

Unowocześnienie diagnostyki nocnej napadowej hemoglobinurii – wstępne wyniki badań przy użyciu odczynnika FLAER

Modernization of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria diagnostics – preliminary results using FLAER reagent

Justyna Spychalska, Barbara Żupańska, Monika Błocka, Hanna Pyl, Ewa Brojer

STRESZCZENIE

Przesiewowym testem FLAER przebadano 50 próbek krwi od pacjentów diagnozowanych w kierunku nocnej napadowej hemoglobinurii (*paroxysmal nocturnal haemoglobinuria*; PNH). Wyniki porównano z wynikami badań rutynowych z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych anti-CD59 i anti-CD66b na granulocytach obojętnochłonnych oraz anti-CD59 na erytrocytach. Czulość testu ($\geq 0,1\%$) i rozmiar klonu PNH w teście FLAER były całkowicie zgodne z wynikami otrzymanymi za pomocą przeciwciał anti-CD66b ($R^2 = 0,9991$) i wyższe niż przy użyciu przeciwciał anti-CD59. Wstępne wyniki wskazują, że zastosowanie FLAER pozwoli na szybką i tańszą od dotychczas stosowanej diagnostykę PNH oraz rezygnację z aktualnie używanych metod przesiewowych. Stwierdzono jednak, że w przypadkach nieprawidłowości w populacji granulocytów należy wykonać dodatkowe badania z użyciem wieloparametrowej analizy cytometrycznej komórek krwi.

Słowa kluczowe: nocna napadowa hemoglobinuria, niedokrwistość aplastyczna, hipoplazja szpiku, pancytopenia, zespoły mielodysplastyczne, cytometria przepływowa

ABSTRACT

Blood samples of 50 patients diagnosed for paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH) were examined using FLAER screening test for the detection of PNH clone. The results were compared with routine testing using monoclonal antibodies detecting CD59 and CD66b antigens on neutrophils and CD59 on erythrocytes. Assay sensitivity ($\geq 0.1\%$) and PNH clone size analysed using FLAER and anti-CD66b antibodies was fully consistent ($R^2 = 0.9991$) and higher than with anti-CD59 antibodies. Preliminary results indicate that for diagnosis of PNH the FLAER based test is quick, reliable and cost-effective. It might seem that the conventional screening methods could therefore be abandoned. It was found however, that in some cases of abnormal granulocyte population, additional studies should be performed using multiparameter flow cytometry blood cell analysis.

Key words: Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria, Aplastic anaemia, Bone marrow hypoplasia, Pancytopenia, Myelodysplastic syndromes, Flow cytometry

© by Polskie Towarzystwo Hematologów i Transfuzjologów i Instytut Hematologii i Transfuzjologii

Otrzymano: 29.02.2012
Zaakceptowano: 2.08.2012

Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej IHiT w Warszawie
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Ewa Brojer

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesu

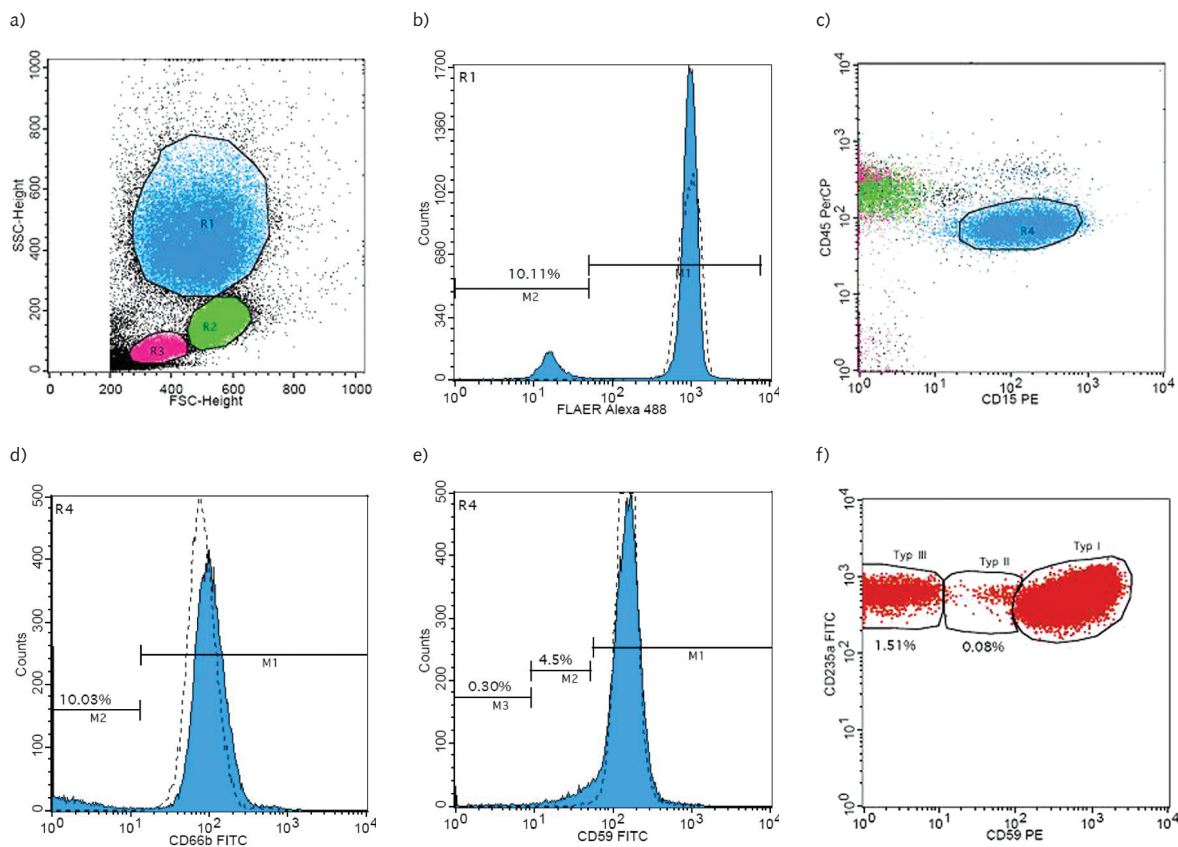
Adres do korespondencji:
Justyna Spychalska
Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej
Instytut Hematologii i Transfuzjologii
ul. Indiry Gandhi 14
02-776 Warszawa
e-mail: justynas@ihit.waw.pl

Acta
Haematologica
Polonica;
43 (3): 285–290

Wstęp

Nocna napadowa hemoglobinuria jest następstwem nabytego, klonalnego defektu krwiotwórczej komórki macierzystej. Przyczyną molekularną choroby jest mutacja somatyczna w genie *PIG-A*, zlokalizowanym na chromosomie X. W konsekwencji mutacji nie dochodzi do syntezy glikozylofosfatydyloinozytolu

(*glycosylphosphatidylinositol*; GPI) – kotwicy lipidowej, za pomocą której z błoną komórkową związane są różne białka powierzchniowe. Brak cząsteczek GPI w błonie komórkowej prowadzi do niedoboru lub całkowitego braku wielu białek na krwinkach, w tym inhibitorów dopełniacza: CD55 i CD59 [1]. Klasyfikacja kliniczna choroby oraz podejście terapeutyczne



Ryc. 1. Analiza cytometryczna u pacjenta 26 z AA. (a) cytogram FSC/SSC przedstawiający 3 populacje leukocytów (granulocyty R1, monocyty R2, limfocyty R3). (b) histogram przedstawiający wiązanie FLAER do granulocytów; wieloparametrowe badania rutynowe: cytogram przedstawiający analizę granulocytów obojętnochłonnych (c), histogramy z ekspresją antygenów CD66b (d) i CD59 (e) na granulocytach obojętnochłonnych i cytogram z analizą erytrocytów o różnym stopniu defektu typu PNH (f); komórki dawcy: linia przerywana

Fig. 1. Flow cytometry analysis in patient 26 with AA: FSC/SSC cytogram of three populations of leukocytes – granulocytes R1, monocytes R2, lymphocytes R3 (a). histogram of binding of FLAER to granulocytes (b); routine multiparameter analysis: cytogram of neutrophils (c), histograms of CD66b (d) and CD59 (e) on neutrophils, cytogram with erythrocytes with different level of PNH defect (f); blood donor cells: broken line

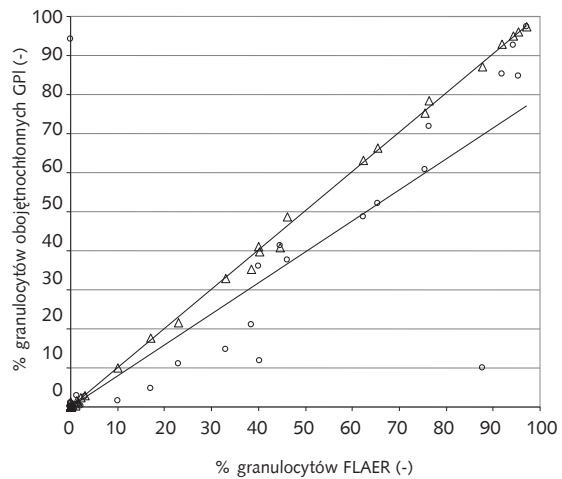
uzależnione są między innymi od rozmiaru klonu komórek potomnych z defektem typu PNH, tzn. od odsetka komórek GPI ujemnych [GPI (-)] we krwi obwodowej pacjenta [2].

Diagnostyka PNH początkowo oparta była na ocenie wrażliwości erytrocytów na układ dopełniacza w teście Hama i teście sacharozowym. Od 1995 r. w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii (IHiT) badania w kierunku PNH opierają się na metodzie pośredniej, polegającej na ocenie ekspresji białek związanych z GPI na komórkach krwi za pomocą cytometrii przepływowej. Identyfikacja komórek GPI(-) wymaga użycia przeciwciał skierowanych do co najmniej dwóch antygenów związanych z GPI na granulocytach i erytrocytach [3]. Przy takim podejściu ocena defektu typu PNH nie zawsze jest łatwa, ze względu na różnice w poziomie ekspresji różnych białek, różny stopień dojrzałości komórek, a także możliwość występowania wrodzonego niedoboru jednego z bia-

łek związanych z GPI [4–7]. Ponadto badania te są czasochłonne i kosztowne, ponieważ wymagają stosowania całego zestawu przeciwciał monoklonalnych [8]. W latach 2002–2010 w IHiT stosowano dodatkowo metodę przesiewową opartą na aglutynacji erytrocytów z przeciwciałami monoklonalnymi anti-CD55 i anti-CD59, która pozwalała na wykrycie 5–10% erytrocytów z defektem GPI [9].

W ostatnich latach weszła do użycia nowa, bezpośrednia metoda oparta na cytometrycznej ocenie wiązania do cząsteczek GPI na powierzchni leukocytów inaktywowanej aerolizyny sprzężonej z barwnikiem fluorescencyjnym (*fluorescently labeled aerolysin*; FLAER). Wykazano, że ocena granulocytów GPI(-) za pomocą testu wiązania FLAER może pełnić rolę taniego i stosunkowo łatwego w interpretacji badania przesiewowego [10,11].

Celem prezentowanej pracy jest przedstawienie wstępnych wyników wykrywania komórek GPI(-) oraz



Ryc. 2. Korelacja pomiędzy rozmiarem klonu PNH ocenionym przesiewowym testem FLAER w populacji granulocytów oraz rutynową wieloparametrową analizą granulocytów obojętnochłonnych z użyciem przeciwciał monoklonalnych anti-CD66b (trójkąty) oraz anti-CD59 (kółka)

Fig. 2. The correlation between the PNH clone size analyzed by FLAER screening test on granulocytes and by multiparameter analysis neutrophils using anti-CD66b (triangles) and anti-CD59 (circles) antibodies

oceny rozmiaru klonu PNH z użyciem odczynnika FLAER we krwi pacjentów, którzy byli równolegle diagnozowani w kierunku PNH rutynową wieloparametrową metodą cytometryczną z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych anti-CD59 i anti-CD66b na granulocytach obojętnochłonnych oraz anti-CD59 na erytrocytach.

Materiał i metody

Badania wykonywano na próbkach pełnej krwi pobranej na EDTA przechowywanych przez 0–48 godzin w temperaturze 2–8°C. Przebadano 50 pacjentów – 6 z PNH, 8 z PNH po przeszczepieniu szpiku kostnego oraz chorych, u których postawiono następujące wstępne rozpoznania: 12 – niedokrwistość aplastyczna (*aplastic anaemia*; AA), 9 – zespół mielodysplastyczny (*myelodysplastic syndrome*; MDS), 4 – pancytopenia, 6 – hipoplazja szpiku lub inne zaburzenia w szpiku prowadzące do cytopenii dwóch linii komórkowych we krwi obwodowej, 1 – osteomielifibroza, 1 – przewlekła białaczka szpikowa (*chronic myelogenous leukaemia*; CML), 2 – hemoglobinuria o nieznanym przyczynie, 1 – zakrzepica żyły wrotnej.

Przesiewowy test FLAER

Pełną krew poddano licze erytrocytów. Leukocyty inkubowano przez 20 minut z 5 µl odczynnika FLAER (Alexa fluor 488 proaerolysin, Pinewood Scientific Services, Canada) o stężeniu 10^{-6} M, następnie odpłukano i utrwalono 2% paraformaldehydem. Anali-

zę 50 000–100 000 granulocytów na podstawie FSC/SSC (wielkość/ziarnistość) przeprowadzono w cytometrze przepływowym FACSCalibur (Becton Dickinson) (przykładowy cytogram przedstawia rycina 1A). Kontrolę dodatnią w teście FLAER stanowiły próbki krwi od zdrowych dorosłych osób (dawców krwi). Zakres normy dla testu (0,00–0,080%) określono na podstawie badań u 45 dawców. Czułość testu (0,1%), potwierdzono przy użyciu mieszanin próbki krwi pacjenta z defektem typu PNH, u którego 63% granulocytów było CD66b(-), z krwią dawcy o zgodnej grupie krwi. Kolejne rozcieńczenia zawierały: 0,00–0,50% granulocytów GPI(-).

Wieloparametrowa analiza granulocytów

Krwinki białe po licze erytrocytów znakowano przeciwciałami monoklonalnymi: anti-CD59 FITC lub anti-CD66b FITC oraz anti-CD15 PE i anti-CD45 PerCP [3]. W cytometrze analizowano 20 000–50 000 granulocytów obojętnochłonnych CD45(+)/CD15(+) (przykład cytogramu na rycinie 1C). Zakres normy dla testu ustalony na podstawie badań u 12 dawców: 0,00–0,09% komórek GPI(-).

Wieloparametrowa analiza erytrocytów

Zawiesinę erytrocytów znakowano przeciwciałami monoklonalnymi anti-CD59 PE i anti-CD235a FITC. Analizowano 250 000 erytrocytów CD235a(+) [11]. Przykładowy cytogram prezentuje rycina 1F. Zakres normy dla testu ustalony na podstawie badań u 33 dawców: 0,00–0,03% erytrocytów CD59(-).

Wyniki

Rozmiar klonu PNH określony za pomocą odczynnika FLAER porównano z rozmiarem klonu na komórkach CD45(+)/CD15(+) (granulocyty obojętnochłonne) ocenianym za pomocą przeciwciał monoklonalnych anti-CD66b i anti-CD59. Przykładowe histogramy z analizy cytofluorometrycznej przedstawiono na rycinie 1B, D i E. Wykazano całkowitą zgodność wyników pomiędzy odsetkiem granulocytów FLAER(-) i CD66b(-) ($R^2 = 0,9991$). W przypadku oceny klonu PNH za pomocą przeciwciał anti-CD59 otrzymano u 19 pacjentów trzy subpopulacje granulocytów obojętnochłonnych: z prawidłową ekspresją CD59 (typ I), z częściowym niedoborem białka CD59 (typ II) i z całkowitym brakiem białka CD59 (typ III). Suma komórek typu II i III odpowiadała wielkości klonu PNH i była zbliżona do wyników uzyskanych za pomocą odczynnika FLAER ($R^2 = 0,7324$) (Ryc. 1E, Ryc. 2).

Testem przesiewowym FLAER nie można było ocenić granulocytów u pięciu chorych. U pacjenta 1. z ciężką AA ocena wiązania FLAER do granulocytów oraz badanie rutynowe tych komórek z użyciem przeciwciał nie było możliwe ze względu na

agranulocytozę (całkowita liczba leukocytów wynosiła 300/ μ l).

W przypadku pacjenta 2. z MDS na analizowanym cytogramie nie można było odróżnić dysplastycznych granulocytów o zmniejszonej ziarnistości od monocytów, dlatego też ocena wiązania FLAER do samych granulocytów była niemożliwa. W badaniach rutynowych u tego chorego wyniki były rozbieżne: obserwowano 70% granulocytów z defektem antygeny CD59 (łącznie typ II i III komórek) oraz 0,13% granulocytów CD66b(-). Badanie erytrocytów nie wykazało obecności krwinek GPI(-).

W próbce krwi pacjenta 3. (z pancytopenią) znajdowały się liczne uszkodzone krwinki białe o zmniejszonym wiązaniu FLAER, których nie można było zróżnicować z nieuszkodzonymi granulocytami i monocytami na podstawie FSC/SSC. W badaniu rutynowym wykryto 0,57% CD66b(-) i 0,20% CD59(-) nieuszkodzonych granulocytów. Podobną trudność sprawiała próbka krwi od pacjenta 4. z rozpoznaniem osteomielifibrozy. Częściowo uszkodzone granulocyty, które wiązały słabiej FLAER, dawały fałszywie dodatni wynik testu. W ocenie rutynowej wynik badania był niejednoznaczny: analizując nieuszkodzone granulocyty, wykryto 0,33% komórek CD66b(-) i 3% CD59(-). Badanie erytrocytów nie wykazało obecności klonu PNH.

Próbka krwi pacjenta 5. z CML była trudna do analizy w teście FLAER ze względu na obecność niedojrzałych komórek o zmniejszonej ziarnistości (niemożliwych do zróżnicowania na populację granulocytów i monocytów na podstawie FSC/SSC na cytogramie), które miały heterogenne wiązanie FLAER. W diagnostyce rutynowej wykazano obecność 0,5% komórek CD66b(-) i 0,51% komórek CD59(-). W populacji erytrocytów nie wykryto komórek GPI(-).

U pozostałych 45 pacjentów na podstawie parametrów FSC/SSC nie było trudności z oceną granulocytów za pomocą przesiewowego testu FLAER. W tej grupie najmniejszy odsetek granulocytów GPI(-) identyfikowany za pomocą testu przesiewowego FLAER (potwierdzony oceną antygenów CD59 i CD66b) wynosił 0,12%.

W testach rutynowych u czterech chorych otrzymano wyniki niejednoznaczne – defekt dotyczył jednego białka związanego z GPI. U pacjenta 6. z MDS wynik testu FLAER był ujemny (0,02% granulocytów FLAER ujemnych), natomiast wykryto u niego 1,25% granulocytów CD66b(-). Ekspresja antygeny CD59 na granulocytach i erytrocytach była prawidłowa. Badanie erytrocytów nie jest tu rozstrzygające, ponieważ pacjent przebył liczne transfuzje KKCz. U pacjenta 7. z MDS wykryto 0,07% granulocytów FLAER(-), a więc wynik testu był ujemny, natomiast wykazano u niego 0,81% granulocytów CD59(-) oraz brak granulocytów CD66b(-) i erytrocytów CD59(-).

U pacjenta 8. z hipoplazją szpiku w teście FLAER wykryto 0,05% granulocytów FLAER(-) (wynik ujemny), podczas gdy w diagnostyce rutynowej wykazano 1,11% granulocytów CD59(-) oraz prawidłową ekspresję CD66b na granulocytach i CD59 na erytrocytach. U pacjenta 9. z hipoplazją szpiku wynik testu FLAER był dodatni (0,12% granulocytów FLAER ujemnych). W rutynowych badaniach wykryto 0,10% granulocytów CD66b(-) oraz prawidłową ekspresję CD59 na granulocytach i erytrocytach.

W pozostałych 41 przypadkach wyniki testu przesiewowego FLAER w porównaniu z rutynowo stosowaną metodą diagnostyczną opartą na wiązaniu przeciwciał monoklonalnych anty-CD66b do granulocytów obojętnochłonnych były całkowicie zgodne. Testem przesiewowym FLAER wykryto klon PNH (powyżej 0,1% granulocytów z defektem) u 23/41 chorych: 6/6 pacjentów z PNH, 1/8 z PNH po przeszczepieniu szpiku, 10/12 z AA, 1/9 z MDS, 2/6 z hipoplazją szpiku, 2/4 z pancytopenią oraz 1/2 z hemoglobinurią. Porównanie wielkości klonu u tych osób w teście FLAER z wynikami badań granulocytów obojętnochłonnych i erytrocytów wykonanych testami rutynowymi prezentuje tabela I.

Omówienie wyników

Badanie opierające się na ocenie wiązania FLAER do granulocytów jest badaniem swoistym – pozwoliło na potwierdzenie obecności klonu PNH u wszystkich pacjentów, u których klon ten wykryto za pomocą dotychczas stosowanych metod. W niniejszej pracy wykazaliśmy, że czułość testu przesiewowego FLAER wynosi 0,1%. Podobne wyniki prezentują Battiwalla i wsp. [12]. Czułość testu FLAER jest porównywalna z czułością uzyskiwaną przy użyciu metody opartej na analizie ekspresji antygeny CD66b na granulocytach obojętnochłonnych. W badanym zakresie (0,1–97,4%) wykazano, że wyniki obu metod wykazują wysoki stopień korelacji ($R^2 = 0,9991$) (Ryc. 2).

Test FLAER jest natomiast dokładniejszy w ocenie rozmiaru klonu granulocytów niż test z użyciem przeciwciał monoklonalnych anty-CD59 (Ryc. 2). Podobne obserwacje mieli inni autorzy [13,14]. Przyпуска się, że na zaniżanie wartości odsetkowej komórek z defektem typu PNH ocenionym na podstawie ekspresji antygeny CD59 mogą mieć wpływ transfuzje krwi i pasaż mikrocząstek zawierających CD59 z erytrocytów dawcy na erytrocyty i granulocyty pacjenta [14].

We wszystkich przypadkach z wykrytym klonem PNH odsetek granulocytów FLAER(-) był większy niż odsetek erytrocytów z defektem CD59 (Tab. I). Wyniki wskazują, że ocena populacji granulocytów w badaniu cytometrycznym w kierunku PNH jest metodą czulszą i dokładniejszą niż ocena erytrocytów. Są one

Tabela I. Wyniki oceny klonu PNH u 23 chorych dokonanej przy użyciu testu przesiewowego FLAER w populacji granulocytów oraz za pomocą wieloparametrowej analizy z różnymi przeciwciałami monoklonalnymi w populacji granulocytów obojętnochłonnych i erytrocytów

Table I. The results of PNH clone size in 23 patients examined by FLAER screening test on granulocytes and by multiparameter tests with various antibodies on neutrophils and erythrocytes

| pacjent | wstępne rozpoznanie | % komórek z defektem typu PNH | | | |
|---------|-----------------------------|-------------------------------|--|---|------------------------------------|
| | | granulocyty FLAER- | CD45 ⁺ /CD15 ⁺ CD66b- | CD45 ⁺ /CD15 ⁺ CD59 II+III | CD235a ⁺ CD59 II+III |
| 10 | PNH | 40,34 | 39,69 | 41,35 | 21,50 |
| 11 | PNH | 46,16 | 48,77 | 48,58 | 18,42 |
| 12 | PNH | 94,31 | 95,02 | 84,82 | 59,59 |
| 13 | PNH | 97,26 | 97,41 | 96,00 | 10,33 |
| 14 | PNH | 22,99 | 21,67 | 14,81 | 16,73 |
| 15 | PNH | 75,52 | 75,25 | 71,94 | 43,01 |
| 16 | PNH/ przeszczepienie szpiku | 3,03 | 2,91 | 1,64 | 1,30 |
| 17 | AA | 1,45 | 1,29 | 0,17 | 0,31 |
| 18 | AA | 17,15 | 17,71 | 10,99 | n.b. |
| 19 | AA | 2,22 | 2,43 | 2,64 | 0,12 |
| 20 | AA | 38,47 | 35,16 | 35,99 | 25,58 |
| 21 | AA | 1,42 | 1,54 | 0,44 | 0,20 |
| 22 | AA | 0,16 | 0,15 | 0,04 | 0,15 |
| 23 | AA | 44,55 | 40,78 | 37,55 | 12,90 |
| 24 | AA | 87,69 | 87,11 | 85,22 | n.b. |
| 25 | AA | 62,40 | 63,03 | 52,08 | 13,82 |
| 26 | AA | 10,11 | 10,03 | 4,80 | 1,59 |
| 27 | MDS | 32,96 | 32,81 | 21,16 | 2,65 |
| 28 | hipoplazja szpiku | 91,83 | 92,83 | 92,70 | 33,92 |
| 29 | hipoplazja szpiku | 0,52 | 0,57 | 0,52 | 0,70 |
| 30 | pancytopenia | 0,40 | 0,41 | 0,10 | 0,06 |
| 31 | pancytopenia | 95,43 | 95,98 | 97,26 | 58,29 |
| 32 | hemoglobinuria | 76,44 | 78,43 | 10,01 | 33,80 |

n.b. – nie badano, PNH – nocna napadowa hemoglobinuria, AA – niedokrwistość aplastyczna, MDS – zespół mielodysplastyczny, FLAER – znakowana fluorescencyjnie aerolizyna

n.b. – not tested, PNH – paroxysmal nocturnal haemoglobinuria, AA – aplastic anaemia, MDS – myelodysplastic syndrome, FLAER – fluorescently labeled aerolysin

zgodne z wcześniejszymi doświadczeniami własnymi [3] oraz wynikami innych ośrodków [9,11]. Przyczyną fałszywie zaniżonego odsetka erytrocytów z defektem typu PNH mogą być transfuzje krwi poprzedzające badanie i przyspieszona hemoliza krwinek GPI(-). Dlatego też ocenę erytrocytów należy traktować jako badanie uzupełniające, a nie, jak dotychczas, jako badanie podstawowe w kierunku PNH [8].

Badanie granulocytów z użyciem FLAER sprawiło trudności techniczne w przypadkach występowania u chorego zaburzeń w szpiku kostnym związanych z cechami odmłodzenia linii mieloidalnej, dysplazji, agranulocytozy oraz w przypadkach, gdy krwinki białe we krwi dostarczonej do laboratorium były uszkodzone. Wg Sutherland i wsp., niedojrzałe prawidłowe leukocyty oraz komórki blastyczne w białaczkach wykazują większe wiązanie FLAER niż komórki

GPI(-) w PNH, ale zawsze niższe niż prawidłowe granulocyty, monocyty i limfocyty [15]. Wstępne wyniki wskazują, że w powyższych sytuacjach niezbędne jest zastosowanie dodatkowych przeciwciał monoklonalnych skierowanych do antygenów powierzchniowych będących markerami linii komórkowej granulocytów (CD45, CD15) oraz przeciwciał skierowanych do białek związanych z kotwicami GPI, takich jak: CD66b, CD24, CD16, CD157. Można również podjąć próbę dodatkowej oceny monocytów przy użyciu przeciwciał monoklonalnych do antygenów CD33 i CD14 lub CD157 [15–17].

Według ustalonych międzynarodowych wytycznych, obecność komórek typu PNH musi być potwierdzona całkowitym brakiem lub niedoborem co najmniej dwóch białek związanych z GPI na dwóch liniach komórek krwi [8]. W naszych rutynowych badaniach mieli-

śmy trudności z interpretacją wyników defektu typu PNH przy analizie CD66b i CD59 na granulocytach obojętnochłonnych u 4 osób. Wiązać to można między innymi z hypogranulacją niektórych granulocytów i z nieprawidłowością ekspresji różnych antygenów na granulocytach. Zaburzenia takie mogą występować w mielodysplazjach, które związane są z zaburzeniami dojrzewania komórek [18,19]. W powyższych przypadkach ocena wiązania FLAER do granulocytów pozwoliła na ustosunkowanie się do rozbieżnych wyników, w których defekt dotyczył tylko jednego z białek związanych z kotwicami GPI.

Wnioski

Wstępne wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że zastosowanie testu FLAER pozwoli na szybką i tańszą diagnostykę w kierunku PNH oraz na rezygnację z mniej miarodajnych metod przesiewowych opartych na analizie erytrocytów (testy: Hama, sacharozowy, aglutynacyjny DiaMed, cytometryczna ocena ekspresji CD59 i CD55), a także w większości przypadków z analizy ekspresji antygenów CD59 i CD66b w populacji granulocytów obojętnochłonnych. Stwierdzono jednak, że w przypadku nieprawidłowości w morfologii granulocytów, ich znacznego odmłodzenia, uszkodzenia lub ich niewielkiej liczby nie można opierać się na teście FLAER. W takich sytuacjach diagnostykę PNH należy uzupełnić oceną ekspresji białek związanych z GPI na dobrze zdefiniowanych populacjach komórek (granulocyty obojętnochłonne i/lub monocyty) za pomocą rutynowej wieloparametrowej analizy cytometrycznej.

Piśmiennictwo

1. Brodsky RA: Advances in the diagnosis and therapy of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood Rev* 2008;22:65-74.
2. Parker C, Omine M, Richards S et al.: Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2005;106:3699-3709.
3. Żupańska B, Spsychalska J, Pyl H, Mendek-Czajkowska E, Brojer E: Nocna napadowa hemoglobinuria – wieloletnie obserwacje. Charakterystyka kliniczna i analiza wielkości klonu z defektem kotwicy glikozylfosfatydyloinozytolowej (GPI). *Acta Haematol Pol* 2012;43:75-82.
4. Ruiz-Delgado GJ, Vazquez-Garza E, Mendez-Ramirez N, Gomez-Almaguer D: Abnormalities in the expression of CD55 and CD59 surface molecules on peripheral blood cells are not specific to paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Hematology* 2009;14:33-37.
5. Wang SA, Pozdnyakova O, Jorgensen JL et al.: Detection of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones in patients with myelodysplastic syndromes and related bone marrow diseases, with emphasis on diagnostic pitfalls and caveats. *Haematologica* 2009;94:29-37.
6. Hernandez-Campo PM, Almeida J, Acevedo MJ et al.: Detailed immunophenotypic characterization of different major and minor subsets of peripheral blood cells in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Transfusion* 2008;48:1403-1414.
7. Shichishima T, Saitoh Y, Terasawa T, Noji H, Kai T, Maruyama Y: Complement sensitivity of erythrocytes in a patient with inherited complete deficiency of CD59 or with the Inab phenotype. *Brit J Haematol* 1999;104:303-306.
8. Borowitz MJ, Craig FE, DiGiuseppe JA et al.: Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. *Cytometry Part B* 2010;78B:211-228.
9. Żupańska B, Konopka L, Bogdanik I, Pyl H: Utajony defekt typu nocnej napadowej hemoglobinurii. *Acta Haematol Pol* 2005;36:207-214.
10. Peghini PE, Fehr J: Clinical evaluation of an aerolysin-based screening test for paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Cytometry Part B* 2005;67B:13-18.
11. Sutherland DR, Kuek N, Azcona-Olivera J et al.: Use of a FLAER-based WBC assay in the primary screening of PNH clones. *Am J Clin Pathol* 2009;132:564-572.
12. Battiwalla M, Hepgur M, Pan DL et al.: Multiparameter flow cytometry for the diagnosis and monitoring of small GPI-deficient cellular populations. *Cytometry Part B* 2010;78B:348-356.
13. Brodsky RA, Mukhina GL, Li SY et al.: Improved detection and characterization of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria using fluorescent aerolysin. *Am J Clin Pathol* 2000;114:459-466.
14. Sloand EM, Mainwaring L, Keyvanfar K et al.: Transfer of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins to deficient cells after erythrocyte transfusion in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2004;104:3782-3788.
15. Sutherland DR, Kuek N, Davidson J et al.: Diagnosing PNH with FLAER and multiparameter flow cytometry. *Cytometry Part B* 2007;72B:167-177.
16. Sutherland DR, Keeney M, Acton E, Davis BH, Illingworth A: Use of CD157 in FLAER-based assays for high-sensitivity PNH granulocyte and PNH monocyte detection. *Cytometry Part B* 2011;80B:387-387.
17. Challagundla P, Jorgensen JL: Utility of the GPI-linked antigen CD157 in the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) by flow cytometry: Advantages over CD14 for analysis of monocytes. *Lab Invest* 2012;92:327A-327A.
18. van de Loosdrecht AA, Alhan C, Bene MC et al.: Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: Report from the first european leukemianet working conference on flow cytometry in myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2009;94:1124-1134.
19. Monaghan SA, Surti U, Doty K, Craig FE: Altered neutrophil maturation patterns that limit identification of myelodysplastic syndromes. *Cytometry Part B* 2012;82B:217-228.