

Paroxysmale nachtelijke hemoglobininurie

Marina Mukovnikova

13.03.2012 UZ Leuven

Definitie

- PNH is een verworven chronische hemolytische anemie die ontstaat door een mutatie in het fosfatidyl-inositol-glycaan klasse A (PIG A) gen in hematopoëtische stamcellen
- Somatische mutatie \Rightarrow ziekte is niet erfelijk
- Meerdere cellijnen zijn aangedaan: erythrocyten, granulocyten, monoccyten, trombocyten

Epidemiologie

- Zeldzame ziekte
- Reële incidentie is onbekend, mogelijks onderschat
 - VS: 2-5 nieuwe gevallen/ miljoen inwoners
 - Nederland: 40-80 nieuwe gevallen/jaar
- Meest frequent bij volwassenen 30-50 jaar
- Gemiddelde leeftijd bij diagnose: 34 jaar, 10% van patiënten zijn jonger dan 21 jaar
- Zeer zeldzaam bij kinderen
- Man : vrouw ratio = 1: 1,2

Pathogenese

Multistep hypothese (Luzzatto - Young)

1. Somatische mutatie van PIG-A gen, gelokaliseerd op het X-chromosoom Xp22.1
 - > 100 mutaties gekend
 - meestal deleties of inserties
 - in klein aantal stamcellen van veel (of alle?) gezonde mensen
⇒ mutatie op zichzelf leidt niet tot PNH
2. Verlies van **glycosyl-phosphatidyl-inositol**-anker (GPI-anker)
⇒ geen expressie van eiwitten die via GPI- anker aan het membraan gebonden zijn
 - ten minste 20 GPI- verankerde eiwitten zijn gekend
 - functie: receptoren, bloedgroepantigenen, enzymen, adhesiemoleculen, complementregulatoren (CD59 en CD55)

Pathogenese

- **CD55** (**DAF**= decay acceleration factor) versnelt de destructie van membraangebonden C3 convertase
 - **CD59** (**MIRL**= membrane inhibitor of reactive lysis) zorgt voor de bescherming van het membraan van lytisch C5-C9 complementcomplex
3. Door gebrek aan CD55 en CD59 zijn RBC bijzonder gevoelig voor afbraak door complementsysteem ⇒ chronische intravasale hemolyse,_meest uitgesproken
- bij daling van pH (meestal 's nachts)
 - bij infectie, inflammatie, zwangerschap

Pathogenese

4. Klonale selectie door:

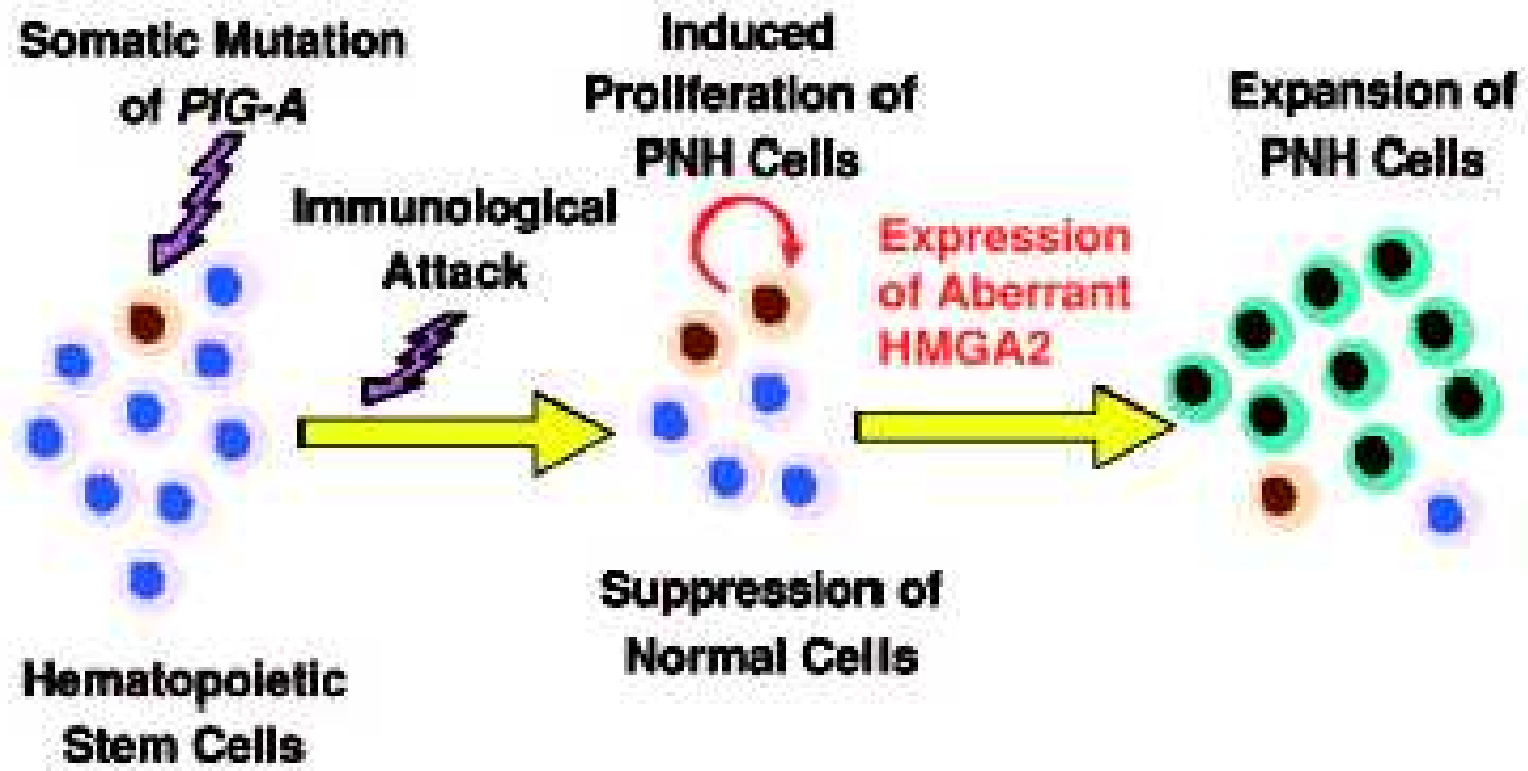
- resistentie aan apoptose \Rightarrow preferentiële selectie van GPI-deficiënte cellen bij de beenmergonderdrukking op immunologische basis

(frequente associatie met idiopathische aplastische anemie!)

5. Klonale expansie

- mechanisme is niet duidelijk
- bijkomende mutatie van GPI-deficiënte stamcellen?

Pathogenesis



Onderverdeling van de PNH cellen

1. **type II** (gedeeltelijke ontbreken van GPI-anker)
 - overlevingsduur van RBC is \approx 45 dagen afhankelijk van CD59 expressie
 2. **type III** (volledige ontbreken van GPI-anker)
 - overlevingsduur van RBC is $<$ 20 dagen (versus 120 dagen van normale RBC)
 3. **type I** zijn normale cellen
- ✓ Congenitale deficiënties van CD55 en CD59 zijn beschreven:
- CD55 deficiëntie- geen hemolyse
 - CD59 – kliniek is gelijk aan PNH met hemolyse en trombose

Klinische presentatie

1. Intravasculaire hemolyse en gerelateerde symptomen:

- **Coombs negatieve hemolytische anemie** = klinisch kenmerk
- hemoglobinurie en donkere ochtendurine (niet bij alle patiënten)
- chronische of acute nierinsufficiëntie (hemosiderine depositie en tubulaire dysfunctie)
- abdominale of slokdarmkrampen, erectiele dysfunctie bij mannen (NO wordt opgevangen door vrij Hb)

2. Veneuze trombose met ongewone lokalisatie:

- mesenteriale en hepatische venen (Budd- Chiari syndroom)
- cerebrale sinussen, cutane venen
- arteriële trombose

3. Cytopenie en beenmerghypoplasie tot ernstige aplastische anemie

Klinische presentatie

TABLE

Clinical symptoms in diagnosis

Symptoms	Frequency (percent)
Anemia	35
Hemoglobinuria	26
Hemorrhages	18
Aplastic anemia	13
Gastrointestinal symptoms	10
Hemolytic anemia and jaundice	9
Iron deficiency anemia	6
Thromboembolic disease	6
Infections	5
Neurological symptoms	4

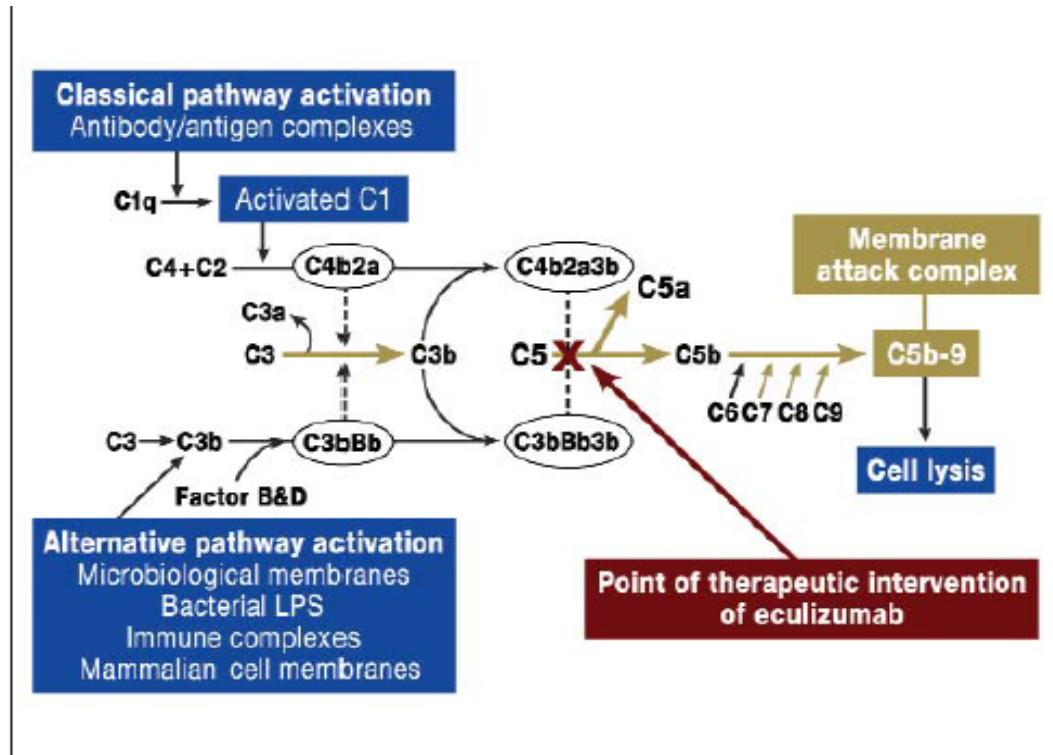
Bloedbeeld

- Normocyttaire of macrocytaire anemie
- Hemolyse parameters:
 - verlaagd haptoglobine
 - verhoogd LDH
 - verhoogd indirecte bilirubine
- Negatieve directe Coombs
- Geen fragmentocyten
- Frequent geassocieerde ijzerdeficiëntie

Diagnose

1. Complement- gebaseerde testen:
 - **Sucrose lysis** test en **Ham** test
 - lage sensitiviteit, niet specifiek
2. “Sephacryl gel card techniques” (GCT)
 - gebaseerd op het principe van hemagglutinatie na Ag-As reactie
 - geen kwantitatieve test
 - lage sensitiviteit, niet betrouwbaar bij kleine klonen
3. Flowcytometrie
 - gouden standaard
4. Moleculaire diagnose
 - enkel in research setting

Complementactivatie en eculizimab



Mechanism of action of eculizumab: inhibition of the terminal complement pathway. The activation of the complement system leads to the formation of a membrane attack complex and thereby to cell lysis. The splitting of C5 is the key trigger for the terminal complement cascade. This activation can be blocked by the anti C5 antibody eculizumab; reproduced from (11). Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2004; 48-62, by kind permission: American Society of Hematology.

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?

Classificatie

International PNH Interest Group

Guidelines voor diagnose en management van PNH (2005):

1. **Klassieke PNH**

- klinische en biochemische evidentie van hemolyse
- normale beenmergmorfologie (reactieve erythroïde hyperplasie)

2. **PNH ikv andere beenmergpathologie**

- klinische en biochemische evidentie van hemolyse
- concomitante (of voorafgaande) beenmergfalen

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

- geen hemolyse
- kleine PNH klonen (<1%) + beenmergfalen syndromen

Wat zijn de klinische indicaties voor PNH testing?

International PNH Interest Group

Guidelines voor diagnose en management van PNH (2005):

1. Alle patiënten met onverklaarde hemoglobinurie en/of Coombs negatieve hemolytische anemie, zeker in associatie met:
 - recurrenente abdominale pijn, dysfagie, erectiele dysfunctie
 - cytopenie (granulocytopenie en/of trombopenie)
 - ijzerdeficiëntie
- ! In de afwezigheid van gestegen LDH of bij Coombs (+) HA is de screening naar klassieke PNH niet aangewezen

Opvolging (minstens jaarlijks)

1. evaluatie van PNH klonen (grootte)
2. evaluatie van therapierespons aan *eculizimab*
3. investigatie van veranderingen in hematologische parameters
4. stijgende transfusienood (dringende reëvaluatie)

International PNH Interest Group

Guidelines voor diagnose en management van PNH (2005):

2. Patiënten met veneuze trombose op ongewone plaatsen (hepatische, mesenterieële venen, cutane venen, cerebrale sinussen) of arteriële trombose

- Tromboembolie is voornaamste oorzaak van mortaliteit
- Risico op trombose gerelateerd aan de grootte van PNH klone:
 - klone > 50%: 44%/ 10 jaar, klone < 50%: 5.8%/ 10 jaar
 - odds ratio (*Moyo et al.*): 1.64 op elke 10% stijging van klone
- Routine screening van alle patiënten met trombose is niet aangewezen
- Jaarlijkse opvolging is noodzakkelijk (anticoagulantia beleid)
- Indien initiële PNH screening is negatief ⇒ geen reëvaluatie

International PNH Interest Group

Guidelines voor diagnose en management van PNH (2005):

3. Alle patiënten met aplastische anemie en MDS-RA (refractaire anemie) ongeacht de aanwezigheid van hemolyse

- PNH klonen bij 32-68% van AA patiënten
- Incidentie van PNH in AA patiënten: 2.1%/5 jaar of 2.9/ 10 jaar (*Y.Li et al.*)
- Aanwezigheid van kleine klonen is geassocieerd met betere respons aan immunosuppressiva en betere prognose
- Regelmatige opvolging van AA patiënten. Redenen:
 - verschijnen van een *de novo* klone in een initiëel neg patiënt
 - evolutie naar klassieke PNH (4.2% van AA patiënten)
- Frequentie van opvolging?
 - driemaandelijks in eerste 2 jaar (*Richards et al.*)

Associatie PNH en MDS

Studie van *H. Wang et al.* op 164 MDS patiënten, waarvan 119 MDS-RA:

- Sensitieve flowcytometrie: CD55/CD59 assay op granulocyten en RBC (op 100 000 cellen)
- Achtergrond van PNH cellen in gezonde mensen:
 - 1-2 op 100 000 cellen (op 68 gezonde mensen)
- > 0.003% GPI-deficiënte granulocyten en RBC = PNH klone
- Resultaten:
 - detectie van PNH klone in 17.9% MDS-RA patiënten
 - nooit in andere subgroepen (RARS, RAEB-1, RAEB-2)
- Klone <1% in 81% van gevallen

Klinische bijzonderheden PNH+ MDS-RA patiënten studie H. Wang et al.

- 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%)

Klinische bijzonderheden PNH+ MDS-RA patiënten

Table 3. Clinical features of PNH⁺ and PNH⁻ RA patients

	PNH ⁺ RA	PNH ⁻ RA	P
Incidence of karyotypic abnormalities (%)	1 of 21 (4.8)	21 of 64 (32.8)	.01*
Neutrophils with the Pseudo-Pelger-Hoet anomaly, % (range)	2.0 (0-35.0)	6.0 (0.5-45.2)	.02†
Platelet count, 10 ⁹ /L (range)	31 (4-121)	91 (9-126)	.01†
Incidence of HLA-DR15 (DRB1*1501 and DRB1*1502) (%)	19 of 21 (90.5)	5 of 27 (18.5)	<.001*
Response to cyclosporine therapy (%)	7 of 9 (77.8)	0 of 8 (0)	.002*
Progression to advanced MDS or AML (%)	0 of 21 (0)	4 of 65 (6.2)	.57*

Progression to advanced disease was observed for 2.5 years.

*Fisher exact test

†Mann-Whitney U test

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

Associatie PNH en MDS

Studie *Sa. Wang et al.* op 110 MDS patiënten, waarvan 17 MDS-RA patiënten:

- Sensitieve flowcytometrie: CD55/CD59 en CD66b/CD16 assay op granulocyten (op 100 000 cellen)
- Cut-off - 0.01%
- Detectie van PNH in 9/110 MDS patiënten:
 - 20% 5q- syndroom
 - 35% RA patiënten
 - 5% RCMD
- Geen PNH in RARS, RCMD-RS, MDS-U

Klinische bijzonderheden PNH+ MDS patiënten

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)	p
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.

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.

Associatie PNH en MDS

PNH klonen in andere subtypes van MDS

- Studie van *Kaiafa et al.* (90 MDS patiënten; CD59/CD55 assay op granulocyten):
 - PNH klonen in een significant aantal CMML en ook in andere subtypes met slechtere prognose (RAEB, RAEB-t)
- Recente EXPLORE studie (5,212 patiënten; CD59 assay op RBC en FLAER/CD24/CD14 assay op WBC)
 - PNH klonen in 1.2% van MDS patiënten (alle subtypes)
 - 4.6% andere beenmergfalen syndromen

Associatie PNH en MDS

- MDS-RA is de meest frequente subtype, geassocieerd met klonale expansie van PNH en betere prognose
- Prognostische waarde van kleine PNH klonen in andere subtypes van MDS is nog niet gekend
- Routine screening van patiënten met andere subtypes van MDS zonder klinische en biochemische evidentie van hemolyse is niet aangewezen
- Opvolging van MDS-RA patiënten is noodzakelijk (soms moeilijk onderscheid tussen MDS-RA en AA)
- Opvolging van patiënten met andere subtypes MDS of MDS/MPD is niet aanbevolen in de klinische praktijk

Wat is de reden voor PNH diagnostiek in UZ Leuven?

PNH testen in UZ Leuven (jan 2010-dec 2011)

Diensten	Aantal	%	Positieve
hematologie	108	62	
externe aanvragen	42	24	
andere diensten	24	14	
totaal stalen	174		24
totaal patiënten	150		14

Reden voor PNH screening in UZ Leuven (jan 2010-dec 2011)

Reden voor screening	Aantal	%
Hypo-/aplasie beenmerg	17	14.5
MDS	13	11.1
Coombs (-) hemolytische anemie	23	19.7
Trombose	19	16.2
Pancytopenie met normaal beenmerg	11	9.4
Auto-immune hemolytische anemie	9	7.7
Anemie zonder hemolyse	14	12
Andere	9	7.7
Onduidelijk	2	1.7
Totaal	117	100

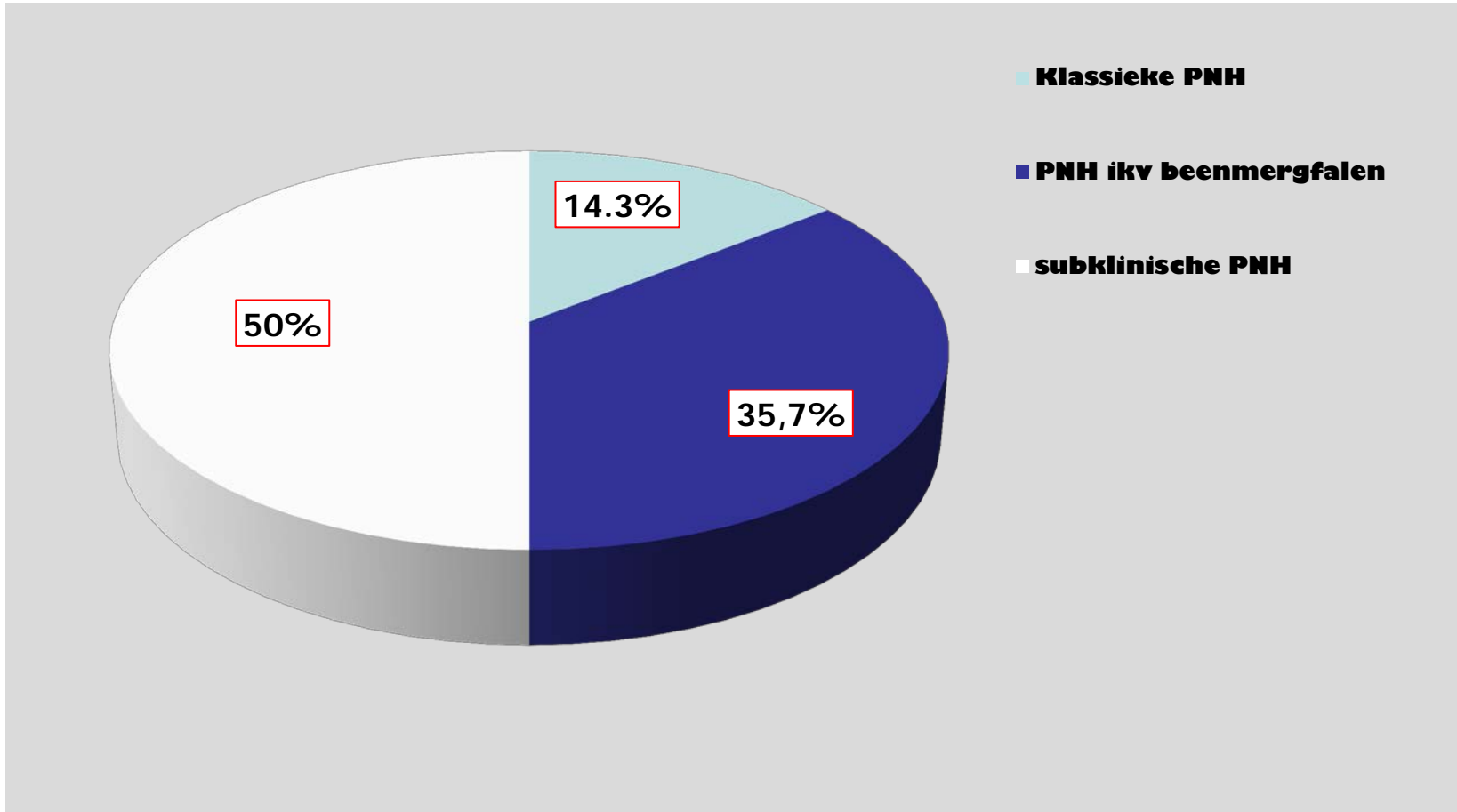
Aantal nieuwe MDS en AA diagnoses en geteste patiënten in UZ Leuven (jan 2010-dec 2011)

	MDS		Aplastische anemie	
	Aantal patiënten	PNH getest	Aantal patiënten	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

PNH patiënten in UZ Leuven (jan 2010-dec 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	1	0	0	1
▪ pancytopenie	1	5	7	13

PNH patiënten UZ Leuven (jan 2010-dec 2011)



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

Flowcytometrie: algemeen

Gouden standaard in diagnose van PNH

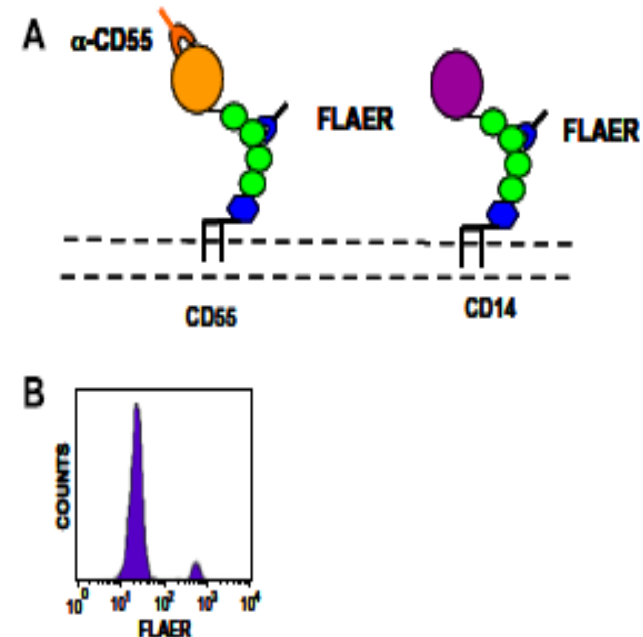
- Op perifereer bloed (beenmerg is minder geschikt):
 - EDTA of heparine
- Geanalyseerde cellijnen:
 - granulocyten en monocytën- meest geschikte cellijnen voor de evaluatie van de grootte van PNH klonen
 - RBC zijn minder geschikt voor routine flowcytometrie (door invloed van transfusie en hemolyse)
 - Lymfocyten en trombocyten zijn niet geschikt
- Altijd 2 cellijnen analyseren (bv. monocytën en granulocyten)
- Normaal staal gebruiken als controle (om de positie van type I cellen te bepalen)

Flowcytometrie: relevante merkers

<u>Antigeen</u>	<u>Cellijn</u>	<u>Functie</u>
CD14	monocyt	LPS receptor, MDF
CD16	neutrofiel	FcγIII receptor
CD24	neutrofiel	B-cel differentiatie marker
CD55	alle lineages	DAF
CD59	alle lineages	MIRL, HRF, protectin
CD66b	neutrofiel	CEA-related glycoproteïne
CD33	mono/neutro	CONTROLE, NIET-GPI-LINKED
CD45	WBC	GATING, NIET-GPI-LINKED

Alternatieve marker: FLAER

- Derivaat van aerolysine (bacteriële toxine) geconjugeerd met fluorochroom
- Betere sensitiviteit : 0.5-1% versus 3% van CD59 assay op RBC (*Sutherland et al.*)
- Bindt specifiek aan GPI-anker \Rightarrow minder gevoelig aan maturatie status van WBC
- Bijzonder nuttig: MDS, immature cellen in perifere bloed, neutropenie, post- SCTx
- Single parameter of in combinatie met andere markers (multiparameter FLAER-gebaseerde assay)= optimale strategie



Flowcytometrie: doel

- Geen uniformiteit tussen labo's wat betreft de keuze/combinatie van antistoffen, staalpreparaties, "gating" strategie
- Clinical Cytometry Society Annual Scientific Meeting in Portland, Oregon (2008): *Consensus Guidelines* voor de diagnose van PNH:
- Doel van flowcytometrie:
 - detectie van PNH klonen
 - bepalen van het percentage (grootte) van PNH klonen
 - detectie van type II cellen op erythrocyten
- Methoden:
 - routine methode: detectie van grote klonen ikv klassieke PNH
 - hoog sensitieve methode: detectie van kleine klonen ikv AA en MDS

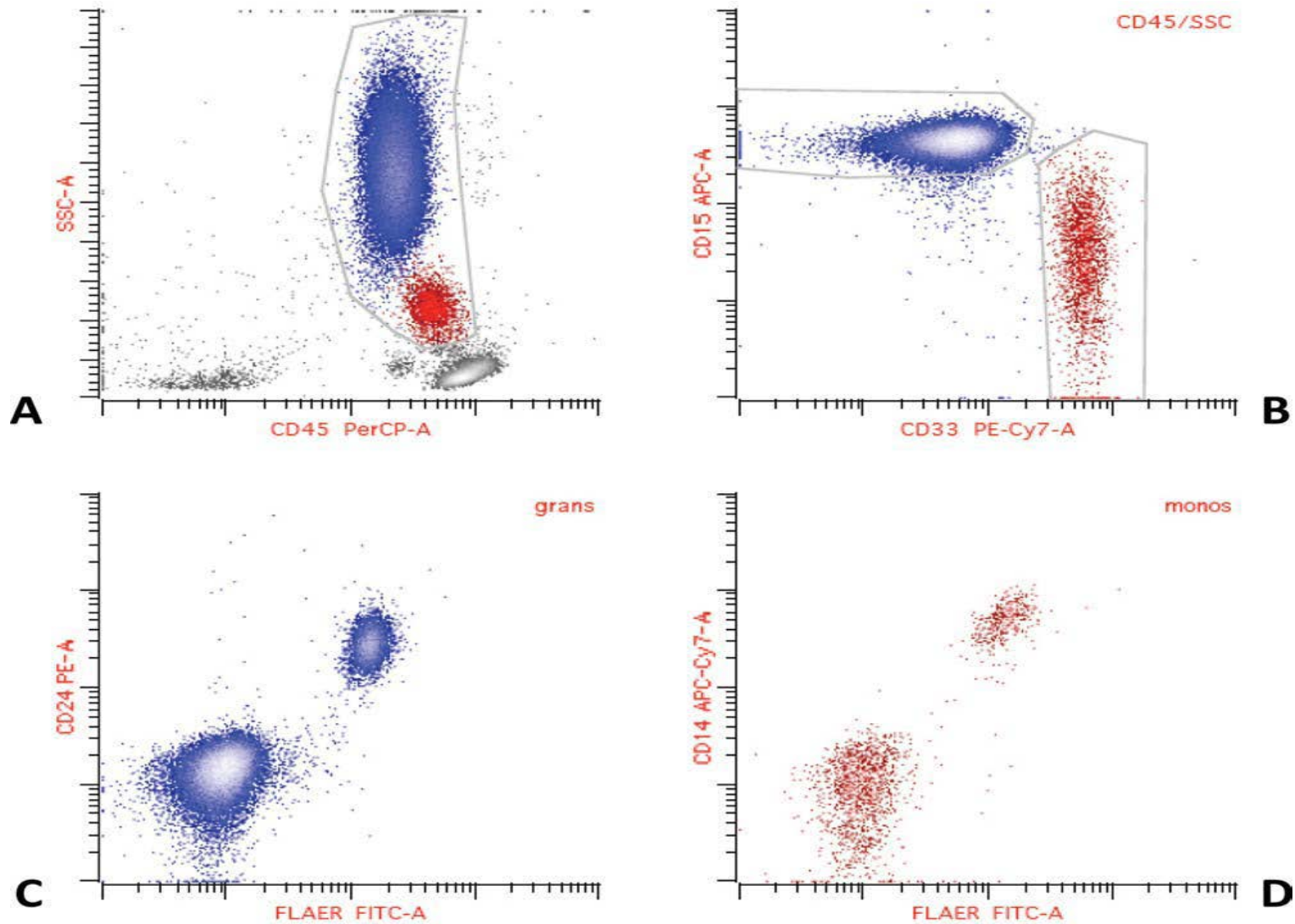
Flowcytometrie: methoden

	Routine	Sensitieve
Aantal events	5 000-10 000	200 000
Gevoeligheid	1% van PNH cellen	0,01% van PNH cellen
Indicatie	Diagnose van klassieke PNH	Detectie van kleine klonen ikv van AA en MDS
Target cellen	Granulocyten Monocyten	RBC Granulocyten

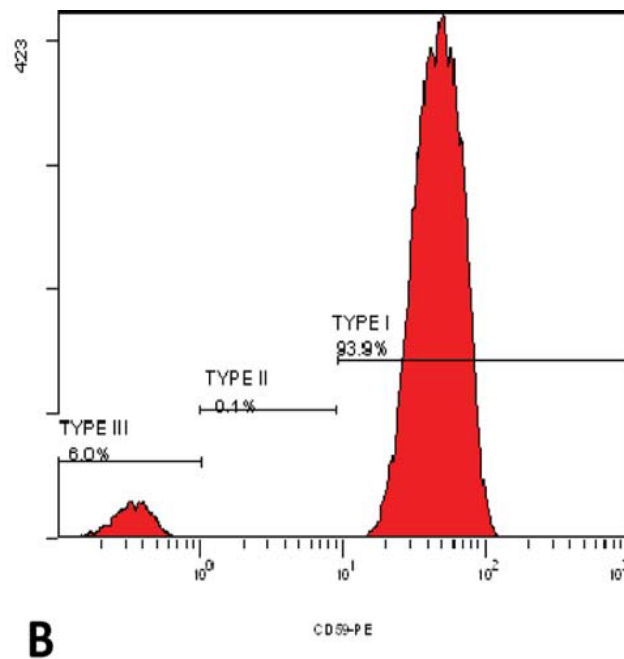
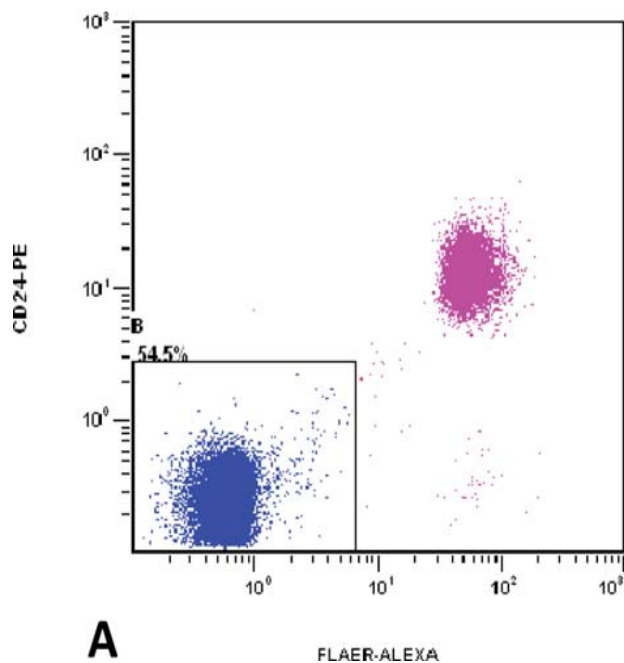
Routine methode: WBC assay

- WBC assay is de beste methode om PNH klone te kwantificeren (overlevingsduur van WBC is niet verkort)
- Target cellen: **granulocyten en monocyten**
 - RBC zijn minder geschikt (invloed van hemolyse/transfusie)
- Gating:
 - SSC/FSC of SSC/CD45
 - combinatie van SSC met lineage specifieke merkers: CD64, CD33 of CD163 (monocyten), CD15 of CD33 (granulocyten)
- GPI-specifieke merkers:
 - FLAER/CD24, FLAER/CD66b, FLAER/CD16 op granulocyten
 - FLAER/CD14 op monocyten

WBC assay: multiparameter FLAER- gebaseerde assay



Grootte van PNH klonen: granulocyten vs RBC assay



A. Granulocyten PNH klonen 55 % (FLAER/ CD24 dot plot)

B. Zelfde patiënt. RBC PNH klonen 6% (single parameter CD59 histogram)

Flowcytometrie: pitfalls

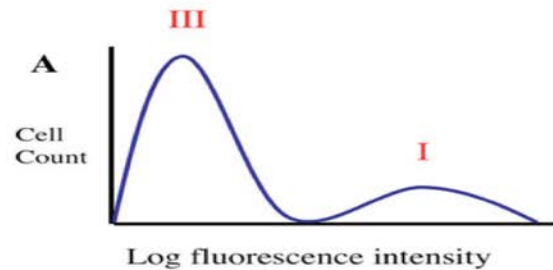
- Problemen met gating bij MDS (hypogranulatie van neutrofielen) \Rightarrow lineage specifieke markers
- Niet-specifieke binding van antistof bij staalveroudering (> 48 uur voor WBC en > 7 dagen voor RBC) \Rightarrow vers staal
- Aanwezigheid van veel immature myeloïde elementen met zwakkere expressie van GPI-verankerde eiwitten (MDS, linksverschuiving, post- stamceltransplantatie, systemische inflammatie) \Rightarrow FLAER
- Granulocytopenie en relatief verhoogd aantal eosinofielen \Rightarrow FLAER

Routine methode: RBC assay

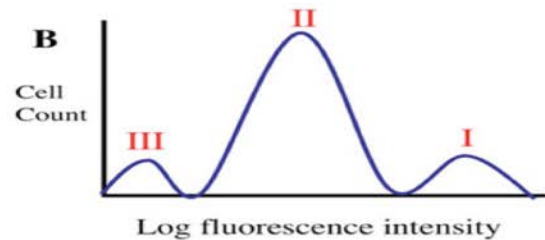
- ❑ RBC assay als enige methode is niet aanbevolen in de guidelines
 - Significante PNH klone op RBC is nooit gezien zonder detecteerbare klone op WBC
 - Minder sensitief. Studie *Sutherland et al.*:
 - FLAER (op WBC): detectie van PNH in 11.8% van gevallen
 - CD59 (op RBC): detectie van PNH in 6.8%
 - Invloed transfusie/hemolyse: toont altijd lagere % van PNH klone
 - Gevoelig aan technische factoren \Rightarrow frequenter vals positieve resultaten

- ❑ Bijkomende waarde bij positieve PNH test op WBC:
 - vergelijking met PNH klone op granulocyten/monocyten
 - detectie van type II PNH cellen (meer resistent aan hemolyse)

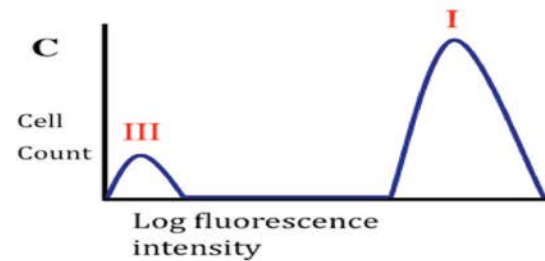
Type II PNH cells en hemolyse



Patient with high percentage of type III cells → high-grade hemolysis



Patient with high percentage of type II cells but low percentage of type III cells → minimal hemolysis



Patient with low percentage of type III cells → minimal hemolysis

Management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in the era of complement inhibitory therapy.

C. J. Parker, Hematology, 2011: 21-29

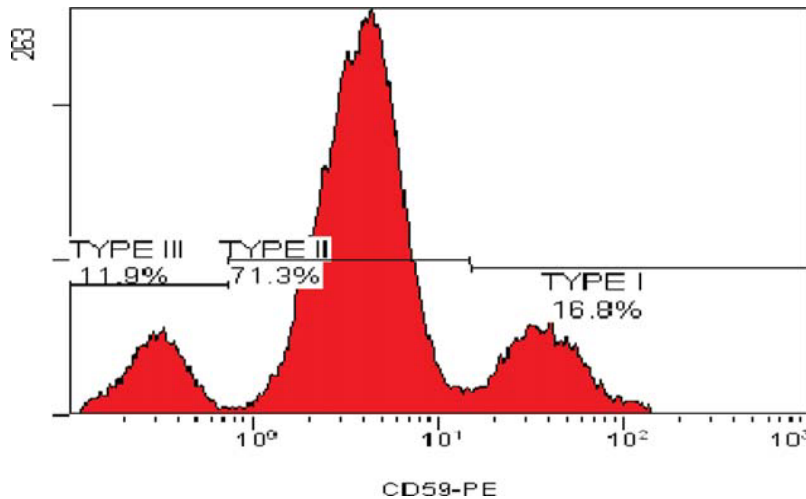
Type II PNH cellen bepaling: zinvol?

1. Geen standaardisatie
2. Klinische implicatie van type II PNH bepaling?
 - ❖ Het starten van eculizumab (Soliris) is sterk gebonden aan de terugbetalingscriteria :
 - PNH klonen > 10%
 - Hemolyse
 - Er moeten 4 transfusies (ECL) aan patient toegediend zijn alvorens eculizumab te starten

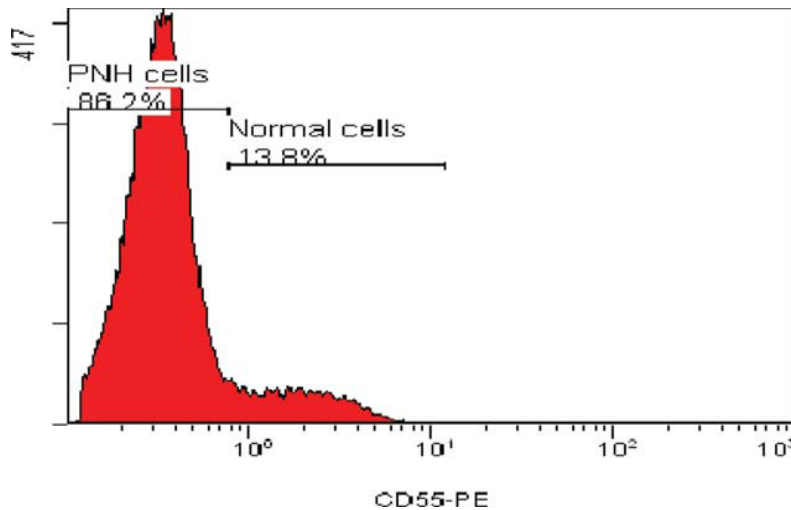
Routine methode: RBC assay

- Gating:
 - SSC/FSC of
 - SSC/ Glycophorine A (CD235a-FITC)
- GPI-specifieke merkers:
 - CD59:
 - sterkere expressie op RBC
 - mogelijk als single merker gebruiken in combinatie met verschillende fluorochromen
 - CD55:
 - zwakkere expressie en slechte discriminatie van type II cellen
 - nooit als single merker gebruiken
 - bijkomende waarde van merker is twijfelachtig
 - CD55-PE is beter dan CD55-FITC

CD59 vs CD55 assay op RBC



CD59 expressie op RBC.
Goede scheiding van type I, II, and III cellen.



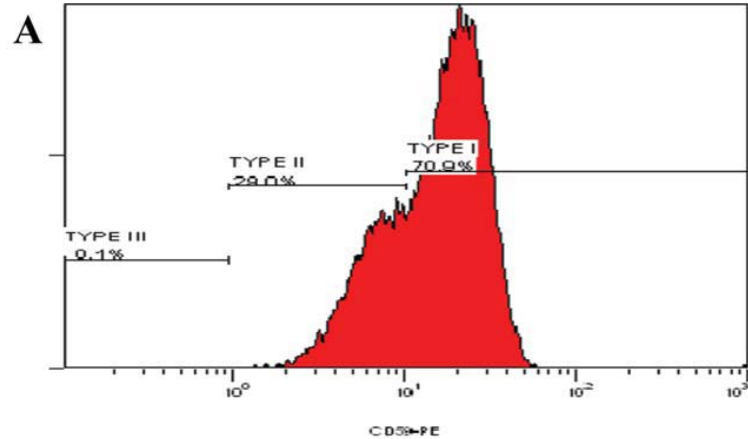
CD55 expressie op RBC (zelfde patiënt).
Geen scheiding van type II en III cellen ondanks vergelijkbaar percentage van PNH cellen.

Problemen bij RBC assay

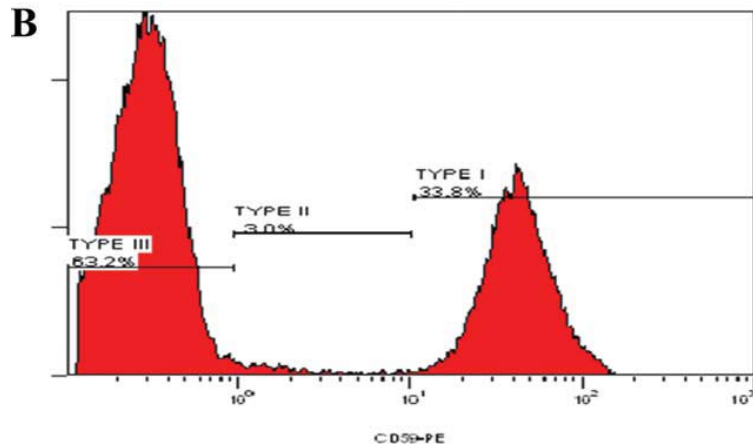
RBC analyse en interpretatie is meer complex probleem

- Gesatureerde concentraties van antistoffen \Rightarrow agglutinatie van RBC
 - titratie van antistoffen!
 - zo laag mogelijk concentratie van een antistof gebruiken met een acceptabele ratio van positieve en negatieve fluorescentie
- Andere oorzaken van agglutinatie:
 - inadequate menging van het staal met antistof
 - aërosol vorming tijdens pipetteren
 - onvoldoende gewassen staal (exces aan fluorochroom)
 - koude agglutininen

RBC assay: effect van het wassen



Ongewassen CD59- gekleurde RBC: geen scheiding type I en type III cellen



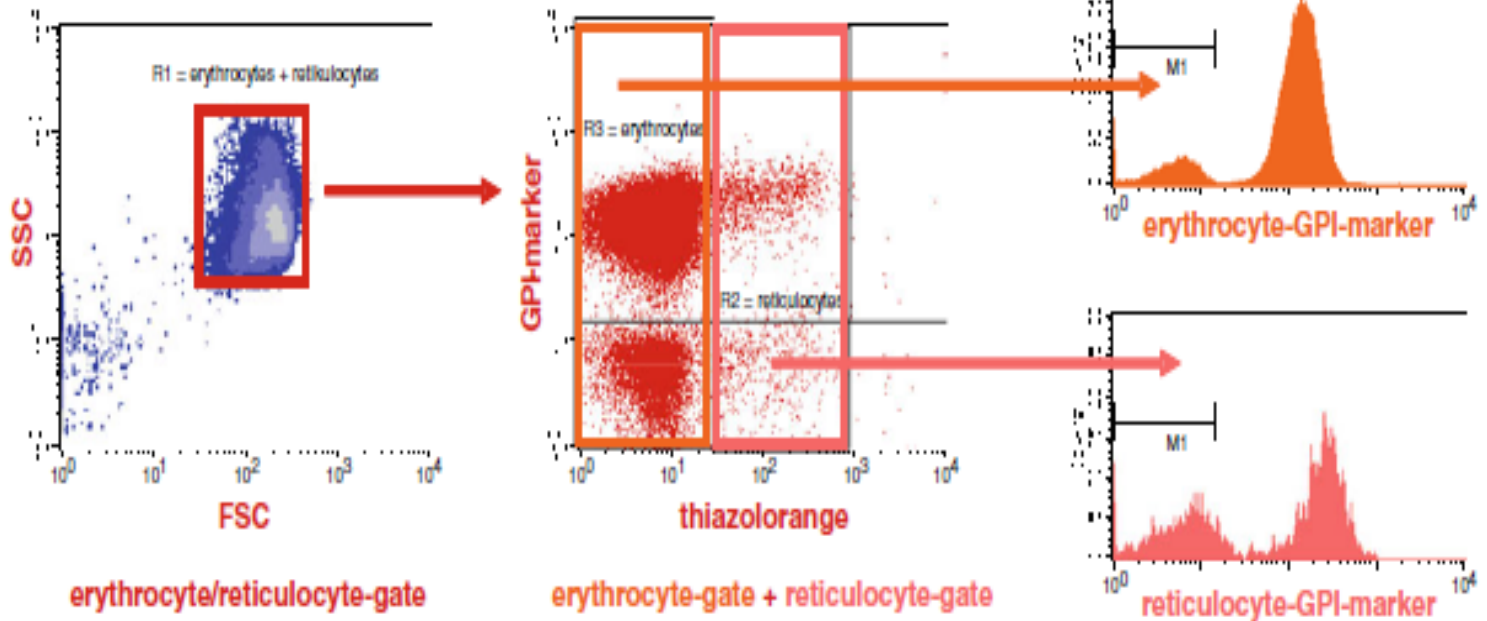
Effect van het wassen van CD59 gekleurde RBC

Routine assay: samenvatting

Target cellen	Gating	Merkers	Opmerkingen
RBC	FSC/SSC Glycophorine A (optioneel)	CD59 (CD55)	CD55 niet als enige merker
Granulocyten	CD45/SSC CD15/SSC	FLAER, CD24 CD66b, CD16	Beter 2 merkers CD55/CD59 is niet aanbevolen
Monocyten	CD45/SSC CD33/SSC CD64/SSC	FLAER CD14 CD48, CD55, CD157	Niet als enige merker Weinig ervaring

Detectie van PNH klonen op reticulocyten

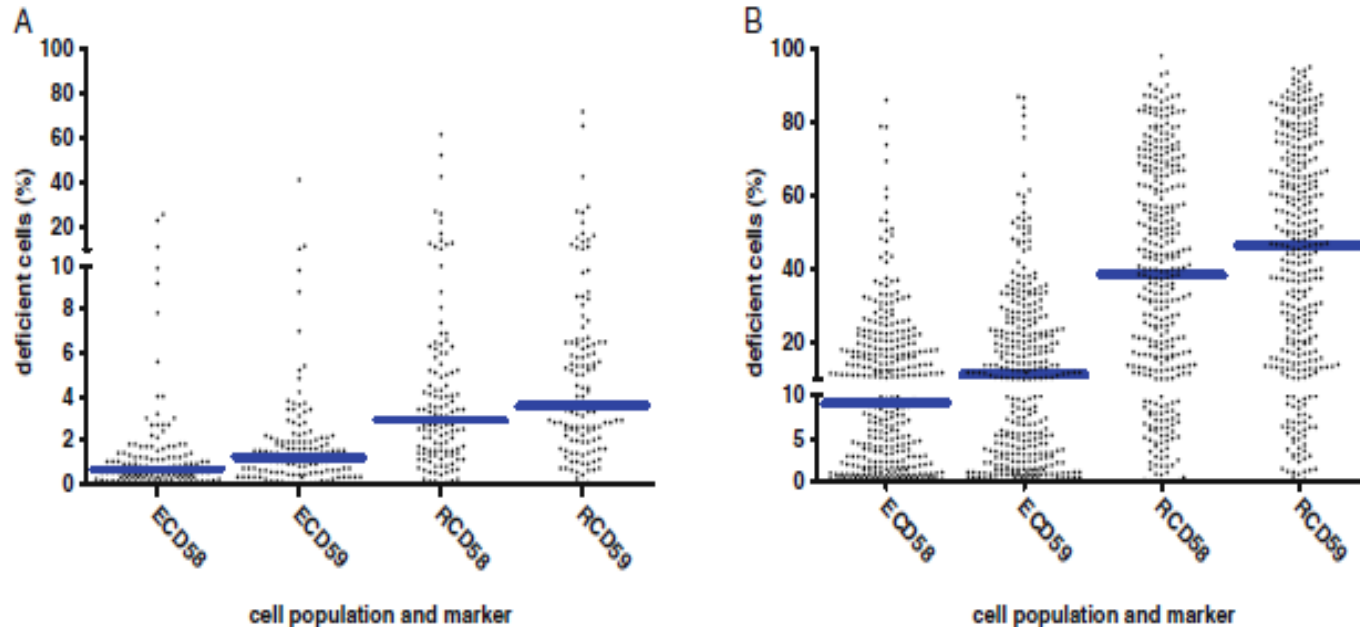
PNH-patient



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.

Detectie van PNH klonen op reticulocyten



Scatter blots with marker deficient cells in percent in patients with $\ge 10\%$ 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.

Sensitieve methode

- Meer cellen worden geanalyseerd ($\approx 200\ 000$)
- Belangrijk:
 - achtergrond van PNH cellen in gezonde mensen
 - selectie van geschikt aantal geanalyseerde cellen en cut-off
- Target cellen: RBC en granulocyten
 - RBC hebben voorkeur? (door groot aantal events)
 - monocytyn zijn minder geschikt
- Meer zorgvuldige gating is nodig om contaminatie te vermijden
 - SSC/CD45 is niet voldoende \Rightarrow lineage specifieke merkers
- Altijd 2 GPI- specifieke merkers gebruiken op een cellijn

Sensitieve methode: samenvatting

Target cellen	Gating	Merkers	Opmerkingen
RBC	SSC/ Glycophorine A	CD59 ± CD55	Zelfde of verschillende kleuringen
Granulocyten	CD15/SSC	FLAER, CD24, CD66b, CD16	2 merkers! CD55/CD59 is niet aanbevolen

Flowcytometrie: kwaliteitscontrole

- Geen externe kwaliteitscontrole data, inter- of intralaboratorium studies over de reproduceerbaarheid en precisie van detectie van kleine PNH klonen
- Interne QC
 - altijd normaal staal (positieve van normale cellen)
 - ongekleurd staal om de positie van PNH cellen te identificeren?
- Positieve controle (niet haalbaar voor meeste labo's)
 - geen commercieel QC materiaal beschikbaar
 - gesuspendeerde in 20-25% sucrose/dextrose en ingevroren PNH⁺ erythrocyten? (stabiel voor onbepaalde duur)
- EKE
 - Nederlands extern kwaliteitscontrole programma is beschikbaar (SKML)

Conclusie

1. Alle AA en MDS-RA patiënten screenen naar de sc-PNH ongeacht de aanwezigheid van hemolyse.
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).
3. Multiparameter FLAER- gebaseerde assay op WBC is de beste strategie voor de diagnose van klassieke PNH en de bepaling en opvolging van de grootte van PNH klone.
4. Bijkomende waarde van RBC assay: identificatie van type II PNH cellen bij een positieve PNH test op WBC. Maar
 - RBC assay is minder sensitief, meer gevoelig aan technische factoren en moeilijker te interpreteren
 - bepalen van type II cellen is niet gestandaardiseerd
 - klinische implicatie?
5. Hoog sensitieve assay is nuttig voor de detectie van kleine (<1%) klonen ikv sc-PNH.
 - voordeel van CD59/CD55 assay op RBC tov FLAER- gebaseerde assay op WBC?

To do's

1. Overleg clinici: bijaanvraag PNH analyse bij MDS-RA en AA patiënten
2. Inschrijven voor EKE programma (SKML)
3. PNH test op RBC uitvoeren bij een positieve klonen op WBC: zinvol?