een single mutatie kan klinische PNH veroorzaken, omdat zowel mannen als vrouwen een actief X chromosoom hebben. Er zijn veel GPI- verankerde eiwitten beschreven die verschillende functies hebben: enzymen, receptoren, adhesiemoleculen, bloedgroepantigenen. Twee GPI-verankerde eiwitten die complementactivatie reguleren, namelijk CD59 en CD55, spelen een belangrijke rol in de bescherming van het celmembraan tegen complementgeactiveerde lysis. CD59 (“membrane inhibitor of reactive lysis”) remt het lytisch complementcomplex C5-C9 door de directe interactie met “membrane attack complex” (MAC), terwijl CD55 (decay acceleration complex) de destructie van membraangebonden C3-convertase versnelt. Van de twee factoren is de CD59 de belangrijkste in de protectie tegen complementactivatie. Complement- geactiveerde lysis van RBC is het klinisch kenmerk van PNH. Daar PNH een klonale aandoening van de hematopoïetische multipotente stamcel is, zijn alle cellijnen (RBC, neutrofielen, monocytten, lymfocytten en bloedplaatjes) aangetast. Afhankelijk van de expressie van het GPI- anker worden de cellen in drie categorieën onderverdeeld: type I (normale cellen), type II (gedeeltelijke verlies van GPI- anker) en type III (volledige verlies).

PIG-A mutatie op zich is niet voldoende om klinische ziekte te veroorzaken, nog een ander mechanisme is nodig om klonale selectie en klonale expansie te bevorderen. Er bestaan enkele hypothesen , o.a. “two step model” waarbij *PIG-A-* deficiënte beenmergcellen een proliferatievoordeel krijgen t.o.v. *PIG-A+* cellen in situaties van immunologische schade en op die manier worden geselecteerd bij een auto-immuun proces. Dat kan een frequente associatie van PNH met aplastische anemie (een auto-immune ziekte) verklaren. Andere onderzoekers suggereren dat *PIG-A* mutatie *per se* de GPI- deficiënte stamcellen resistent maakt tegen apoptose zodat de cellen verhoogde overlevingskansen krijgen in die ongunstige omstandigheden. Nog een andere verklaring is een bijkomende mutatie van de GPI- deficiënte stamcellen die klonale expansie ontlokt²⁵.

Er bestaan zeldzame congenitale deficiënties van CD55 en CD59 die de symptomen van PNH nabootsen. Een mutatie van het *CD59 gen* met als gevolg het volledig ontbreken van CD59 leidt tot ernstige hemolyse en arteriële trombose, terwijl de mutatie in de promotor regio van *PIG-M gen* verhoogde tromboseneiging veroorzaakt zonder symptomen van intravasculaire hemolyse.

Klinische presentatie van *klassieke PNH* is gekenmerkt door aanvallen van *intravasculaire hemolyse* en *hemoglobinurie* die meestal s’nachts optreden. De mogelijke verklaring is de

nachtelijke lichte daling van pH. Het gevolg ervan is Coombs negatieve anemie met hemolytische kenmerken: gestegen reticulocytose, hoog LDH, gestegen direct bilirubine, gedaald haptoglobine en donkergekleurde ochtendurine. Typisch is acute exacerbatie van hemolytische anemie door intercurrente infecties, inflammatie, zwangerschap op de achtergrond van laaggradige chronische hemolyse. Pancytopenie en beenmergfalen zijn frequent aanwezig bij PNH patiënten.

Andere symptomen zoals moeheid, abdominale pijn, slokdarmspasme en erectiele dysfunctie bij mannen zijn te wijten aan de depletie van NO, een krachtige spierrelaxater. NO wordt gebonden door vrijgekomen hemoglobine in de circulatie, dat een zeer hoge affiniteit voor NO heeft, zodat spierontspanning in gedrang komt. Ongeveer 40% van PNH patiënten hebben de symptomen van veneuze trombose met ongewone lokalisatie: veneuze sinussen, hepatische en mesenteriale venen, Budd- Chiari syndroom. Het juiste mechanisme van trombosevorming is nog niet opgehelderd, maar de mogelijke pathologische momenten zijn: bloedplaatjesaggregatie door NO depletie en vrijkomen van de microvesikels met sterke procoagulante potentiaal, overproductie van de weefselfactor door complementactivatie en gestoorde fibrinolysis door het ontbreken van de GPI- verankerde urokinasereceptor (CD87).

Diagnostische testen kunnen in 4 groepen ingedeeld worden:

1. Complement-gebaseerde testen
2. Immunologische testen: *GCT*
3. Flowcytometrie
4. Moleculair onderzoek: detectie van *PIG-A* mutatie.

Complement- gebaseerde testen, *Ham test en sucrose lysis test*, zijn de laatste tijd in onbruik geraakt door lage sensitiviteit (de detectielimit is 4.2-5% van PNH klonen). Bovendien zijn de testen niet specifiek. *Ham test* kan vals positief zijn bij dyserythropoïetische anemie en *sucrose lysis test* – bij megaloblastische anemie of auto-immune HA.

“Sephacryl gel card techniques” (*GCT*) is gebaseerd op het principe van hemagglutinatie na antigeen- antistof reactie. De sensitiviteit van deze test is 2-10% en is vergelijkbaar met die van complement- gebaseerde testen. *GCT* is geen kwantitatieve test, niet betrouwbaar voor de detectie van kleine klonen en detecteert niet GPI- deficiënte granulocyten.

Flowcytometrie is een snelle en zeer sensitieve methode, wordt beschouwd als een gouden standaard in de diagnose van PNH.

Moleculaire diagnose (detectie van *PIG-A* mutatie) wordt gebruikt in de research setting en is momenteel niet aanbevolen voor de routine diagnose.

Een vooruitgang in de behandeling van de patiënten met klassieke PNH is de ontwikkeling van eculizimab, een remmer van complementactivatie. Eculizimab verlengt de overlevingsduur van GPI- deficiënte RBC met als gevolg een afname van de transfusienood en verbetering van de kwaliteit van leven.

QUESTION(S)

1. Wat zijn de klinische indicaties voor PNH testing?
2. Wat is de reden voor PNH diagnostiek in UZ Leuven?
3. Flowcytometrische PNH analyse van RBC: wanneer geïndiceerd? Of volstaat analyse van granulocyten/ monocyten?

SEARCH TERMS

- 1) MeSH Database (PubMed): MeSH term:
- 2) PubMed Clinical Queries (from 1966; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>): Systematic Reviews; Clinical Queries using Research Methodology Filters (diagnosis + specific, diagnosis + sensitive, prognosis + specific)
- 3) Pubmed (Medline; from 1966), SUMSearch (<http://sumsearch.uthscsa.edu/>), National Guideline Clearinghouse (<http://www.ngc.org/>), Institute for Clinical Systems Improvement (<http://www.icsi.org>), The National Institute for Clinical Excellence (<http://www.nice.org.uk/>), Cochrane (<http://www.update-software.com/cochrane>), Health Technology Assessment Database (<http://www.york.ac.uk/inst/crd/hta.htm>)
- 4) National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS; <http://www.nccls.org/>), International Federation of Clinical Chemistry (IFCC; <http://www.ifcc.org/ifcc.asp>), American Diabetes Association (ADA; <http://www.diabetes.org/home.jsp>), National Diabetes Information Clearinghouse (NDIC; <http://diabetes.niddk.nih.gov/>), Westgard QC (<http://www.westgard.com>), Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA; <http://www.cms.hhs.gov/clia/>)
- 5) UpToDate Online version 12.2 (2004)

RELEVANT EVIDENCE/REFERENCES

Original Articles

1. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH): higher sensitivity and validity and serial monitoring by flow cytometric analysis of reticulocytes.
B. Höchsmann, M. Rojewski, *Ann Hematol.*, 2011; 90: 887-899.
2. Long-term follow-up of clonal evolution in 802 aplastic anemia patients; a single-center experience.
Y. Li-Xingxin, M. Ge, *Ann Hematol.*, 2011; 90: 529-537.
3. GPI-anchored protein-deficient T cells in patients with aplastic anemia and low risk myelodysplastic syndrome: implications for the immunopathophysiology of bone marrow failure.
Takamasa Katagiri, *European Journal of Haematology*, 2011; 86:226-236.
4. Quantitation of CD55 and CD59 Expression on Reticulocytes and Mature Erythrocytes in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria, Aplastic Anemia, and Healthy Control Subjects.
Y. Kim, J. Lim, *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 2010 40:226-232
5. Flow cytometric analysis of erythrocytes in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria reveals superiority of CD59 as a diagnostic marker compared to CD55.
P. Tembhare, M. Ramani, *Pathology & Microbiology*, 2010; 53(4): 699-703.
6. Multiparameter flow cytometry for the diagnosis and monitoring of small GPI-deficient cellular populations.
M. Battiwalla, M. Hepgur, *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)*, 2010; 788: 348-356.
7. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry.
M.J. Borowitz, F.E. Craig, *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)*, 2010; 788: 211-230.
8. A closer look at paroxysmal nocturnal hemoglobinuria.
Saleh Rachidi, K.M. Musallam, *European Journal of Internal Medicine*, 2010; 21: 260-267.
9. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones in children with acquired aplastic anemia: prospective single center study.
V. Maggini, A. Pugi, *British Journal of Haematology*, 2010; 150: 480-497.
10. Use of a FLAER-based WBC assay in the primary screening of PNH clones.
D. Robert Sutherland, MSc, *Am J Clin Pathology*, 2009; 132: 564-572.
11. How I treat paroxysmal nocturnal hemoglobinuria.
Robert A. Brodsky, *Blood*. 2009 June 25; 113(26): 6522-6527.
12. Abnormalities in the expression of CD55 and CD59 surface molecules on peripheral blood cells are not specific to paroxysmal nocturnal hemoglobinuria.
Guillermo J. Ruiz-Delgado, *Hematology* 2009, 14(1): 33-37.
13. Detection of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones in patients with myelodysplastic syndromes and related bone marrow diseases, with emphasis on diagnostic pitfalls and caveats.
Sa A. Wang O. Pozdnyakova *Haematologica*, 2009; 94(1): 29-37.
14. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and myelodysplastic syndromes: clonal expansion of PIG-A-mutant hematopoietic cells in bone marrow failure.
Neal S. Yong *Haematologica*, 2009; 94(1): 3-7.
15. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: from bench to bedside.
Jeffrey J. Pu, M.D., Ph. D., and Robert A. Brodsky, *CTS*; 4(3):219-224.
16. Predicting response to immunosuppressive therapy and survival in severe aplastic anaemia.
P. Steinberg, C.O. Wu *Br J of Haematology*, 2008; 144: 206-216.

17. Clinical impact of HLA-Dr15, a minor population of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-type cells, and an aplastic anaemia-associated autoantibody in children with acquired aplastic anaemia.
N. Yoshida, H. Yagasaki *Br J of Haematology*, 2008; 142: 427-435.
18. Minor population of CD55-CD59 blood cells predicts response to immunosuppressive therapy and prognosis in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria
C. Sugimori, *Blood*, 2006; 107: 1308-1314.
19. Detection of CD55- and CD59-deficient granulocytic populations in patients with myelodysplastic syndrome.
G. Kaiafa, A. Papadopoulos, *Ann Hematol*, 2008; 87:257-262.
20. Differential usefulness of various markers in the flow cytometric detection of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in blood and bone marrow.
H. Olteanu, M.D., PhD, *Am J Clin Pathology*, 2006; 126: 781-787.
21. Clinical significance of a small population of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-type cells in the management of bone marrow failure.
S. Nakao, C. Sugimori *Int J. Hemat.*, 2006; 84(2):118-122.
22. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria using modern diagnostic assays.
Moyo VM, Mukina GL, *Br J Haematol*. 2004; 126: 133-138.
23. Primary prophylaxis with warfarin prevents thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria.
Hall C, Richards S, *Blood*, 2003; 102: 3587-3591.
24. Clinical significance of a minor population of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria – type cells in bone marrow failure syndrome.
H. Wang, T. Chuhjo, *Blood*, 2002; 100: 3897-3902.
25. Relationship between aplastic anemia and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria.
T. Kinoshita, N. Inoue, *Int J. Hemat.*, 2002; 75(2); 117-122.
26. Prevalence of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) cells in patients with myelodysplastic syndromes (MDS), aplastic anemia (AA), or other bone marrow failure (BMF) syndromes: Interim results from the EXPLORE trial.
N. Galili, F. Ravandi, *Clin Oncol* 27:15s, 2009 (suppl; abstr 7082)

Reviews

27. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: diagnostic tests, advantages & limitations.
M. Madkaikar, M. Gupta, *European Journal of Haematology*, 2009;83: 503-511.
28. Advances in the diagnosis and therapy of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria.
Robert A. Brodsky, *Blood reviews*, 2008; 22: 65-74.
29. Recent advances in the diagnosis, monitoring and management of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria.
S. J. Richards, A. Hill *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)*, 2007; 72B: 291-298.
30. PIG-A mutations in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and in normal hematopoiesis.
Robert A. Brodsky, *Rong Hu Leukemia & lymphoma*, 2006; 47(7): 1215-1221.
31. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria.
C. Parker, M. Omine, *Blood*, 2005; 106: 3699-3709.
32. Management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in the era of complement inhibitory therapy.
C. J. Parker, *Hematology*, 2011: 21-29.

I. Wat zijn de klinische indicaties voor PNH screening?

PNH is frequent geassocieerd met beenmergfalen (aplastische anemie (AA) en hypoplastisch MDS), bovendien evolueert een significant aantal van PNH patiënten naar AA en vice versa. Dit leidt tot verwarring in de subclassificatie en in de therapeutische aanpak van PNH patiënten. Om deze problematiek op punt te stellen heeft de International PNH Interest Group guidelines voor diagnose en management van PNH opgesteld (2005)³¹.

De guidelines bevatten ook de classificatie van PNH, waarin drie afzonderlijke subcategorieën van PNH zijn afgeleid :

1. **Klassieke PNH.**

Patiënten met klassieke PNH hebben klinische en biochemische evidentie van hemolyse en normale (of bijna normale) beenmergmorfologie met reactieve erythroïde hyperplasie.

2. **PNH in het kader van andere beenmergpathologie.**

Naast de klinische en biochemische evidentie van hemolyse hebben de patiënten concomitant of voorafgaand beenmergfalen (aplastische anemie, MDS of myelofibrose). Het vinden van cytogenetische afwijkingen kan bijdragen tot de diagnose (abnormaliteiten van chromosoom 5q, 7, 20q geassocieerd met MDS).

3. **Subklinische PNH (PNH-sc)**

Patiënten met subklinische PNH hebben geen symptomen van hemolyse. PNH-sc is geassocieerd met beenmergfalen (aplastische anemie en MDS, meestal type refractaire anemie). PNH klonen zijn zeer klein en kunnen enkel gedetecteerd worden door hoog sensitieve flowcytometrie.

Door het feit dat naast de klassieke vorm ook subklinische vormen van PNH bestaan en dat niet alle artsen er beducht op zijn, wordt PNH waarschijnlijk ondergediagnosticeerd.

De International PNH Interest Group heeft in zijn guidelines voorstellen gedaan om bepaalde categorieën van patiënten te screenen worden naar PNH. (zie bijlage tabel 1)

1. Alle patiënten met onverklaarde hemoglobinurie en/of *Coombs negatieve* hemolytische anemie (HA), zeker bij afwezigheid van RBC abnormaliteiten (fragmentocyten, sferocyten, sikkelcellen...) en in associatie met ijzerdeficiëntie moeten gescreend worden naar de aanwezigheid van klassieke PNH. Deze patiënten hebben meestal grote PNH klonen en hoog LDH. In de afwezigheid van gestegen LDH of bij *Coombs positieve* HA is screening naar PNH niet aangewezen.

Regelmatige opvolging van de patiënten met klassieke PNH is strikt noodzakelijk om verschillende redenen: 1) evolutie van de PNH klonen (grootte) opvolging, 2) evaluatie van therapierespons aan *eculizimab*, 3) investigatie van veranderingen in hematologische parameters, 4) bij de stijgende transfusienood. De aanbevolen frequentie van monitoring is jaarlijks, maar enkele auteurs raden frequentere opvolging aan. Volgens *Richards et al.*²⁹ moeten alle nieuwe patiënten met grote klonen (> 90%) initieel na 6 maanden geëvalueerd worden en vervolgens jaarlijks. Maar elke verandering van hematologische parameters verantwoordt een dringende reëvaluatie.

2. Patiënten met veneuze trombose op ongewone plaatsen (abdominale, hepatische, mesenteriale, cerebrale en cutane venen) zeker in associatie met cytopenie en/of intravasculaire hemolyse. Volgens recente studies is de probabiliteit van trombose direct gerelateerd aan de grootte van de PNH klonen. In de studie van *Hall et al.*²³ werd het risico op trombose bij patiënten met een PNH klonen > 50% als 44%/10 jaar gedefinieerd versus 5.8%/10 jaar bij patiënten met een PNH klonen < 50%. De door *Moyo et al.*²² berekende odds ratio was 1.64 op elke 10% stijging van PNH klonen. Routine screening van *alle* patiënten met veneuze trombose is niet aangeraden.

De jaarlijkse opvolging van PNH patiënten met trombose is belangrijk voor het therapeutisch beleid in verband met profylactisch gebruik van anticoagulantia.

Patiënten met onverklaarde trombose en hemolyse of hemoglobinurie bij wie geen PNH klonen gedetecteerd werden, moeten niet gereëvalueerd worden.⁷

3. Patiënten met recurrenente abdominale pijn, dysfagie of odysofagie in associatie met cytopenie en/of intravasculaire hemolyse. Deze symptomen kunnen als initiële presentatie aanwezig zijn bij 10% van PNH patiënten.

4. Alle patiënten met aplastische anemie (AA) of MDS-RA (refractaire anemie) *ongeacht* de aanwezigheid van hemolyse moeten gescreend worden naar de aanwezigheid van subklinische PNH.

De evolutie van een subpopulatie van patiënten met AA naar PNH (en vice versa) wordt tegenwoordig beschouwd als een natuurlijke proces, gezien de nauwe relatie tussen de pathogenese van beide entiteiten. Volgens de verschillende artikels worden PNH klonen gedetecteerd bij 32-68% van patiënten met AA en 12.8-23% van patiënten met MDS².

In de jaren tachtig werd het risico van evolutie van AA naar PNH als 13% / 7jaar gerapporteerd. In de recente studie van *Y. Li et al.*² hebben de auteurs 802 patiënten met AA geëvalueerd (jan.1991-dec. 2007). De incidentie van PNH bij AA patiënten werd geschat als

2.1% /5 jaar of 2.9% /10 jaar. Volgens dezelfde studie evolueren ongeveer 4.2% van de AA patiënten met kleine PNH klonen naar symptomatische PNH.

De meeste studies bij AA patiënten met kleine PNH klonen hebben aangetoond dat de aanwezigheid van kleine PNH klonen geassocieerd is met een betere respons aan immunosuppressieve therapie en een betere prognose.^{18,21,24}

De prognostische waarde van kleine PNH klonen bij AA patiënten blijft echter voorlopig controversieel. Een prospectieve studie van *N. Yoshida et al.*¹⁷ op 103 Japanse kinderen met AA heeft geen significante respons op immunosuppressieve therapie bij de patiënten met kleine PNH klonen getoond. Als mogelijke verklaring suggereren de auteurs een ander pathofysiologisch mechanisme van kleine PNH klonen bij kinderen met AA. Een andere studie van *P. Scheinberg et al.*¹⁶ op 316 volwassen patiënten met ernstige AA toonde dat de aanwezigheid van kleine PNH klonen geen predictieve waarde had voor de respons aan immunosuppressiva.

Ondanks deze bevindingen is de screening en regelmatige opvolging van alle AA patiënten *al dan niet met PNH klonen* aangeraden door de International PNH Interest Group. Redenen hiervoor zijn: 1) het verschijnen van een *de novo* klone in een initieel PNH negatieve patiënt 2) snelle groei van de klone met evolutie naar klassieke PNH. Het verdwijnen van PNH klone kan ook een indicator zijn van geslaagde stamceltransplantatie¹. De frequentie van de opvolging is niet gespecificeerd in de guidelines, andere auteurs, bvb *Richards et al.*, raden een driemaandelijke monitoring in de eerste 2 jaar aan²⁹.

Te noteren: de detectie van een *kleine* PNH klone op granulocyten, zelfs bij patiënten met hemolyse, kan niet beschouwd worden als een teken van *klassieke PNH*, er moet dan gezocht worden naar andere oorzaken van hemolyse⁷.

De aanwezigheid en de betekenis van kleine PNH klonen bij MDS patiënten werd in een aantal klinische studies bestudeerd en de resultaten ervan stemden niet overeen. De associatie van PNH-sc met MDS-RA is het meest bestudeerd. De diagnose van RA is het meest ambigu gezien het laag percentage blasten en enkele patiënten met lichte morfologische afwijkingen worden waarschijnlijk misdiagnosticeerd als MDS-RA ondanks het feit dat immuune mechanisme van de pathogenese gelijkaardig is aan die van typische AA²¹.

In een studie van *H. Wang et al.*²⁴ werden 164 MDS patiënten geëvalueerd, waarvan 119 patiënten met RA. De auteurs hebben sensitieve flowcytometrie gebruikt om de PNH + granulocyten en RBC met CD55/CD59 assay te detecteren (telkens op 100 000 cellen). De achtergrond van PNH⁺ cellen in gezonde mensen (68 stalen) werd als 1-2 op 100 000 cellen bepaald. Op de basis van deze bevinding werd de aanwezigheid van meer dan 0.003% GPI-deficiënte granulocyten en RBC arbitrair gedefinieerd als een PNH klone. Dit laag percentage werd echter als niet significant beschouwd in vorige studies. Een significante stijging van

PNH klone werd gedetecteerd in 17.9% RA patiënten en nooit in andere subgroepen van MDS, namelijk RARS, RAEB-1 of RAEB-2. Het percentage van PNH klone varieerde tussen 0.003-2.41% en was <1% in 81% van de gevallen. Alle stalen met een PNH klone < 0.01% werden gereëvalueerd binnen een maand en de resultaten waren concordant. PNH+ RA patiënten hadden duidelijke morfologische en klinische bijzonderheden in vergelijking met PNH negatieve RA patiënten: minder uitgesproken morfologische afwijkingen, lager percentage met afwijkend karyotype (4.8% vs 32.8%), geen progressie naar AML (0% vs 6.2%), hogere probabilliteit van respons aan cyclosporine (77.8% vs 0%). (zie tabel hieronder)

Table. Clinical features of PNH⁺ and PNH⁻ patients

| | PNH ⁺ RA | PNH ⁻ RA | P |
|--|---------------------|---------------------|----------|
| Incidence of karyotypic abnormalities (%) | 1 of 21 (4.8) | 21 of 64 (32.8) | 0.01* |
| Neutrophils with the pseudo-Pelger-Huet anomaly, % (range) | 2.0 (0-35.0) | 6.0 (0.5-45.2) | 0.02† |
| Platelet count, 10 ⁹ /L | 31 (4-121) | 91 (9-126) | 0.01† |
| Incidence of HLA-DR 15 (DRB1*1501 and DRB1*1502) (%) | 19 of 21 (90.5) | 5 of 27 (18.5) | < 0.001* |
| Response to cyclosporine therapy (%) | 7 of 9 (77.8) | 0 of 8 (0) | 0.002* |
| Progression to advanced MDS or AML (%) | 0 of 21 (0) | 4 of 65 (6.2) | 0.57* |

Progression to advanced disease was observed for 2.5 years.

* Fisher exact test, † Mann-Whitney *U* test

H. Wang, T. Chuhjo, Blood, 2002; 100: 3897-3902.

De resultaten van deze studie komen overeen met die van *Sa.A. Wang et al.*¹³ De auteurs hebben in hun studie 110 MDS patiënten geëvalueerd waarvan 17 patiënten met RA. Zoals in de bovengenoemde studie werd sensitieve flowcytometrie gebruikt (op 100 000 cellen). PNH klonen werden met CD55/CD59 en CD66b/CD16 op granulocyten bepaald en de cut-off was als 0.01% gedefinieerd. Aerolysin assay werd gebruikt voor de confirmatie: herhaling van flowcytometrie na 1 uur incubatie van het staal met aerolysin die enkel normale cellen lyseert (PNH+ cellen zijn resistent aan aerolysin). De PNH+ granulocyten werden gedetecteerd in 9/110 MDS patiënten: 20% van de patiënten met 5q- syndroom, 35% van de RA patiënten en 5% van de patiënten met refractaire cytopenie met multiliniaire dysplasie (RCMD). Geen enkele patiënt met RARS, RCMD-RS of MDS-U had een PNH klone . Bovendien hadden de PNH+ MDS patiënten een lagere beenmerg cellulariteit en blasten percentage, minder frequent cytogenetische afwijkingen en geen progressie naar AML binnen de follow-up van 19 maanden. (zie tabel hieronder).

De nadelen van deze studie zijn: 1)het gebruik van aerolysin methode (geen standaard methode) ipv moleculaire confirmatie van PIG-A mutatie en 2)de afwezigheid van de gegevens over de correlatie met de klinische uitkomst.

Table 3. Clinical and laboratory comparison of patients with low grade myelodysplastic syndrome with or without a PNH clone.

| Patient | PNH ⁺ (n=9) | PNH ⁻ (n=65) | <i>p</i> |
|-------------------------------------|---------------------------|----------------------------|----------|
| Male:female | 7:2 | 39:36 | 0.174 |
| Age, mean (years) | 65 (33-82) | 66 (23-100) | 0.716 |
| Hemoglobin, mean (g/dL) | 11.2 (7-13.2) | 10.7 (7.3-14.8) | 0.450 |
| ANC, mean ($\times 10^9/L$) | 1.9 (1.1-8.3) | 2.7 (0.3-14.6) | 0.360 |
| Platelets, mean ($\times 10^9/L$) | 125 (14-330) | 180 (6-349) | 0.299 |
| MCV, mean (fL) | 94.5 (82.3-114.6) | 101.8 (63.5-118.2) | 0.152 |
| Reticulocytes, mean (%) | 3.0 (1.2-3.9) | 2.2 (0.2-7.7) | 0.143 |
| BM cellularity, mean (%) | 37 (10-60) | 59 (5-100) | 0.017 |
| BM blasts, median (%) | 0.7 (0-1) | 1.5 (0-4.8) | 0.039 |
| Abnormal cytogenetics (%) | 22 | 44 | 0.292 |
| AML transformation | 0 | 4 | 1.000 |
| OS, median (months) | NR | NR | |

ANC: absolute neutrophil count; MCV: median corpuscular volume; BM: bone marrow; AML: acute myeloid leukemia; OS: overall survival; NR: not reached.

Sa A. Wang O. Pozdnyakova Haematologica, 2009; 94(1): 29-37

De aanwezigheid van kleine PNH klonen in andere subcategorieën van MDS werd recent gerapporteerd in een gelimiteerd aantal studies. *G. Kaiafa et al.*¹⁹ hebben de stalen van 90 MDS patiënten geanalyseerd met CD55/CD59 assay op de granulocyten (cut-off is niet vermeld). PNH klonen werden gedetecteerd in 15.5% MDS patiënten, waarvan in een significant aantal CMML patiënten en ook in andere subtypen van MDS met slechtere prognose (RAEB en RAEB-t). Te noteren is dat PNH klonen ook in 2.8% van gezonde mensen werden gedetecteerd. Het nadeel van die bovengenoemde studies is de bepaling van PNH klonen zonder het gebruik van FLAER- de meest sensitieve merker voor PNH testing. (zal verder besproken worden)

Recent werd een multicentrische “EXPLORE” studie uitgevoerd op 5.212 patiënten (EXamination of PNH bij Level Of CD59 on RED and white blood cells in patients with AA, MDS or other bone marrow failure syndromes).²⁶ PNH klonen werden bepaald met CD59 assay op RBC en de combinatie FLAER/CD24/CD14 op WBC, de cut-off was als 0.01% gedefinieerd. Deze studie toonde de aanwezigheid van PNH klonen van > 1% in 1.2% van de MDS patiënten (alle subtypen) en in 4.6% van patiënten met andere syndromen van beenmergfalen.

Kortom, de meeste studies zijn akkoord dat refractaire anemie het meest frequente subtype van MDS is dat geassocieerd is met klonale expansie van PNH en een betere prognose. De prognostische waarde van kleine klonen in andere subtypes van MDS en andere

beenmergfalen syndromen (oa myelofibrose) dient verder onderzocht te worden in prospectieve studies.

Routine screening van patiënten met andere subtypes van MDS of patiënten met andere myelopathieën (oa myelofibrose) *zonder klinische of biochemische evidentie van hemolyse* is voorlopig niet aangewezen door de International PNH Interest Group.

Progressie van RA naar klassieke PNH is nog niet beschreven, maar opvolging is toch aangewezen in de guidelines gezien de moeilijkheden in de onderscheiding tussen deze entiteit en AA. De opvolging van andere subtypes van MDS of MDS/MPD patiënten met kleine PNH klonen is niet aangewezen in de klinische praktijk (enkel in research settings) daar de mogelijkheid van progressie naar klassieke PNH quasi onbestaande is.

II. Wat is de reden voor PNH diagnostiek in UZ Leuven?

In het labo van UZ Leuven zijn in de periode van januari 2010 tem. december 2011 174 flowcytometrische PNH testen uitgevoerd (totaal 150 patiënten). De meeste aanvragen (62%) kwamen van de dienst hematologie kwamen, 14% van de testen werd gevraagd door niet-hematologische diensten en 24% van de aanvragen waren extern.

We hebben nagegaan wat de klinische triggers zijn om de PNH screening aan te vragen.

De voornaamste redenen waren: hemolytische anemie (19.7%), onverklaarde trombose op ongewone plaatsen, voornamelijk van abdominale venen (16.2%), beenmerg hypo- of aplasie (14.5%), anemie zonder hemolyse (12%), MDS (11.1%), pancytopenie met normale beenmerg cellulariteit (9.4%), auto- immuune hemolytische anemie (7.7%) en andere redenen (7.7%). (zie bijlage tabel 2 en 3)

Tijdens diezelfde periode in 2010-2011 werden 65 nieuwe MDS diagnoses gesteld, waarvan 21 RA/RCMD; beenmerghypoplasie of -aplasie werd bij 9 patiënten gediagnosticeerd. We hebben alle nieuwe gevallen van MDS en AA geanalyseerd om na te gaan hoe vaak PNH testen bij die patiënten gevraagd werden. Deze analyse toonde dat slechts 6/65 nieuwe MDS patiënten voor PNH gescreend werden, waarvan geen enkele patiënt met RA/RCMD. De situatie was beter bij de nieuwe AA patiënten: in de 6 van 9 patiënten werd PNH screening uitgevoerd.(zie bijlage tabel 4) Deze bevindingen ondersteunen het vermoeden dat subklinische PNH hoogwaarschijnlijk onderdiagnosticeerd blijft.

Van de 174 uitgevoerde PNH analyses waren 24 testen (14 patiënten) positief. Van de 14 patiënten met een positieve PNH test, hadden 11 patiënten (78.6%) aplastische anemie en pancytopenie, 2 patiënten (14.3%) pancytopenie met normale beenmergmorfologie (waarvan één met klassieke PNH en de andere met een zeer kleine klone) en 1 patiënt (7.1%) had bicytopenie met normale beenmergmorfologie en klassieke PNH. Van de 11 PNH⁺ AA

patiënten waren er 6 patiënten met kleine klonen (0.3-7%) die geen hemolyse vertoonden, terwijl de 5 patiënten met grote(re) klonen (23-98%) tekens van chronische laaggradige tot sterke hemolyse hadden. Bij één patiënt met pancytopenie en sepsis werd een zeer kleine klone (0.13%) gedetecteerd. Deze patiënt had normale beenmergmorfologie en verdere reëvaluatie gaf een negatief resultaat. (zie bijlage tabel 5)

Het vinden van pancytopenie en hypoplastisch beenmerg bij de meeste patiënten met PNH klone stemt overeen met de literatuurgegevens over de frequente associatie van PNH met aplastische anemie. Tot nu toe hebben we geen PNH klonen gevonden bij MDS patiënten. Maar het aantal van geteste MDS patiënten (13/2jaar) is laag om een conclusie te trekken.

III. Flowcytometrische PNH analyse van RBC: wanneer geïndiceerd? Of volstaat analyse van granulocyten/ monocyten?

Flowcytometrische diagnose van PNH (algemeen).

PNH is een chronische ziekte die jaren persisteert en grote impact heeft op de kwaliteit van leven en mortaliteit. Daarom is de correcte diagnose zeer belangrijk voor een effectieve management van de patiënt.

Flowcytometrie is een sensitieve en specifieke methode die tegenwoordig als een gouden standaard in de diagnose van PNH wordt beschouwd. Daar PNH een zeldzame ziekte is en relatief infrequent wordt getest, verschilt de aanpak in de detectie van PNH klonen significant tussen de laboratoria.

Historisch werd de eerste flowcytometrische detectie van PNH klonen uitgevoerd op RBC met 2 merkers: CD55 en CD59. Maar de bepaling van PNH klonen op RBC is beïnvloed door transfusie en/of hemolyse en daarom is de juiste grootte van PNH klone moeilijk in te schatten. Om die reden wordt WBC assay beschouwd als de beste methode voor de evaluatie van de grootte van PNH klone. Lymfocyten zijn niet geschikt omwille van lange life span en variabele expressie van GPI- verankerde eiwitten. Granulocyten en monocyten zijn de meest geschikte cellijnen. Detectie van PNH klonen op twee cellijnen, monocyten en granulocyten, is *per se* niet noodzakelijk⁷, maar het testen van 2 cellijnen biedt bijkomende voordelen bij neutropenie of in zeldzame gevallen wanneer enkel granulocyten GPI- deficiënt zijn¹⁰. Dus, simultane testen van 2 cellijnen verhoogd de betrouwbaarheid van de diagnose en wordt tegenwoordig aanvaard als de beste strategie⁷.

Er zijn tal van merkers die gebruikt worden voor de diagnose van PNH. De meest frequent gebruikte zijn: CD55 en CD59 op RBC en WBC (historisch); CD16, CD24, CD66b op granulocyten; CD14 op monocyten. Andere merkers, zoals CD48 en CD157, kunnen ook gebruikt worden op WBC, maar de ervaring hierrmee te werken is beperkt.

Iedere merker heeft zijn voor- en nadelen. CD55 en CD59 geven een minder goed onderscheid tussen positieve en negatieve populaties, ze hebben grotere variatiecoëfficiënt en detecteren kleinere klonen dan CD16 of CD66b. CD16 is afwezig op eosinofielen en kan ook gemist worden in geval van myelodysplasie. Bovendien bestaan er polymorfe varianten van CD16 waardoor is de herkenning door enkele anti-CD16 onmogelijk is. CD14 is afwezig op onrijpe monocyt en dendritische cellen en daarom is zijn waarde in de detectie van kleine klonen beperkt. Om de bovengenoemde redenen moet iedere cellijn altijd met 2 merkers geanalyseerd worden.

Een alternatieve nieuwe merker is recent ontwikkeld: zogenaamde FLAER, een fluorochroomgeconjugeerde derivaat van het bacteriële toxine, aerolysine. Aerolysine bindt zich aan GPI-anker van normale cellen waardoor de cel gelyseerd wordt. PNH cellen, die GPI- anker missen, worden gespaard. FLAER bindt zich aan GPI- anker van normale cellen, maar lyseert de cellen niet zodat de PNH cellen en normale cellen (positieve en negatieve populaties) van elkaar gescheiden kunnen worden. Verschillende studies hebben bewezen dat FLAER de meest sensitieve merker is voor de detectie van PNH klonen. *R. Sutherland et al.*¹⁰ hebben in hun studie op meer dan 500 stalen (nov 2005-dec 2009) de accuraatheid van de detectie van PNH klonen met FLAER op monocyt en granulocyt vergeleken met de traditionele CD59-gebaseerde methode op RBC. In deze studie detecteerde FLAER PNH klonen in 11.8% van de stalen, terwijl de CD59 assay PNH klonen detecteerde in enkel 6.2%. Opmerkelijk was dat zowel in monocytair als in granulocytair cellijnen het percentage van PNH cellen vergelijkbaar was, terwijl de CD59 assay op RBC altijd kleinere klonen toonde. De voordelen van FLAER tov CD55/CD59 assay op RBC zijn: betere sensitiviteit (0.5-1% versus 3%), betere accuraatheid in de detectie van de juiste grootte van PNH klonen (geen invloed van hemolyse en/of transfusie) en minder vals positieve resultaten¹⁰. In een andere studie was de onderste limit van betrouwbare detectie van PNH klonen met FLAER als 0.1% bepaald.⁶ Omwille van directe binding aan het GPI- anker is de FLAER assay minder gevoelig aan de maturatie status van de WBC. Om deze reden is FLAER nuttig in gevallen wanneer de expressie van GPI- verankerde eiwitten verminderd is: MDS, aanwezigheid van immature cellen in het perifere bloed, in post- stamceltransplantatie patiënten en bij systemische inflammatie⁶. FLAER is niet geschikt voor de detectie van PNH op erythrocyten. Enkele studies hebben het gebruik van andere merkers in vraag gesteld en adviseren FLAER als single merker voor de detectie van PNH klonen op mono- en granulocyt⁶. Maar de combinatie van FLAER met een andere GPI- specifieke merker (multiparameter FLAER- gebaseerde assay) wordt tegenwoordig beschouwd als de optimale strategie.

Tot voor kort bestonden er geen algemeen aanvaarde guidelines of aanbevelingen betreffende de keuze van monoklonale antistoffen, de “gating” strategie en de staalpreparaties. Meerdere laboratoria hebben hun eigen procedures opgesteld voor de diagnose van PNH en

gepubliceerde gegevens over de directe vergelijking van deze methoden zijn zeer schaars. Het gebruik van een antistof/combinatie werd grotendeels bepaald door de individuele keuze van het labo en door de gewoonte ermee te werken. Uit de analyse van EQC is gebleken dat zowel vals positieve als vals negatieve resultaten geen uitzondering waren. Kortom, er bestaat een dringende noodzaak voor een consensus over de flowcytometrische diagnose van PNH.

Om dit probleem op te lossen heeft Clinical Cytometry Society Annual Scientific Meeting in Portland, Oregon (2008) de consensus guidelines opgericht⁷. Alhoewel de aanbevelingen evidence gebaseerd zijn, berust dit document ook op de collectieve ervaring van de participanten en op enkele niet-gepubliceerde gegevens dat bepaalde procedures of reagentia beter zijn dan anderen.

De algemene principes van staal conditionering zijn opgesomd in tabel 6 (zie bijlage).

Het staal van keuze voor flowcytometrie is perifere bloed (EDTA of heparine). Beenmerg is weinig geschikt door de aanwezigheid van immature cellen met verminderde expressie van GPI- verankerde eiwitten waardoor een moeilijke interpretatie. De test moet uitgevoerd worden op WBC binnen 24-48 uur na bloedafname en binnen 48 uur op RBC (bij bewaring in de koelkast is de RBC assay mogelijk tot 7 dagen na bloedafname).

Het doel van de flowcytometrie is de detectie van PNH klonen, de bepaling van het percentage (grootte) van PNH klonen en de detectie van type II PNH cellen (op erythrocyten).

In de guidelines zijn twee methoden (routine methode en hoog sensitieve methode) apart beschreven.

Routine methode op WBC.

De routine methode is bruikbaar voor de detectie van grote PNH klonen ikv klassieke PNH. Zoals vroeger gezegd, zijn WBC (granulocyten en monocytten) de meest geschikte cellen voor de bepaling van de grootte van PNH klonen. Collectie van 5 000- 10 000 cellen is voldoende voor de detectie van een PNH klonen van 1%; voor de monocytten is een lagere aantal cellen aanvaardbaar. “Stain-then-lyse” procedure van staalvoorbereiding is het meest aangeraden, want “light scatter” parameters zijn beter bewaard dan wanneer het staal eerst gelyseerd en vervolgens gekleurd wordt.

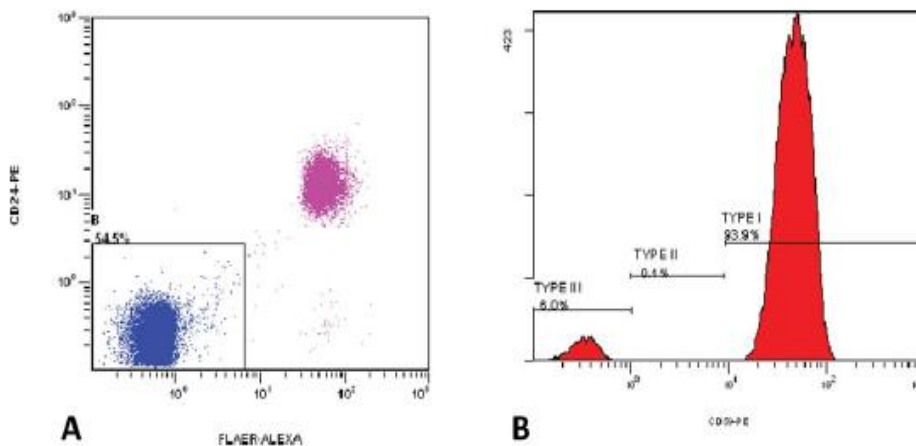
“Gating” is zelden een probleem bij de routine analyse. Bij de grote klonen is de gating met SSC/FSC of SSC/CD45 meestal voldoende om granulocyten en monocytten te identificeren. Maar in geval van monocytopenie of MDS (hypogranulatie van neutrofielen) zijn andere lineage specifieke merkers (CD15, CD33 op granulocyten; CD64, CD33, CD163 op monocytten) noodzakelijk om de twee cellijnen van elkaar te scheiden. Andere factoren die de gating en de interpretatie bemoeilijken zijn: > 48 uur oud staal (aspecifieke binding van antistoffen), aanwezigheid van immature cellen met zwakke(re) expressie van GPI- verankerde eiwitten en granulocytopenie met relatief verhoogd aantal eosinofielen.¹³

Specifieke merkers.

In de routine analyse is het mogelijk FLAER te gebruiken als een single merker, maar in de meeste gevallen wordt het gebruik van 2 merkers beschouwd als de beste strategie (figuur A).

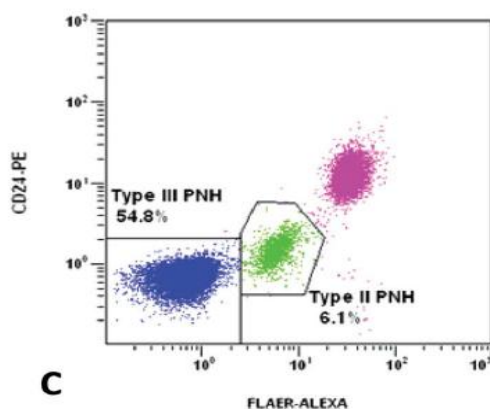
De mogelijke combinaties zijn: FLAER/CD24, FLAER/CD66b, FLAER/CD16 op granulocyten; FLAER/CD14 op monocyten. De combinatie van CD55/CD59 op WBC is niet meer aanbevolen in de consensus guidelines.

PNH klonen,bepaald op granulocyten en monocyten, zijn meestal vergelijkbaar; soms zijn PNH klonen op monocyten groter en de betekenis ervan is niet bekend. Als regel zijn PNH klonen op WBC altijd groter dan de klonen die op RBC zijn bepaald. (zie figuur A en B)



- A. Dot plot: FLAER/CD24-PE assay op granulocyten (PNH klone 54.5%). B. Single color histogram (dezelfde patient): CD59-PE assay op RBC (PNH klone 6%)
Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders bij flow cytometry. M.J. Borowitz, F.E. Craig, Cytometry Part B (Clinical Cytometry), 2010; 788: 211-230.

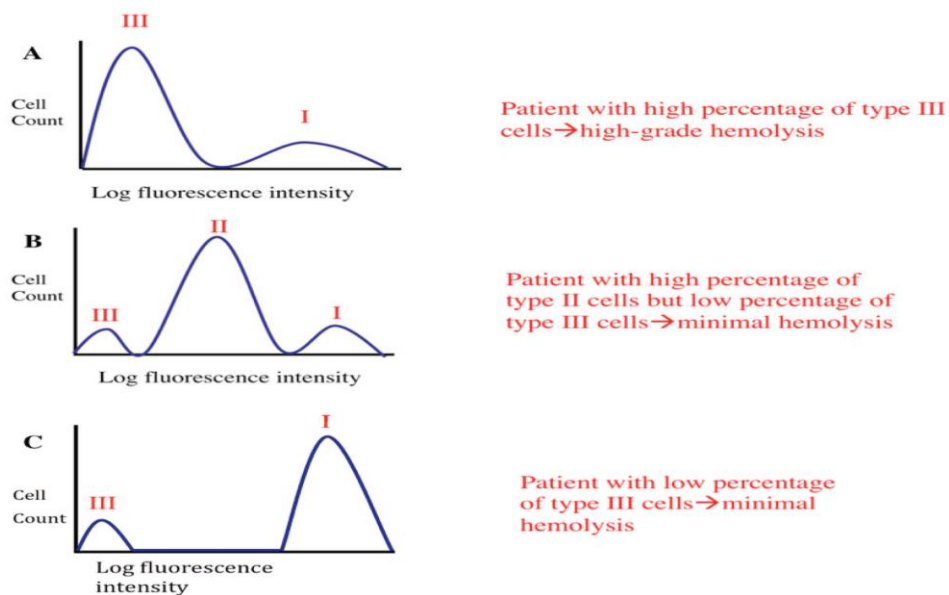
Occasioneel kan type II granulocyten gedetecteerd worden met FLAER, maar de betekenis van deze cellen is niet bekend. (zie figuur C) De totaal PNH klone is een som van type II en type III cellen.



- C. FLAER/CD24 assay op granulocyten. (type II PNH 6.1%, type III PNH 54.8%, totaal klone 60.9%)
Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders bij flow cytometry. M.J. Borowitz, F.E. Craig, Cytometry Part B (Clinical Cytometry), 2010; 788: 211-230.

Routine methode op RBC.

RBC assay als enige methode is niet aanbevolen door de invloed van transfusie of hemolyse op grootte van de PNH klone. Bvb, een significante PNH klone op RBC is nooit gezien zonder detecteerbare klone op WBC. Maar het testen van RBC is belangrijk om 2 redenen: 1) detectie van type II erythrocyten 2) vergelijken van de grootte van PNH klone op RBC en WBC.^{1,10,29,31} Identificatie van type II RBC heeft een klinisch belang omdat deze cellen meer resistent zijn aan hemolyse. Bvb, een patiënt met een grote populatie van type II PNH cellen heeft weinig hemolyse en geen transfusienood in vergelijking met een andere patiënt die hetzelfde percentage van type III PNH cellen heeft³².



Management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in the era of complement inhibitory therapy.
C. J. Parker, Hematology, 2011: 21-29.

RBC analyse en interpretatie van CD59/CD55 expressie is een meer complexe probleem.

De procedure van staalvoorbereiding heeft enkele bijzonderheden: geen lysestap, zorgvuldige wasbeurt na de kleuring en de procedures om agglutinatie van RBC te vermijden (zie hieronder).

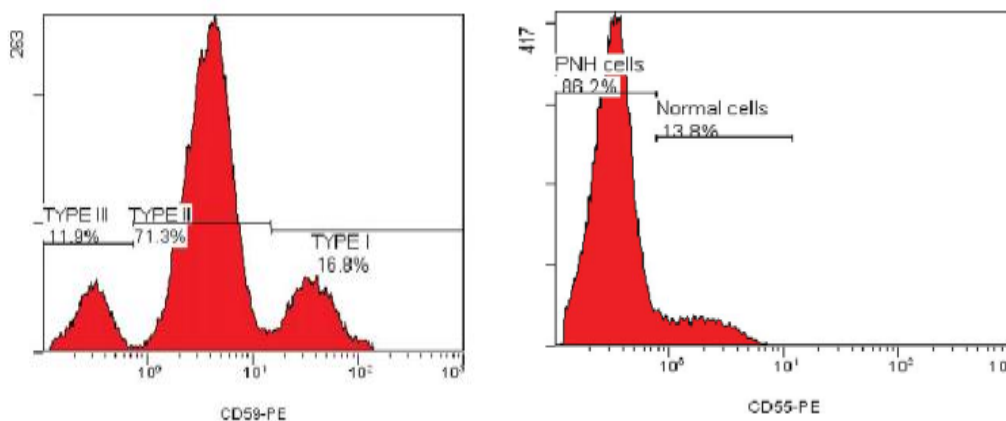
Collectie van 5 000 cellen is voldoende voor de detectie van een PNH klone van 1%. SSC/FSC kan gebruik worden voor de identificatie van RBC. Een lineage specifieke merker, glycoforine A (CD235a), helpt de populatie van RBC te onderscheiden van andere cellijnen en debris. De concentratie van glycoforine A op erythrocyten is zeer hoog, daarom kan het gebruik van gesatureerde concentraties van CD235a de agglutinatie teweegbrengen. De agglutinatie is meestal sterker met CD235a-PE dan met CD235a-FITC en hogere diluties dan bij flowcytometrie op het beenmerg zijn nodig om aggregatie te vermijden^{7,10}. Volgens de guidelines is het niet mogelijk een specifieke concentratie te adviseren. Elk labo moet de gekozen klone van het antistof en het gekozen fluorochroom evalueren om de optimale

concentratie uit te vinden, waarbij een acceptabel positieve signaal aanwezig is zonder agglutinatie van RBC.

Specifieke merkers.

CD59 en CD55 zijn twee merkers die worden gebruikt om PNH klonen op RBC op te sporen.

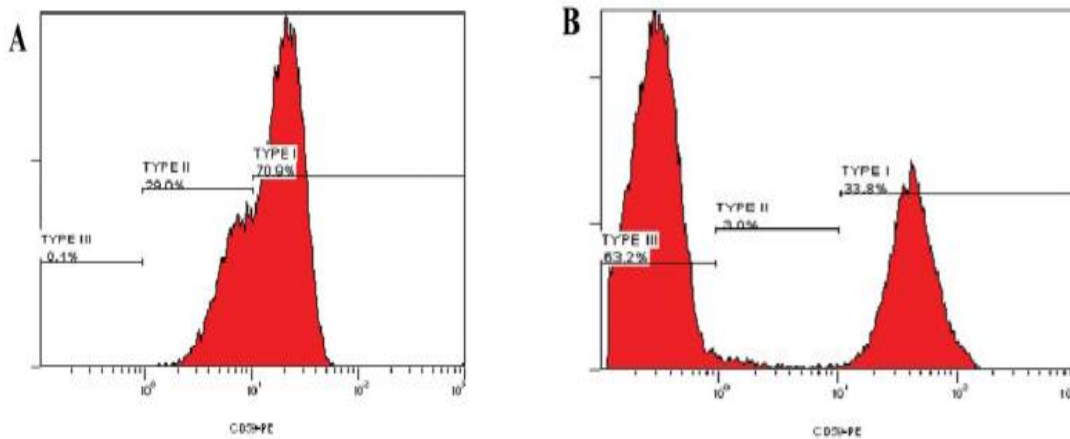
De expressie van CD59 op RBC is hoog, daarom heeft de combinatie van deze merker met verschillende fluorochromen een behoorlijke detectie van PNH klonen. Toch, zijn enkele CD59 klonen superieur dan andere in de scheiding van type II en type III cellen (niet gespecificeerd in de guidelines). De expressie van CD55 is zwakker en de scheiding van type II en type III cellen is onaanvaardbaar. (zie hieronder) De bijkomende waarde van deze merker in de routine analyse blijft controversieel en het gebruik van CD55 alleen is niet aanbevolen. Indien het wordt gebruikt, gaat de voorkeur naar CD55-PE⁷.



Links. CD59-PE assay op RBC: type II cellen 71.3%, type III cellen 11.9%. Rechts. CD55-PE assay op RBC (hetzelfde staal): enkel type III cellen 86.2%.

Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders bij flow cytometry. M.J. Borowitz, F.E. Craig, Cytometry Part B (Clinical Cytometry), 2010; 788: 211-230.

Bij meerkleuren analyse (meerdere merkers in één tube) is de titratie van antistoffen essentieel om de agglutinatie te minimaliseren. Het labo moet kiezen voor zo laag mogelijk concentraties van antistoffen met een acceptabele ratio van positieve en negatieve fluorescentie en een duidelijke scheiding van de celpopulaties. Andere mogelijke oorzaken van RBC agglutinatie en vals positieve resultaten zijn inadequate menging en aerosol vorming tijdens het pipetteren.¹⁰ Bovendien kunnen koude agglutinen er een oorzaak van zijn.¹⁰ Een exces aan fluorochroom of niet-specifieke binding ervan maken de detectie van type III cellen moeilijk: daarom is het wassen van RBC een zeer belangrijke stap. (zie figuur A en B)



Effect van het wassen van RBC gekleurd met CD59-PE. A. ongewassen RBC B. na het wassen.

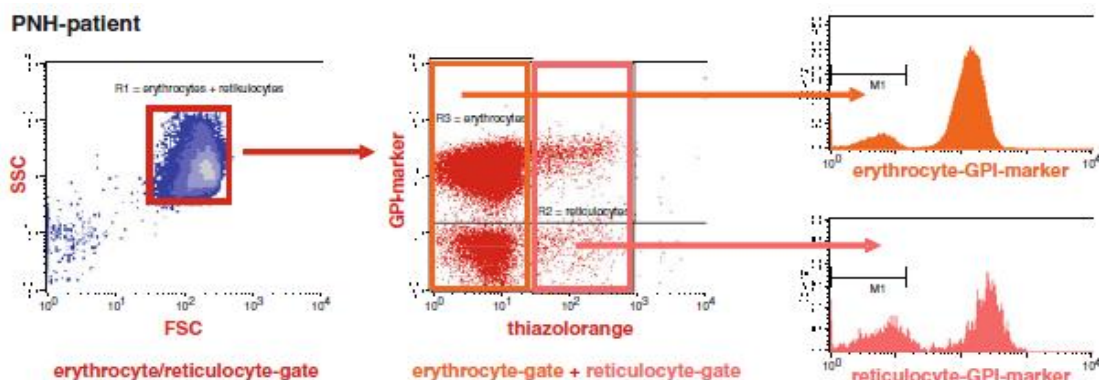
Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders bij flow cytometry. M.J. Borowitz, F.E. Craig, Cytometry Part B (Clinical Cytometry), 2010; 788: 211-230.

Het proces van identificatie van type II cellen is nog niet gestandaardiseerd. Een negatieve controle (ongekleurd staal) wordt aangeraden om de positie van type III cellen te bepalen. Bij de menging van een negatieve controle met een normaal gekleurd staal wordt de positie van type II cellen bepaald als een regio tussen de positieve en de negatieve populatie.

PNH klonen kunnen weergegeven worden met een “single- color histogram” of met een “dot-plot”. De laatste is beter bij kleine(re) klonen en heeft de voorkeur in de meerkleuren analyse.

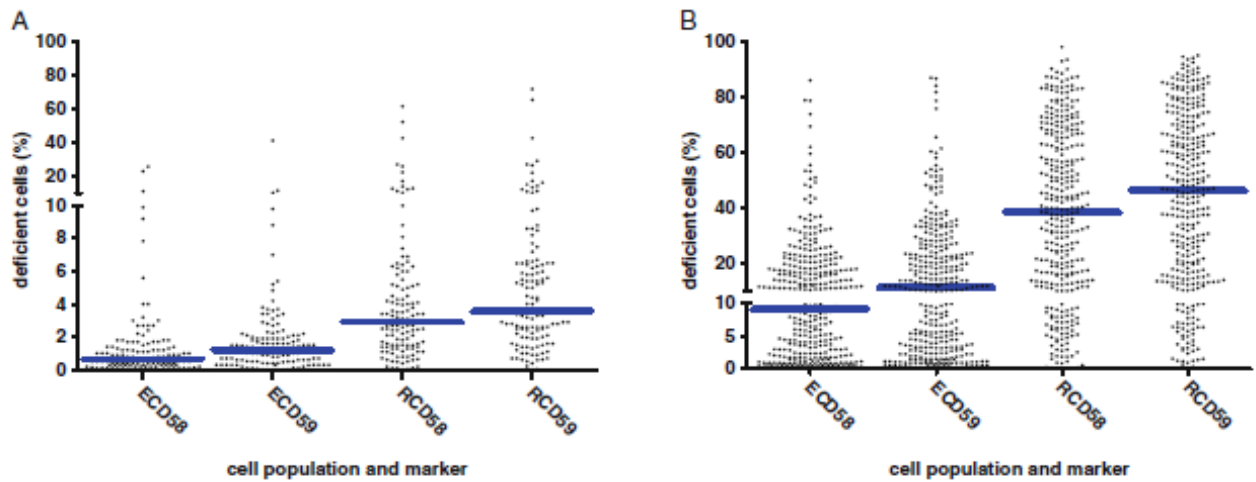
Target cellen, gating strategie en nodige reagentia zijn opgesomd in tabel 7 (zie bijlage).

Recent is er in de literatuur een artikel verschenen over de detectie van PNH klonen op reticulocyten. De auteurs hebben in de periode van maart 2003 tot augustus 2008 1,296 PNH testen uitgevoerd met CD58/CD59 assay op reticulocyten en erythrocyten. Een speciale RNA kleurstof, thiazol oranje, werd gebruikt om de populatie van reticulocyten te identificeren. Volgens deze studie is de CD58/CD59 assay op reticulocyten meer sensitief dan die op erythrocyten (vooral bij klonen <10%) en zijn de PNH klonen op reticulocyten altijd groter. De verklaring is de mindere invloed van transfusie/hemolyse.



Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH): higher sensitivity and validity and serial monitoring by flow cytometric analysis of reticulocytes.

B. Höchsmann, M. Rojewski, Ann Hematol., 2011; 90: 887-899.



Scatter blots with marker deficient cells in percent in patients with $\geq 10\%$ GPI-deficient granulocyte population (B) and in patients with $< 10\%$ GPI-deficient granulocyte population (A). ECD58=CD58-deficiency on erythrocytes, ECD59=CD59 deficiency on erythrocytes, RCD58=CD58 deficiency on reticulocytes, RCD59=on reticulocytes.

Blue line median size of GPI-deficient population.

Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH): higher sensitivity and validity and serial monitoring by flow cytometric analysis of reticulocytes.

B. Höchsmann, M. Rojewski, Ann Hematol., 2011; 90: 887-899.

Dat is de eerste studie over de PNH screening op reticulocyten en deze methode dient verder onderzocht te worden in andere studies. CD59(CD55) assay op RBC blijft voorlopig aanbevolen door de guidelines.

Hoog sensitieve assay (HSA).

In de literatuur bestaat er minder consensus over de beste methodologie en het nut van deze assay is controversieel.

Hoog sensitieve methode is niet nodig voor de diagnose van klassieke PNH, maar wordt gebruikt voor de detectie van kleine klonen ikv sc-PNH in AA of MDS-RA patiënten. De onderste limit van de sensitiviteit voor de detectie van PNH op granulocyten is nog niet gedefinieerd. Bij de extrapolatie van andere “rare-event” analyses blijkt dat de sensitiviteit 0.01% of even lager haalbaar is. Gepubliceerde studies over RBC assay suggereren de analytische sensitiviteit van 0.005%.

De belangrijke determinanten van een “rare-event” analyse zijn het aantal geanalyseerde events en het vermogen in de discriminatie tussen positieve en negatieve populaties.

De collectie van een groter aantal cellen dan bij routine analyse ($\approx 200\ 000$) is vereist om 0.01% van PNH cellen te identificeren. *Poisson statistica* kan gebruikt worden om de minimale “error rate” te berekenen bij een gegeven aantal geanalyseerde cellen en een bepaald cut-off. Zo, bij de analyse van 200 000 cellen met als doel 0.005% van PNH cellen te detecteren, zouden 4 (of meer) events meer dan 99% van abnormale populatie correct identificeren. De specificiteit is afhankelijk van een achtergrond van de frequentie van PNH

cellen in gezonde mensen. Volgens gepubliceerde gegevens varieert deze frequentie aanzienlijk met een range 5-60 PNH cellen op 1 miljoen cellen en een gemiddelde van 18/ miljoen. Verschillende technische factoren kunnen invloed hebben op de gerapporteerde resultaten. Vooraleer HSA te implementeren moet een labo de achtergrond van PNH cellen in de normale populatie bepalen en geschikt aantal geanalyseerde cellen en cut-off selecteren.

HSA op RBC.

Daar meer geanalyseerde cellen nodig zijn voor HSA, hebben RBC, volgens de guidelines, de voorkeur door een groot aantal events. Het gebruik van enkel “light scatter” parameters voor de gating is geen correcte strategie in de HSA, want fragmentocyten en debris kunnen vals positief resultaat geven. Daarom is het gebruik van glycoforin A essentieel. FITC gelabelde glycoforin A (CD235a-FITC) is superieur tov CD235a-PE voor de identificatie van RBC⁷. Verschillende studies hebben getoond dat CD59 superieur is dan CD55 voor de detectie van kleine PNH klonen^{5,6} en CD59-PE wordt beschouwd als de beste merker in HSA. Het relatieve voordeel van gecombineerde CD59/CD55 assay is nog niet goed bestudeerd. De combinatie van CD59 en CD55 met verschillende fluorochromen (één tube analyse) of met hetzelfde fluorochroom zijn mogelijk, maar simultaan gebruik van twee merkers kan de aggregatie van RBC ten gevolge hebben. Men moet zich in acht nemen dat de concentratie van CD59 en CD55 verschillend kan zijn afhankelijk van het feit dat ze tezamen, individueel of in combinatie met glycoforin A gebruikt worden.

HSA op WBC.

Voor de gating strategie op WBC geldt hetzelfde principe: de combinatie van “light scatter parameters” of CD45 met lineage specifieke merkers: CD15 of CD33 op granulocyten en CD33 (sterkere expressie) of CD64 op monocyten. Er zijn geen strikte aanbevelingen wat betreft de keuze van merkers voor WBC assay en een variabiliteit in de aanpak is voorlopig aanvaardbaar. Toch hebben de meeste auteurs de significante ervaring met FLAER/CD24 op granulocyten en FLAER/CD14 op monocyten. Een studie toonde echter slechte sensitiviteit van CD14 bij de detectie van kleine (<1%) PNH klonen en de combinatie FLAER/CD55 detecteerde het best kleine klonen op monocyten⁶. Toch blijft voorlopig FLAER/CD14 de meest aangewezen combinatie voor de detectie van PNH klonen op monocyten.

In de guidelines wordt er ook de noodzaak van het gebruik van twee GPI- specifieke merkers onderlijnd om vals positieve resultaten te vermijden. FLAER is een bijzonder nuttige merker. Bvb, bij de contaminatie van granulocyten met enkele monocyten die normaal CD24 missen, kan men deze cellen verwarren met een kleine PNH populatie. Combinatie van CD24 en FLAER, waarbij PNH populatie dubbel negatief is, verhoogd de accurateheid van de analyse. De mogelijke combinaties van merkers voor HSA zijn opgesomd in Appendix A.

Er zijn nog tal van vragen die beantwoord moeten worden:

1. Moeten de patiënten met andere typen MDS of een myeloproliferatieve ziekte gescreend worden naar PNH?
2. Kan FLAER gebruikt worden als essentiële merker in alle combinaties in WBC assay?
3. Welke merker is beter dan CD14 op monocytten of CD24 op granulocyten? Bestaat er een single betrouwbare merker om de PNH cellen op beide cellijnen te identificeren (in combinatie met FLAER)?
4. Kan een simpele en reproduceerbare HSA op RBC aangeraden worden om de PNH uit te sluiten en wat is de beste combinatie van merkers?
5. Wat zijn de limieten van inter-laboratoria reproduceerbaarheid van HSA?
6. Wat is de betekenis van type II granulocyten en grotere PNH klonen op monocytten (ivm PNH klonen op granulocyten) en kan dat klinische implicaties hebben?

In de guidelines is de speciale klemtoon gelegd op het nut van de kwaliteitscontrole. Tot nu toe bestaan er geen externe kwaliteitscontrole data, inter- of intra- laboratorium studies over de reproduceerbaarheid en precisie van detectie van kleine PNH klonen.

Normaal staal moet altijd gebruikt worden voor interne kwaliteitscontrole om de reactiviteit van reagentia te testen en om te tonen dat 100% van normale cellen de expressie van GPI-anker hebben. Ongekleurd normaal staal kan helpen de positie van PNH⁺ cellen te herkennen. Maar de meest gebruikte merkers en FLAER zijn in staat de PNH⁺ en PNH⁻ populaties duidelijk van elkaar te scheiden.

Het gebruik van een positieve controle is niet haalbaar voor de meeste labo's door infrequent uitvoeren van de test. Bovendien, is er geen commercieel QC materiaal beschikbaar voor de klinische labo's. Bevroren aliquot van gesuspenderde in 20-25% sucrose/dextrose PNH⁺ erythrocyten is stabiel voor onbepaalde duur en kan gebruikt worden als een positieve controle. Er is een Nederlandse externe kwaliteitscontrole programma beschikbaar (SKML) voor PNH testing.

Ten slotte, inter-laboratorium uitwisseling van data kan zeer nuttig zijn voor diegenen die hoog sensitieve flowcytometrie gebruiken en voor de labo's die PNH test zeldzaam uitvoeren.

Conclusie.

1. Alle AA en MDS-RA patiënten moeten gescreend worden naar de aanwezigheid van sc-PNH ongeacht de aanwezigheid van hemolyse omdat de detectie van PNH klonen prognostische en klinische implicatie heeft.
2. Regelmatige monitoring van de grootte van PNH klone bij de patiënten met klassieke PNH en opvolging van AA en MDS-RA patiënten (minstens jaarlijks) is strikt aanbevolen.
3. Multiparameter FLAER-gebaseerde flowcytometrie op WBC (monocytten en granulocyten) is de beste strategie voor de diagnose van klassieke PNH en de bepaling en/of opvolging van de grootte van PNH klone.
4. RBC assay is minder sensitief, meer gevoelig aan technische factoren (wassen, pipetteren, titratie van antistoffen) en moeilijker te interpreteren door mogelijke agglutinatie van erythrocyten. RBC assay kan een bijkomende waarde hebben ikv een positieve PNH test op WBC om type II erythrocyten te identificeren.

Tevens is het bepaling van type II cellen nog niet gestandaardiseerd. Het is ook niet duidelijk welke implicaties deze bepaling zou hebben op de klinische beslissing over het starten van *eculizimab*.

5. Hoog sensitieve assay is nuttig voor de detectie en opvolging van zeer kleine (<1%) PNH klonen ikv sc-PNH. De voordeel van CD59/CD55 HSA op RBC tov FLAER-gebaseerde assay op WBC is niet duidelijk.

COMMENTS

1. Global register voor PNH patiënten: www.pnhregistry.org een recente initiatief om alle nieuwe PNH patiënten te laten registreren.
2. Internet web sites:
 - www.pnhsource.com leermateriaal over de symptomen en diagnose van PNH
 - www.ukneqasli.org en www.cap.org informatie over de EQC schema's
 - www.pnhregistry.org details over het global PNH register

TO DO/ACTIONS

1. EKE programma (SKML): inschrijven?
2. Overleg clinici: bijaanvraag PNH analyse?
3. Overleg clinici: is de bepaling van type II RBC klinisch relevant? Wat zijn de triggers voor behandeling?

BIJLAGEN

TABEL 1.

Clinical Indications for PNH Testing

| |
|--|
| Intravascular hemolysis as evidenced by hemoglobinuria or elevated plasma hemoglobin |
| Evidence of unexplained hemolysis with accompanying: Iron-deficiency, OR Abdominal pain or esophageal spasm, OR Thrombosis (see below), OR Granulocytopenia and/or thrombocytopenia |
| Other acquired Coombs'-negative, non-schistocytic, non-infectious hemolytic anemia |
| Thrombosis with unusual features: Unusual sites Hepatic veins (Budd-Chiari syndrome) Other intra-abdominal veins (portal, splenic, splanchnic) Cerebral sinuses Dermal veins |
| With signs of accompanying hemolytic anemia (see above) |
| With unexplained cytopenia |
| Evidence of bone marrow failure: Suspected or proven aplastic or hypoplastic anemia Refractory cytopenia with unilineage dysplasia Other cytopenias of unknown etiology after adequate workup |

Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders bij flow cytometry. M.J. Borowitz, F.E. Craig, Cytometry Part B (Clinical Cytometry), 2010; 788: 211-230.

Tabel 2. PNH testen in UZ Leuven (januari 2010- december 2011)

| Diensten | Aantal | % | Positieve |
|-------------------|------------|----|-----------|
| Hematologie | 108 | 62 | |
| Externe aanvragen | 42 | 24 | |
| Andere diensten | 24 | 14 | |
| Totaal stalen | 174 | | 24 |
| Totaal patiënten | 150 | | 14 |

Tabel 3. Reden voor PNH screening in UZ Leuven (januari 2010- december 2011)

| Reden voor screening | specifieke reden | aantal | totaal aantal | % |
|--|---------------------|--------|---------------|-------------|
| Hypo-/aplasie beenmerg | | | 17 | 14,5 |
| MDS | RA/RCMD | 6 | 13 | 11,1 |
| | RARS | 1 | | |
| | RAEB | 1 | | |
| | RAEB-t | 1 | | |
| | secundair MDS | 2 | | |
| | MDS/MPD | 2 | | |
| Coombs (-) hemolytische anemie | | | 23 | 19,7 |
| Trombose | | | 19 | 16,2 |
| Pancytopenie met N beenmerg (met of zonder hemolyse) | | | 11 | 9,4 |
| AIHA | | | 9 | 7,7 |
| Anemie zonder hemolyse | | | 14 | 12,0 |
| Andere | neutropenie | 2 | 9 | 7,7 |
| | metabool syndroom | 1 | | |
| | geïsoleerd hoog LDH | 2 | | |
| | levercirrose | 1 | | |
| | myelofibrose | 1 | | |
| | nierinfarct | 1 | | |
| | hematurie | 1 | | |
| Onduidelijk | | | 2 | 1,7 |
| Totaal | | | 117 | 100 |

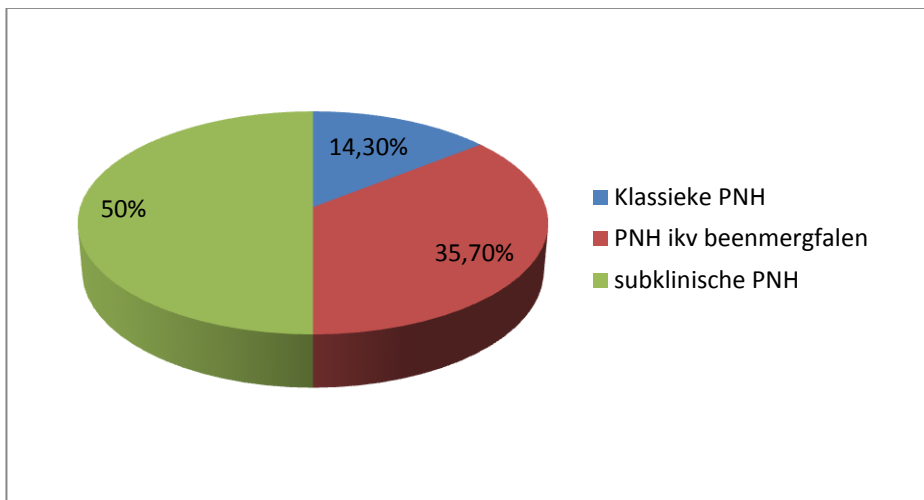
Tabel 4. Aantal nieuwe MDS en AA diagnoses en geteste patiënten in UZ Leuven (januari 2010- december 2011)

| | MDS | | Aplastische anemie | | | |
|---------------------|-----------|------------|--------------------|------------|----------|----------|
| | aantal pt | PNH getest | aantal pt | PNH getest | | |
| RA/RCMD | 21 | 0 | | | | |
| RARS | 4 | 0 | | | | |
| RCMD-RS | 4 | 0 | | | | |
| RAEB | 16 | 1 | | | | |
| RCUD-RT | 2 | 0 | | | | |
| RCC | 1 | 0 | | | | |
| MDS/MPD | 10 | 2 | | | | |
| hypoplastisch MDS | 2 | 0 | | | | |
| MDS-U | 3 | 0 | | | | |
| niet gespecificeerd | 2 | 2 | | | | |
| totaal | 65 | 5 | | | 9 | 6 |

Tabel 5. PNH patiënten in UZ Leuven (januari 2010- december 2011)

| | CATEGORIE | | | TOTAAL |
|---------------------------------|---------------|------------------|---------|-----------|
| | Klassieke PNH | PNH ikv BM-falen | Sc-PNH | |
| aantal patiënten | 2 | 5 | 7 | 14 |
| aantal stalen | | | | 24 |
| grootte PNH klonen | 48-70% | 23-98% | 0,13-7% | |
| cytopenie | | | | |
| geïsoleerde anemie | 0 | 0 | 0 | 0 |
| bicytopenie (anemie+leucopenie) | 1 | 0 | 0 | 1 |
| pancytopenie | 1 | 5 | 7 | 13 |

PNH patiënten UZ Leuven (jan2010-dec 2011)



Sample Considerations

| Sample source | Peripheral blood (bone marrow not optimal) |
|---|---|
| Anticoagulant | EDTA, heparin, or ACD |
| Preferred sample volume | Minimum 1 ml; 3 ml adequate for most testing though more possibly needed if WBC very low |
| Maximum sample age | Up to 7 days for RBC; <48 h for WBC |
| Sample storage | 4 degrees after 24 h |
| Lysing reagent | For WBC, commercial lysing reagents have not been rigorously studied but no commercial reagent is known not to work; ammonium chloride a satisfactory alternative No lysing for RBC |
| Sensitivity in routine analysis | 1%; at least 5,000 events of specific cell type collected |
| High-sensitivity analysis | 0.01%; at least 250,000 events of specific cell type collected |
| Cell populations analyzed in routine analysis | Granulocytes in all cases; Monocytes provide confirmatory information. RBC in AT LEAST those cases with a PNH clone detected by WBC analysis, or in all cases. Routine analysis of RBCs alone not recommended. No role for analysis of lymphocytes. |

Table 6. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. M.J. Borowitz, F.E. Craig, *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)*, 2010; 788: 211-230.

Table 3
Antibodies Useful in PNH Testing

| Type of analysis | Target cell | Gating strategies | Informative reagents |
|------------------|---------------------------|--|---|
| Routine | Red cells Granulocytes | Log FSC/SSC; glycoprotein A optional CD45/SSC or CD15 (or equivalent)/SSC | CD59 (CD55) FLAER, CD24, CD66b, CD16 ^a ; two reagents preferred. CD55/CD59 combination not recommended. |
| | Monocytes | CD45/SSC or CD33/SSC ² or CD64/SSC or CD163/SSC ³ | FLAER, CD14, ^b CD48, ^c CD55, ^c CD157 ^c |
| High sensitivity | Red cells Granulocytes | Glycoprotein A+scatter CD15/SSC | CD59+/-CD55 in same or different colors FLAER, CD24, CD66b, CD16 ^a ; two reagents essential. CD55/CD59 combination not recommended; |
| | Monocytes | | See ^d |

^aPolymorphic variants and absence of CD16 from eosinophils may limit usefulness; should never be used as sole reagent.

^bCD14 is negative on dendritic cells and basophils that could be included in a monocyte gate, and is also dim or negative on immature monocytes, so should not be used as sole reagent; may be useful to combine with FLAER in dual parameter analysis, though FLAER may also be dim on normal basophils.

^cLimited experience with these reagents.

^dMonocytes may not be suitable for high sensitivity analysis because of the difficulty in collecting sufficient events, but if performed, lineage specific gating using CD33 or CD64, and FLAER plus another reagent is essential.

Table 7. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. M.J. Borowitz, F.E. Craig, *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)*, 2010; 788: 211-230.

APPENDIX A: ANTIBODY COMBINATIONS FOR DETECTING PNH WHITE BLOOD CELL CLONES

| | Cells | Colors | | | | | |
|----------|-------|--------------|-------------|-------------|----------|------|------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 3 color | Grans | FLAER | CD24 | CD15 | | | |
| 3 color | Monos | FLAER | CD14 | CD33 | | | |
| 4 color | Grans | FLAER | CD24 | CD15 | CD45 | | |
| 4 color | Monos | FLAER | CD14 | CD33 | CD45 | | |
| 4 color | G+M | FLAER | CD24 | CD14 | CD33 | | |
| 5 color* | G+M | FLAER | CD24 | CD14 | CD15/ 33 | CD45 | |
| 5 color | G+M | FLAER | CD24 | CD14 | CD15 | CD33 | |
| 6 color | G+M | FLAER | CD24 | CD14 | CD15 | CD33 | CD45 |

Markers shown in Bold are used to detect GPI-anchor deficient cells, while those shown in normal font are used for gating. Exact choice of fluorochromes (eg perCP Cy 5.5 vs. PE-TR for "color 3"), can vary. Also, fluorochromes for some reagents, especially gating reagents, may be switched. The five and six color combinations, and some of the four color combinations (e.g. FLAER/CD24/CD15/CD45) shown here will work well for high-sensitivity analysis.

*In this five-color combination, two tubes are necessary to detect both granulocytes and monocytes optimally; the combination of CD45, CD15, and SSC identifies granulocytes and can often isolate monocytes, but optimal identification of monocytes requires a second tube gated using CD33.

Appendix A. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. M.J. Borowitz, F.E. Craig, Cytometry Part B (Clinical Cytometry), 2010; 788: 211-230.