

Běžné, standardizované a doporučené postupy v diagnostice a monitorování paroxysmální noční hemoglobinurie průtokovou cytometrií

I. Marinov^{1,2}, A. Luxová¹, V. Tkáčová¹, D. Mikulencová¹, J. Čermák^{1,2}, P. Cetkovský^{1,2}

¹ Ústav hematologie a krevní transfuze Praha, ředitel prof. MUDr. Marek Trněný, CSc.

² Ústav klinické a experimentální hematologie 1. lékařské fakulty UK a Ústavu hematologie a krevní transfuze Praha, přednosta prof. MUDr. Marek Trněný, CSc.

Souhrn: Paroxysmální noční hemoglobinurie (PNH) je získané klonální onemocnění krvetvorby. Patří do skupiny získaných hemolytických anémií a projevuje se hemolýzou červených krvinek různé intenzity a nadměrnou tendencí ke vzniku trombóz. Vzniká z důvodu proliferace kmenové buňky, které chybí povrchové antigeny vázané na buněčné membráně pomocí glykosylfosfatidylinositolové kotvy (GPI). Průtoková cytometrie se používá na stanovení PNH klonů od roku 1986 a od roku 1996 se považuje za metodu volby pro diagnostiku onemocnění. Vyšetření v současné době zahrnuje též monitorování velikosti PNH klonů v průběhu onemocnění – ve vztahu k progresi, regresi, remisi, transformaci či odpovědi na terapii – a dále je též zaměřeno na detekci nízkých počtů PNH buněk (< 1,0 %) v rámci monitorování pacientů s aplastickou anémií (AA) a myelodysplastickým syndromem (MDS). V praxi se používají odlišné metodické postupy. Průtoková cytometrie je stále nedostatečně standardizovanou metodou, závěry externích kontrol kvality navíc poukazují na různorodost jednotlivých výsledků. Cílem následující práce je poskytnout přehled současných možností vyšetření PNH buněk průtokovou cytometrií v souladu s naší dlouholetou zkušeností a v kontextu aktuálních trendů a doporučení pro diagnostiku a monitorování PNH.

Klíčová slova: paroxysmální noční hemoglobinurie – průtoková cytometrie – standardizované postupy

Common, standardized and recommended approaches in the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria using flow cytometry

Summary: Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria is an acquired clonal disease characterized by proliferation of stem cells, deficient of proteins linked to the membrane via glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchors. PNH cell characterization by flow cytometry was introduced in 1986, since 1996 is considered as method of choice for PNH diagnosis. Flow cytometry PNH analysis is nowadays crucial for disease monitoring in terms of progression, regression, remission or response to therapy and screening for small PNH clones (< 1.0%) in patients with aplastic anemia or myelodysplastic syndrome. Flow cytometry is unfortunately still poorly standardized, there is a variety of different methodological approaches for PNH evaluation and results from external quality assurances schemes reveal heterogeneous results. The aim of this work is to review the applicability of flow cytometry for the diagnosis and monitoring of PNH with respect to our experience and in the context of the recent trends and guidelines for PNH evaluation by flow cytometry.

Key words: paroxysmal nocturnal hemoglobinuria – flow cytometry – standardized approaches

Úvod

Paroxysmální noční hemoglobinurie (PNH) je vzácné klonální onemocnění krvetvorby, které se projevuje intravaskulární hemolýzou s hemoglobinurií (hemolytická forma), imunitně podmíněnou aplazií kostní dřeně (hypoplastická forma) a sklonem k trombózám [1,2]. Biologickou podstatou onemocnění je somatická mutace *PIG-A* genu (phosphatidyl inositol glycan class A) na úrovni kmenové buňky, která blokuje syntézu GPI kotvy [3,4]. Důsledkem mutace je částečný nebo kompletní deficit GPI kotvených proteinů na povrchu PNH buněk (tab. 1)

[5,6]. GPI kotvené glykoproteiny CD55 (DAF) a CD59 (MIRL) hrají klíčovou roli pro inhibici aktivity C3, C5, C5b, C6, C8, C9 složek komplementu, jejich nepřítomnost je hlavní příčinou akutních a chronických atak intravaskulární hemolýzy [7,8]. Volný hemoglobin, nedostatečné odbourávání oxidu dusnatého a hemoglobinurie jsou podstatou patogenetického mechanismu vzniku klinických komplikací (tab. 2) [9]. Klinické projevy závisí na velikosti patologického klonu a mohou být rozličné od trvalé hemolýzy různého stupně přes opakovaně hemolytické krize se známami akutní renální insuficience až ke

klinicky němému průběhu, jehož první manifestací může být až obraz Budd-Chiariho syndromu se splenomegalií a známami jaterního selhávání.

Klinické indikace k vyšetření PNH klonů (screening, diagnostika, monitorování)

PNH je komplexní onemocnění, v kontextu klinických příznaků je každý pacient jedinečný. Riziko závažných klinických komplikací a moderní léčba hemolytické formy humanizovanou protilátkou proti C5 složce komplementu vedlo k rozšíření klinických indikací pro vyšetření tohoto onemocnění

Tab. 1. GPI kotvené proteiny.

Název	CD	Význam/Funkce	Výskyt
LPS Rc	CD14	receptor pro lipopolysacharid	monocyty, makrofágy, Langerhansovy buňky
Fcγ III Rc	CD16	IgG Fc receptor	neutrofily, makrofágy, NK buňky
BA-1	CD24	váže P-Selectin	neutrofily, eozinofily, B-lymfocyty, tymocyty, erytrocyty
Blast-1	CD48	adhezivní molekula	leukocyty
Campath-1	CD52	nejasný	T-lymfocyty, monocyty, NK buňky
DAF	CD55	váže C3b, regulace kaskády komplementu	hematopoetické buňky, endoteliální buňky
LFA3	CD58	receptor proCD2, adhezivní molekula	hematopoetické a nehematopoetické buňky
MIRL	CD59	váže C8 a C9, regulace kaskády komplementu	hematopoetické a nehematopoetické buňky
CGM6	CD66b	adhezivní molekula, aktivace neutrofilů	neutrofily
NCA	CD66c	adhezivní molekula	neutrofily
NTSE	CD73	enzym (nukleotidáza)	T-, B-lymfocyty
uPA-Rc	CD87	receptor pro uPA	granulocyty, monocyty, NK buňky, aktivované T-lymfocyty, endoteliální buňky
Thy-1	CD90	diferenční antigen	progenitorové buňky
JMH Ag	CD108	krevní skupinový antigen	erytrocyty, aktivované lymfocyty
PAF	CD109	enzym (endopeptidáza)	krevní destičky, neutrofily, monocyty
BST-1	CD157	enzym (cykláza)	neutrofily, monocyty
NB1	CD177	nejasný	neutrofily
PrP	CD230	prion	erytrocyty, leukocyty
AchE		enzym (acetylcholinesteráza)	erytrocyty
Do		krevní skupinové antigeny: Do ^a , Do ^b , Gy ^a , Hy, Jo ^a	erytrocyty
HG Ag		nejasný	erytrocyty
Gp 500		nejasný	krevní destičky
P50-80		nejasný	neutrofily
ADP-RT		enzym (ADP transferáza)	neutrofily
GPI-80		adhezivní molekula	neutrofily, monocyty
NA1/NA2		nejasný	neutrofily

(tab. 3) [10,11]. U pacientů s již stanovenou diagnózou a významným PNH granulocytárním klonem (> 90 %) chorobu monitorujeme každých 6 měsíců první 2 roky a dále 1krát ročně. U pacientů s AA bez přítomnosti PNH

buněk nebo s jejich nízkým počtem je vhodné častější monitorování (1krát za 3 měsíce), obzvláště u pacientů se zahájenou imunosupresivní terapií z důvodu rizika vzniku nebo nárůstu již přítomného PNH klonu a přechodu

do PNH. U pacientů s PNH granulocytárním klonem v rozmezí 20–80 % a zachovanou reziduální hematopoézou se doporučuje častější monitorování množství PNH buněk k posouzení dynamiky choroby. Vyšetření zastoupení PNH klonu je nutné provést vždy při známkách progresu choroby na základě pravidelných kontrol krevního obrazu a LDH [12,13]. V současné době neexistuje konsensus týkající se frekvence vyšetření PNH klonů u pacientů na terapii eculizumabem.

Princip vyšetření průtokovou cytometrií

Základním principem vyšetření průtokovou cytometrií je průkaz částečného nebo kompletního deficitu nejméně dvou GPI-kotvených proteinů na povrchu buněk nejméně ze dvou vývojových řad (erytrocyty, monocyty, neutrofily) [14,15].

Tab. 2. Nejčastější klinické komplikace u PNH.

Druh komplikace	Projev
žilní trombóza	- plicní embolie - trombóza hlubokých žil - trombóza kožních žil - trombóza jaterních žil - portální hypertenze - mezenterální trombóza
arteriální trombóza	- tranzitorní ischemická ataka - centrální mozková příhoda - akutní infarkt myokardu
plicní hypertenze	- dušnost - srdeční nedostatečnost
chronické renální postižení	- anémie - nutnost dialýzy
anémie	- únnavový syndrom - hemosideróza po opakovaných transfuzích

Tab. 3. Klinické indikace k vyšetření PNH klonů.

Indikace k vyšetření PNH klonů

- hemoglobinurie a/nebo hemoglobinemie
- coombs negativní hemolytická anémie u pacientů bez známek infekce
- hemolýza nejasné etiologie sdružená s:
 - deficitem železa
 - trombózou
 - bolestmi břicha
 - granulocytopenií a/nebo trombocytopenií
- trombóza:
 - trombóza jaterních žil, portálního systému, mozkových sinusů, kožních žil
 - trombóza v kombinaci s cytopenií
 - trombóza v kombinaci s hemolýzou
- poruchy krvetvorby:
 - aplastická anémie
 - refrakterní cytopenie s dysplazií v jedné řadě
 - jiné cytopenie nejasné etiologie

Indikace k monitorování PNH klonů

- pacienti s PNH – sledování progresu, regrese, remise, transformace
- pacienti na terapii eculizumabem
- pacienti s trombózou a/nebo hemolytickou anémií, u kterých nebyla jednoznačně stanovena PNH
- pacienti s aplastickou anémií a prokázaným PNH klonem k vyloučení progresu do PNH

Stanovení PNH erytrocytů

Průkaz PNH erytrocytů se standardně provádí vyšetřením exprese povrchových GPI kotvených proteinů CD55 a CD59. Cílem vyšetření je detekovat a odlišit erytrocyty s normální antigenní expresí (typ I), s částečnou antigenní expresí (typ II) a erytrocyty s kompletním antigenním deficitem (typ III) (obr. 1). Průkaz PNH erytrocytů poskytuje důležitou klinickou informaci, přesto přítomnost čerstvě transfundovaných erytrocytů (nepřesný odhad velikosti PNH klonu), častá in vivo hemolýza PNH erytrocytů typu III a výskyt vzácných forem PNH bez přítomnosti PNH erytrocytů omezují jeho diagnostický význam [9,14]. Nicméně z klinické praxe je známo, že přítomnost méně než 15 % PNH eryt-

rocytů typu III je většinou spojena jen s mírnými laboratorními příznaky hemolýzy bez klinických projevů a komplikací, tento nález bývá často přítomen u tzv. „PNH like“ MDS. Nález více než 30 % PNH erytrocytů typu III bývá velmi často spojen s klinickými příznaky a opakovaným nálezem hemoglobinurie a nemocní s > 50 % PNH erytrocytů tohoto typu mívají opakovaně ataky závažné hemolýzy s vysokým rizikem zejména trombotických komplikací [16].

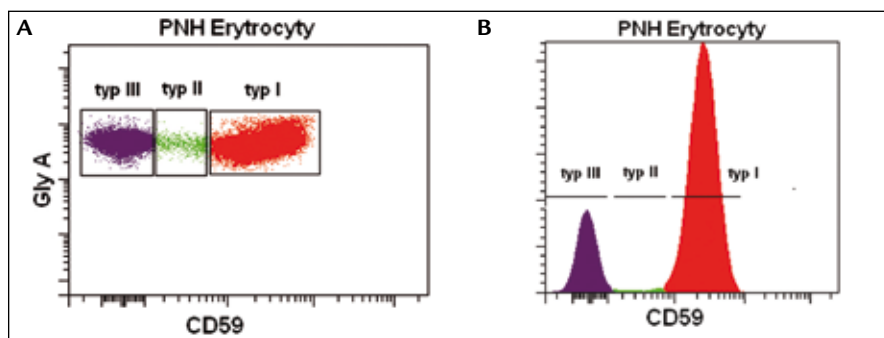
Běžné postupy vyšetření PNH erytrocytů

Expresi antigenů CD55 a CD59 stanovujeme kvalitativně (bez kvantifikace fluorescence) za použití vhodných kontrol: neznačené erytrocyty pacienta

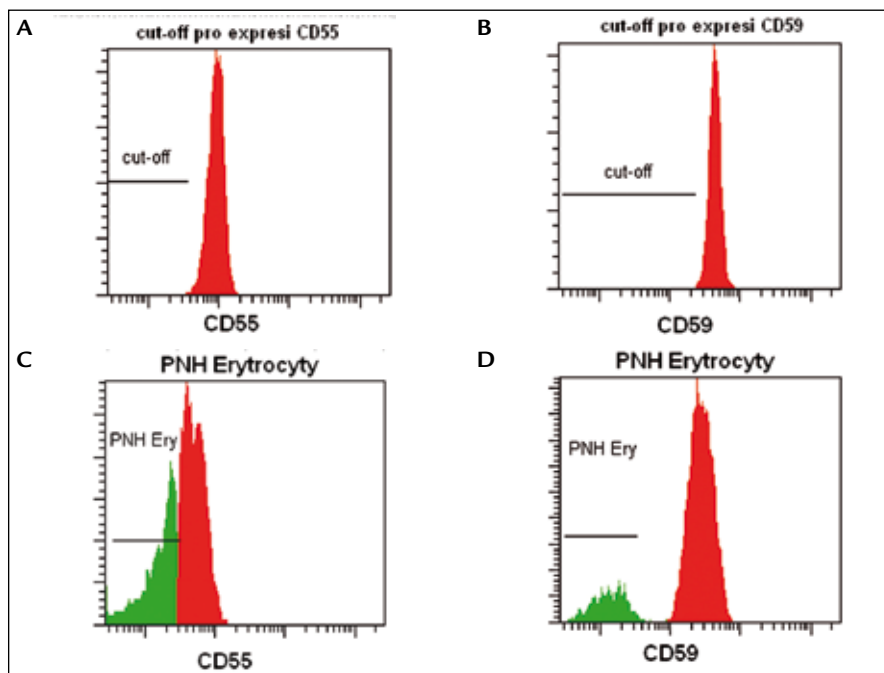
slouží jako negativní kontrola, značené non-PNH erytrocyty od pacienta (PNH klon < 100 %), případně od zdravého dárce, naopak jako pozitivní kontrola. Exprese CD59 na erytrocytech je silnější, což umožňuje lepší rozlišování PNH erytrocytů typu III od PNH erytrocytů typu II. Kompletní deficit CD59 na erytrocytech (typ III) souvisí přímo s intravaskulární hemolýzou, je-li PNH klon arbitrárně větší než 20 %. Pacienti s PNH erytrocyty typu II bez přítomnosti PNH erytrocytů typu III mají oproti tomu převážně retikulocytózu, zvýšené LDH a minimální hemolýzu. Význam stanovení exprese CD55 na erytrocytech není v literatuře jednoznačně dokumentován, jeho samostatné vyšetření se z tohoto důvodu nedoporučuje. Identifikace erytrocytů na základě fyzikálních parametrů dopřední (FSC) a boční (SSC) rozptyl je pro běžná vyšetření PNH erytrocytů dostačující, pro zlepšení citlivosti metody lze použít i další erytrocytární znak – CD235a [15].

Standardizované metody analýzy PNH erytrocytů

PNH Redquant™ (Biocytex, Francie) je jediná komerčně dostupná souprava, která umožňuje standardizované (CE, IVD) stanovení PNH erytrocytů.



Obr. 1. PNH erytrocyty s kompletním deficitem GPI kotveného proteinu CD59 (typ III), PNH erytrocyty s částečným deficitem (typ II) a normální erytrocyty (typ I).



Obr. 2. Fluorescenční standardy slouží k nastavení cut-off, podle kterého odlišujeme normální erythrocyty (oblast nad prahem) od PNH erythrocytů (oblast pod prahem).

Za použití fluorescenčních standardů se definuje fluorescenční práh (cut-off), podle kterého odlišujeme normální erythrocyty (oblast nad prahem) od PNH erythrocytů (oblast pod prahem) (obr. 2). Vzhledem k citlivosti (3 % PNH buněk) metodika není vhodná pro detekci nízkých počtů PNH klonů u pacientů s AA a myelodysplastickým syndromem (MDS). Relativním nedostatkem kromě vysoké ceny je časová náročnost vyšetření.

Doporučené postupy pro analýzu PNH erythrocytů

Mezinárodní společnost pro klinickou průtokovou cytometrii (ICCS) vydala v roce 2010 vůbec první dokument týkající se doporučených postupů pro diagnostiku a monitorování PNH průtokovou cytometrií. Dokument rozlišuje rutinní/diagnostické vyšetření PNH a vyšetření metodikou s vysokou citlivostí na průkaz nízkých počtů PNH buněk [15].

Rutinní vyšetření PNH erythrocytů

Účel rutinního vyšetření PNH erythrocytů je diagnostický. Požadovaná citlivost je 1 % PNH buněk, proto je nutná

analýza minimálně 5 000 erythrocytů. Identifikace erythrocytů se provádí na základě fyzikálních parametrů FSC/SSC. Stanovuje se exprese antigenu CD59, samostatně nebo v kombinaci s antigenem CD55. Z dostupných fluorochromů na značení anti-CD59 monoklonální protilátky (MP) volíme phycoerythrin (PE). Optimální titrace MP je kriticky důležitá pro analýzu z důvodu aglutinačního efektu na erythrocytech. Účelem vyšetření je stanovení PNH erythrocytů typu III, přítomnost PNH erythrocytů typu II je nutné popsat. Neznačené erythrocyty pacienta slouží jako negativní kontrola, značené non PNH erythrocyty pacienta (PNH klon < 100 %), případně zdravého dárce, naopak jako pozitivní kontrola.

Techniky s vysokou citlivostí na analýzu PNH erythrocytů

Účelem vyšetření metodikou s vysokou citlivostí je detekce nízkých počtů PNH erythrocytů u pacientů s AA a refrakterní cytopenií s dysplazií v jedné řadě (RCUD). Imunosupresivní terapie může vést ke vzniku nebo nárůstu stávajícího PNH klonu, dokonce až ke vzniku PNH. Cílová citlivost vyšetření

je 0,01 %, proto je nutná analýza 250 000–1 000 000 erythrocytů. Identifikaci erythrocytů provádíme na základě fyzikálních a fluorescenčních parametrů FSC/SSC/CD235, analýzu dat provádíme ve dvouparametrových grafech (obr. 1). Analyzujeme expresi CD59, případně v kombinaci s CD55. Z dostupných fluorochromů pro anti-CD235a MP přednostně volíme fluorescein isothiokyanát (CD235a FITC) a pro anti-CD59 MP phycoerythrin (CD59 PE). Neznačené erythrocyty pacienta slouží jako negativní kontrola, značené erythrocyty zdravého jedince nebo non PNH erythrocyty pacienta (PNH klon < 100 %) naopak jako pozitivní kontrola.

Stanovení PNH leukocytů

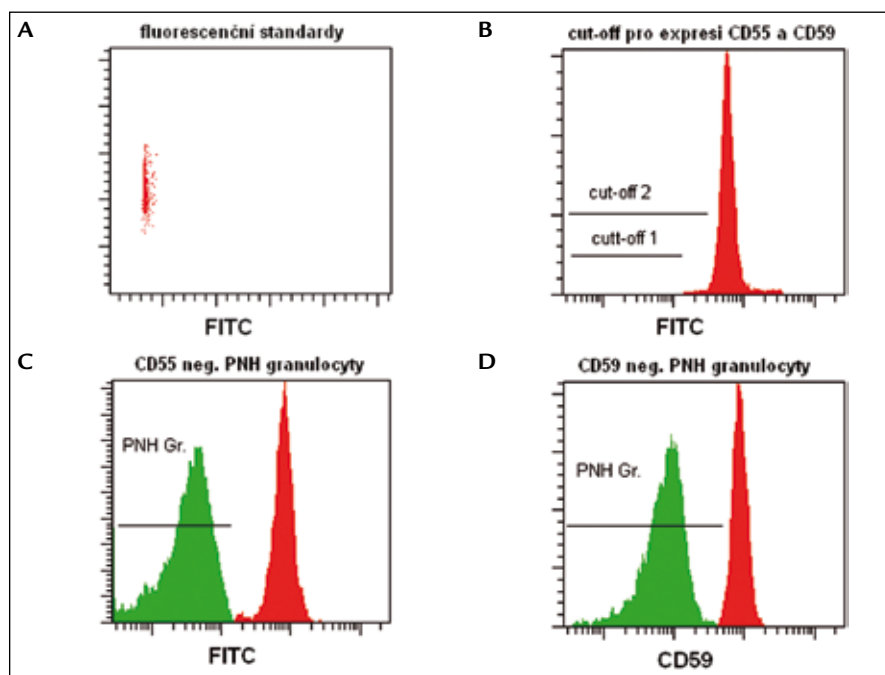
Stanovení PNH neutrofilů a monocytů poskytuje přesnější informaci o reálném zastoupení PNH klonu, vyšetření má diagnostický význam. Analýza PNH lymfocytů se nedoporučuje z důvodu variabilní exprese GPI-kotvených proteinů [14,17].

Běžné metodiky na vyšetření PNH granulocytů a monocytů

Pro stanovení PNH leukocytů se dlouhodobě provádělo a stále provádí kvalitativní vyšetření exprese antigenů CD55 a CD59. Exprese CD55 na monocytech je silnější než exprese CD59, proto má na rozdíl od erythrocytů větší diagnostický význam. Analýza exprese CD55 a CD59 antigenů na granulocytech má však omezenou schopnost pro identifikaci PNH buněk, často bývá příčinou záchytu nižších PNH klonů, vyšetření se navíc vyznačuje vysokým variačním koeficientem. V praxi se vyšetřují přednostně jiné GPI kotvené proteiny: CD14, CD16, CD24, CD48, CD66b, CD157 [18].

Standardizované metody analýzy PNH leukocytů

PNH Cellquant™ (Biocytex, Francie) je jediný komerčně dostupný, standardizovaný (CE, IVD) kit na stanovení PNH granulocytů. I v tomto případě se používají fluorescenční standardy na sta-



Obr. 3. Fluorescenční standardy slouží k určení cut-off, podle kterého odlišujeme normální granulocyty (oblast nad prahem) od PNH granulocytů (oblast pod prahem).

novení fluorescenčního prahu, podle kterého definujeme normální (oblast nad prahem) a PNH granulocyty (oblast pod prahem) (obr. 3). Citlivost metodiky (3 % PNH buněk) určuje její význam pouze pro diagnostiku. Jistá nevýhoda je časová náročnost vyšetření a nutnost zpracování materiálu nejpozději do 8 hod po odběru.

Kvalitativní vyšetření exprese dalších GPI kotvených proteinů

CD14 je transmembránový glykoprotein, který je silně exprimován na po-

vrchu monocytů a makrofágů. Expres na povrchu mladých monocytů je slabá, přesto je marker vhodný pro diagnostické účely (≥ 1 % PNH monocytů), samostatně nebo v kombinaci s jinými PNH markery (CD24). Přítomnost dendritických buněk v periferní krvi, které neexprimují antigen CD14, může být příčinou falešného PNH klonu, z toho důvodu není vyšetření vhodné pro stanovení nízkých počtů ($< 0,1$ %) PNH monocytů vysoce citlivými technikami [18].

CD16 z rodiny imunoglobulinů je Fc receptorem pro imunoglobuliny

třídy IgG. Vyskytuje se na povrchu NK buněk, makrofágů a neutrofilů. Eozinofily neexprimují CD16 a jejich přítomnost v periferní krvi může být příčinou falešného PNH klonu. Použití CD16 jako samostatného markeru se nedoporučuje, lze ho však použít v kombinaci s jiným PNH markerem (CD24, CD55, CD58, CD59). Dalším potenciálním problémem je částečný nebo kompletní deficit CD16 antigenu na granulocytech u pacientů s MDS (obr. 4) [18]. CD24 je malý, povrchový sialoglykoprotein, který je exprimován na povrchu zralých lymfocytů a přetrvává až do plazmocytární diferenciace. CD24 je vhodný marker na průkaz PNH granulocytů a monocytů rutinními nebo vysoce citlivými technikami, nejlépe v kombinaci s dalším PNH markerem. CD66b je transmembránový glykoprotein z rodiny imunoglobulinů, který je převážně exprimován na povrchu granulocytů. Na průkaz PNH neutrofilů se používá vždy v kombinaci s dalším PNH markerem.

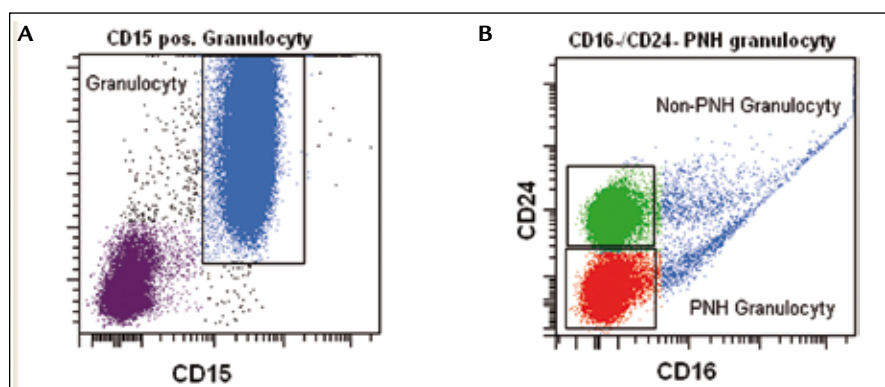
Stanovení PNH leukocytů metodou FLAER

Aeromonas hydrophila syntetizuje bakteriální enzym proaerolysin (52 kD), jehož aktivní forma aerolysin rozpoznává GPI kotvu a následně lyzuje non PNH buňky. FLAER představuje inaktivovanou formu aerolysinu značenou fluorochromem Alexa 488. V posledních letech se používá v diagnostice PNH s narůstající oblibou, obzvláště v detekci nízkých počtů PNH buněk vysoce citlivými technikami. FLAER lze použít samostatně, většinou však v kombinaci s dalšími PNH markery a markery na specifickou identifikaci cílových populací [19,20].

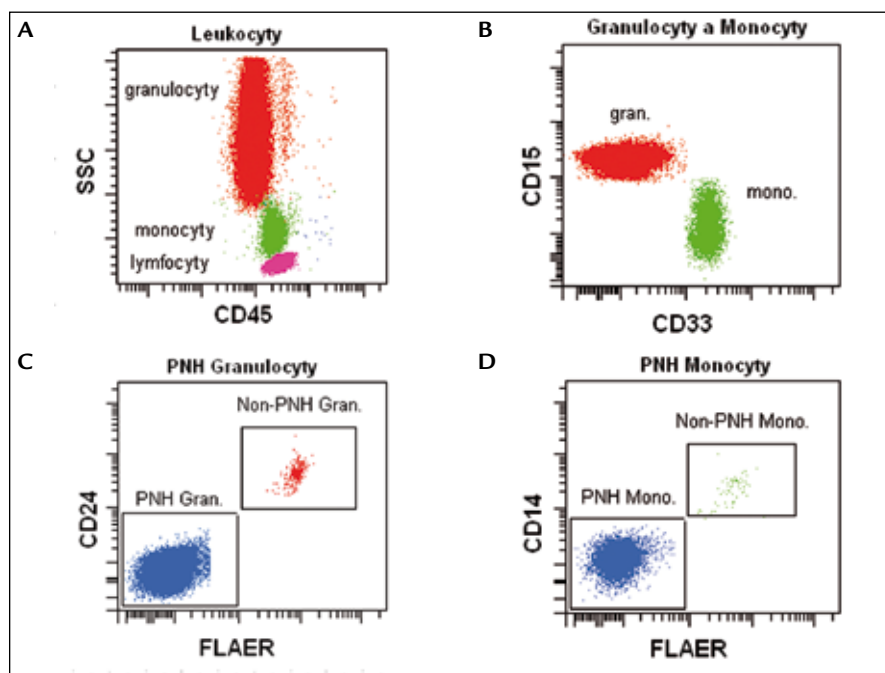
Doporučené postupy pro analýzu PNH leukocytů dle ICCS

Rutinní vyšetření leukocytů za účelem stanovení diagnózy

Požadovaná citlivost vyšetření je 1 %, proto je nutná analýza 5 000–10 000 neutrofilů.



Obr. 4. Granulocyty definujeme na základě vysokého SSC a silné exprese znaku CD15 (A). PNH granulocyty jsou $CD16^{neg}/CD24^{neg}$. Non-PNH granulocyty ($CD24^{pos}$) u pacienta s MDS vykazují patologickou nepřítomnost znaku CD16 (B).



Obr. 5. Leukocyty (lymfocyty, monocyty a granulocyty) definujeme na základě parametrů CD45/SSC (A). Granulocyty jsou CD15^{silně+}/CD33^{slabě+}, monocyty CD15^{slabě+}/CD33^{silně+} (B). PNH granulocyty jsou FLAER^{neg}/CD24^{neg} (C), PNH monocyty jsou FLAER^{neg}/CD14^{neg} (D).

Identifikaci monocytů a granulocytů provádíme na základě fyzikálních a fluorescenčních parametrů FSC/SSC/CD45. Pro vyšší citlivost používáme markery specifické pro vývojovou řadu: CD15 pro granulocyty a CD33 pro monocyty. Na cílových populacích analyzujeme expresi FLAER v kombinaci s CD24 (granulocyty) a CD14 (monocyty) (obr. 5).

Vyšetření leukocytů za účelem monitorování PNH klonů u AA/MDS
Požadovaná citlivost vyšetření je 0,01 %, proto je nutná analýza nejméně 250 000 neutrofilů. Identifikaci leukocytů provádíme na základě fyzikálních a fluorescenčních parametrů: SSC/CD45/CD15^{silně+}/CD33^{slabě+} (granulocyty), SSC/CD45/CD15^{slabě+}/CD33^{silně+} (monocyty). Na cílových populacích vyšetřujeme expresi FLAER v kombinaci s CD24 (neutrofilů) a CD14 (monocytů).

V souvislosti s laserovým vybavením průtokového cytometru lze pro analýzu neutrofilů a monocytů volit 4barevný (FLAER/CD24/CD14/CD33),

5barevný (FLAER/CD24/CD14/CD15/CD45, FLAER/CD24/CD14/CD33/CD45, FLAER/CD24/CD14/CD15/CD33) nebo 6barevný (FLAER/CD24/CD14/CD15/CD33/CD45) protokol. Součástí jednotlivých protokolů jsou jak markery na identifikaci cílových populací, tak i nejméně 2 markery pro každou řadu na průkaz GPI defektu.

Preanalytické požadavky k vyšetření PNH erytrocytů a leukocytů dle ICCS

Pro vyšetření PNH je nutné dodat 1–3 ml periferní krve (v souvislosti s WBC) odebrané do zkumavek s anti koagulačním činidlem. Lze použít kyselinu ethylendiamintetraoctovou (EDTA), heparin nebo citrát sodný (ACD). Stabilita vzorku při pokojové teplotě je 24 hod, následně je nutné materiál uchovat při 4 °C. Analýzu leukocytů provádíme do 48 hod po odběru, analýzu erytrocytů můžeme provést do 7 dní. Pro lyzaci erytrocytů lze použít ammonium chloratum (NH₄Cl) komerční nebo vlastní výroby.

Hlášení výsledku a externí hodnocení kvality vyšetření (EHK)

Při zachytu PNH populace je nutné popsat vývojovou řadu (erytrocyty, monocyty, granulocyty), procentuální zastoupení klonu a charakter defektu (kompletní – typ III, částečný – typ II). Při menších počtech PNH buněk je vhodné doplnit, že výsledek nesvědčí pro hemolytickou formu PNH, při negativních nálezech u pacientů s AA nebo MDS je naopak vhodné doporučit další vyšetření s časovým odstupem. Při opakovaném vyšetření popisujeme vývoj nálezu.

Nutná součást správné laboratorní praxe (SLO) je účast v cyklech externího hodnocení kvality nebo mezilaboratorního porovnání. Externí hodnocení kvality vyšetření v rámci Evropy zajišťuje zatím pouze UK NEQAS [21].

Závěr

Průtoková cytometrie se používá pro fenotypizaci PNH buněk od roku 1986, od roku 1996 se stává metodou volby pro diagnostiku a monitorování onemocnění. Velikost a charakter PNH klonu při diagnóze bezprostředně souvisí s klinickým průběhem – vstupní zachyt více než 90 % PNH granulocytů vylučuje možnost remise onemocnění, monitorování u pacientů s nižším PNH granulocytárním klonem je důležité k posouzení progresu, regrese, remise či odpovědi na terapii. Dostupnost metodiky s vysokou citlivostí (< 0,1 %) umožňuje sledování pacientů s AA a včasné zjišťování změn v klinickém průběhu ve smyslu hemolýzy a rizika trombózy. Velikost PNH erytrocytárního klonu má rovněž význam pro posouzení stupně závažnosti choroby a rizika zejména trombotických komplikací.

Narůstající význam vyšetření PNH průtokovou cytometrií v posledních letech výrazně kontrastoval s absencí konsenzuálního dokumentu týkajícího se doporučených laboratorních postupů. Tento paradox byl vyřešen na konci roku 2010, kdy ICCS vydala guidelines pro diagnostiku a monitoro-

vání PNH průtokovou cytometrií. Dokument obsahuje podrobnou analýzu doposud běžně používaných metod, popisuje nová reagentia a laboratorní protokoly v souladu s pokrokem průtokové cytometrie, nabízí standardizované postupy pro analýzu a poskytuje nezbytné podklady pro zavedení a validaci vlastních postupů pro adekvátní vyšetření PNH, které však musí být ověřené v externích cyklech kontroly kvality.

Literatura

1. Oni SB, Osunkoya BO, Luzzatto L. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Evidence for monoclonal origin of abnormal red cells. *Blood* 1970; 36: 145–152.
2. Moyo VM, Mukhina GL, Garrett ES et al. Natural history of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria using modern diagnostic assays. *Br J Haematol* 2004; 126: 133–138.
3. Bessler M, Mason PJ, Hillmen P et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is caused by somatic mutations in the PIG-A gene. *EMBO J* 1994; 13: 110–117.
4. Nafa K, Bessler M, Castro-Malaspina H et al. The spectrum of somatic mutations in the PIG-A gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria includes large deletions and small duplications. *Blood Cells Mol Dis* 1998; 24: 370–384.
5. van der Schoot CE, Huizinga TW, van't Veer-Korthof ET et al. Deficiency of glycosyl-phosphatidylinositol-linked membrane glycoproteins of leukocytes in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, description of a new diagnostic cytofluorometric assay. *Blood* 1990; 76: 1853.
6. Hillmen P, Bessler M, Mason PJ et al. Specific defect in N-acetylglucosamine incorporation in the biosynthesis of the glycosylphosphatidylinositol anchor in cloned cell lines from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 5272–5276.
7. Yamashina M, Ueda E, Kinoshita T et al. Inherited complete deficiency of 20-kilodalton homologous restriction factor (CD59) as a cause of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 1990; 323: 1184–1189.
8. Motoyama N, Okada N, Yamashina M et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria due to hereditary nucleotide deletion in the HRF20 (CD59) gene. *Eur J Immunol* 1992; 10: 2669–2673.
9. Parker C, Omine M, Richards S et al. International PNH Interest Group. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2005; 106: 3699–3709.
10. Hillmen P, Lewis SM, Bessler M et al. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 1995; 333: 1253–1258.
11. Hill A, Hillmen P, Richards SJ et al. Sustained response and long-term safety of eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2005; 106: 2559–2565.
12. Hillmen P, Richards SJ. Flow cytometry in PNH: Serial analysis and the prediction of outcome (abstract). *Blood* 1999; 94 (S1): 412a.
13. Richards SJ, Cullen MJ, Dickinson AJ et al. Evolution of GPI-deficient clones predicts clinical course in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Blood* 2004; 104: 53a.
14. Richards SJ, Rawstron AC, Hillmen P. Application of flow cytometry to the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cytometry (Comm Clin Cytom)* 2000; 42: 223.
15. Borowitz MJ, Craig FE, Di Giuseppe JA et al. Clinical Cytometry Society. Cytometry. Part B. *Clinical Cytometry* 2010; 78B: 211–230.
16. Čermák J, Marinov I, Jelínek J. Clinical significance of CD55 and CD59 deficiency in patients with primary myelodysplastic syndrome. *Blood* 2000; 96: 146–147a.
17. Hall SE, Rosse WF. The use of monoclonal antibodies and flow cytometry in the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1996; 87: 5332.
18. Olteanu H, Karanadikar NJ, McKenna RW et al. Differential usefulness of various markers in the flow cytometric detection of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in blood and bone marrow. *Am J Clin Pathol* 2006; 126: 781–788.
19. Sutherland DR, Kuek N, Davidson J et al. Diagnosing PNH with FLAER and Multiparameter Flow Cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* 2007; 72B: 167.
20. Brodsky RA, Mukhina GL, Nelson KL et al. Resistance of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria cells to the glycosylphosphatidylinositol-binding toxin aerolysin. *Blood* 1999; 93: 1749–1756.
21. Granger V, Whitby L, Richards SJ et al. Development and evaluation of a stabilized whole-blood preparation as a quality control material for screening for paroxysmal nocturnal haemoglobinuria by flow cytometry (abstract). *Cytometry B Clin Cytom* 2005; 68B: 59.

MUDr. Iuri Marinov, CSc.

www.uhkt.cz

e-mail: iuri.marinov@uhkt.cz

Doručeno do redakce: 7. 3. 2011

Přijato po recenzi: 19. 4. 2011

www.csgh.info