

## Empfehlungen zur Diagnostik der Paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie: deutsch – österreichischer Konsensus

### Recommendations for the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a German-Austrian consensus

**Hubert Schrezenmeier<sup>1,\*</sup>, Peter Bettelheim<sup>2</sup>,  
Jens Panse<sup>3</sup>, Jörg Schubert<sup>4</sup>, Britta Höchsmann<sup>1</sup>,  
Alexander Röth<sup>5</sup> und Thomas Nebe<sup>6</sup>**

<sup>1</sup> Institut für Klinische Transfusionsmedizin und  
Immungenetik Ulm, DRK Blutspendedienst  
Baden-Württemberg – Hessen und Institut für  
Transfusionsmedizin, Universität Ulm, Ulm, Deutschland

<sup>2</sup> Hämatologie mit Stammzelltransplantation,  
Hämostaseologie und medizinische Onkologie, Krankenhaus  
der Elisabethinen Linz, Linz, Österreich

<sup>3</sup> Medizinische Klinik IV – Hämatologie und Onkologie,  
Universitätsklinikum Aachen, Aachen, Deutschland

<sup>4</sup> Abteilung Hämatologie/Onkologie, Evangelisches  
Krankenhaus Hamm gGmbH, Hamm, Deutschland

<sup>5</sup> Klinik für Hämatologie, Westdeutsches Tumorzentrum,  
Universitätsklinikum Essen, Essen, Deutschland

<sup>6</sup> Hämatologisches Speziallabor, MVZ Onkologikum  
Frankfurt am Main, Frankfurt/Main, Deutschland

#### Zusammenfassung

Die paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie (PNH) ist eine seltene, lebensbedrohliche hämatologische Erkrankung. Durch eine erworbene Mutation im *PIG-A* Gen von hämatopoetischen Progenitorzellen kommt es zu einem Fehlen des Glycosylphosphatidylinositols (GPI), einem gemeinsamen Ankermolekül für bestimmte Oberflächenproteine. Die Folge ist unter anderem ein Mangel des „decay-accelerating factor“ (DAF, charakterisiert durch CD55-Antikörper) und des „membrane inhibitor of reactive lysis“ (MIRL, markiert durch CD59-Antikörper) an der Oberfläche von Blutzellen mit daraus resultierender fehlender Komplementregulation, so dass es zu der charakteristischen intravasalen Hämolyse und thromboembolischen Komplikationen kommt. Die Analyse

der Expression GPI-verankerter Proteine auf Blutzellen ist in der PNH-Diagnostik und Verlaufskontrolle der anerkannte Goldstandard. In den kürzlich veröffentlichten internationalen Leitlinien stehen manche Aspekte weiterhin zur Diskussion. Wir haben auf der Grundlage dieser Leitlinien praktische Empfehlungen diskutiert und sind zu dem vorliegenden deutsch-österreichischen Konsensuspapier gelangt, welches konkrete Vorschläge, beginnend von der Indikationsstellung über präanalytische Aspekte bis hin zur Durchführung der Immunphänotypisierung und Befundinterpretation, präsentiert. Vorgeschlagen wird eine Zweistufendiagnostik: Die Stufe 1 ist als Screening zu sehen. Die Diagnostikstufe 2 dient der Befundbestätigung. Diese Stufe sollten Speziallabore übernehmen, welche umfassende Erfahrung mit PNH haben. Anhand eines Algorithmus zur Stufendiagnostik werden konkrete Empfehlungen gegeben, welches Antikörperpanel in welcher Diagnostikstufe sinnvoll zum Einsatz kommen sollte. In Tabellenform werden die gängigen Fehlerquellen und deren Behebung aufgegriffen. Dieser Konsens soll Labore unterstützen, möglichst zeitig eine korrekte Diagnose zu stellen, was für den Patienten therapeutisch und prognostisch von entscheidender Bedeutung ist. Dabei sollen jedoch Praktikabilität und Wirtschaftlichkeit der Maßnahmen nicht unberücksichtigt gelassen werden.

**Schlüsselwörter:** deutsch-österreichischer Konsens; Durchflusszytometrie; GPI-verankerte Proteine; Immunphänotypisierung; paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie; Stufendiagnostik.

#### Abstract

Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is a rare, life-threatening hematological disease. An acquired mutation in the *PIG-A* gene in hematopoietic precursor cells leads to a deficiency of glycosylphosphatidylinositol (GPI), a common membrane anchor for certain cell surface proteins. The consequence is a deficiency of the decay accelerating factor (recognized by antibodies of the cluster CD55) and of the membrane inhibitor of reactive lysis (MIRL, recognized by CD59 antibodies) on the surface of blood cells leading to dysregulation of the complement cascade resulting in

\*Korrespondenz: Prof. Dr. med. Hubert Schrezenmeier, Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Immungenetik Ulm, DRK Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen und Universität Ulm, Helmholtzstraße 10, 89081 Ulm, Deutschland  
Tel.: 0731-150-550  
Fax: 0731-150-500  
E-Mail: h.schrezenmeier@blutspende.de

characteristic intravascular hemolysis and thromboembolic complications. The analysis of GPI-anchored proteins on blood cells is the recognized diagnostic gold standard. Some aspects of the recently published international guidelines are still a matter of discussion. On the basis of these guidelines, we discussed practical recommendations which led to the German-Austrian consensus paper presented here. It contains specific proposals for indication of the test, preanalytical aspects, how to perform immunophenotyping and for interpretation of results. We propose a two-step diagnostic approach. Step 1 is a screening and step 2 is a confirmation of the diagnosis. The latter should be restricted to laboratories who have substantial experience with PNH. According to this algorithm for a stepwise diagnostic approach we recommend which antibody panel should be used in which step. The most frequent sources of error and how to avoid them are also summarized. This consensus should support medical laboratories in making an early and correct diagnosis of what is important to the therapy and prognosis of the patient. Aspects of economic efficiency and feasibility were also included in our considerations.

**Keywords:** flow cytometry; German-Austrian consensus; GPI anchored proteins; immunophenotyping; paroxysmal nocturnal hemoglobinuria; stepwise diagnosis.

## Einführung paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie

### Definition, Pathophysiologie und Therapie

Die paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie (PNH) ist eine seltene progressive, lebensbedrohliche hämatologische Erkrankung. Die geschätzte Inzidenz liegt bei 1,3 Neuerkrankungen je 1.000.000/Jahr, die Prävalenz der PNH beträgt 5,5 bis 15,9:1.000.000 [1, 2]. Eine PNH kann bei Patienten jeden Alters auftreten, das Durchschnittsalter bei Diagnosestellung liegt bei Anfang dreißig [3]. Die Überlebenszeit ab Diagnosestellung beträgt nach älteren Studien (vor Einführung von Eculizumab) 10 bis 22 Jahre [4, 5], knapp 25% der Patienten starben innerhalb von 10 Jahren nach der Diagnose [5]. Bei der Erkrankung liegen erworbene Mutationen im *PIG-A* Gen einer oder weniger hämatopoetischer Progenitorzellen vor. Dieses Gen ist auf dem X-Chromosom lokalisiert und kodiert für die Synthese des Glycosylphosphatidylinositols (GPI). GPI dient zahlreichen Oberflächenproteinen als Anker, darunter den komplementregulierenden Proteinen CD55 (DAF, decay accelerating factor) und CD59 (MIRL, membrane inhibitor of reactive hemolysis). Mutationen im *PIG-A* Gen führen zu einer verminderten oder völlig fehlenden GPI-Synthese und damit einem Fehlen dieses Ankers [6–10]. Das führt zu einem partiellen oder völligen CD55- und CD59-Mangel an der Oberfläche der Blutzellen (Leukozyten, Thrombozyten und insbesondere Erythrozyten). Die damit einhergehende fehlende Komplementregulation bedingt die für die Erkrankung charakteristische intravasale Hämolyse

[7, 11–13]. Die klinische Trias aus hämolytischer Anämie, thrombophiler Diathese und hämatopoetischer Insuffizienz kennzeichnet die PNH. Das Auftreten thromboembolischer Ereignisse (auch mit ungewöhnlicher Lokalisation wie Lebervenen, z. B. Budd-Chiari-Syndrom) ist neben der intravasalen Hämolyse ein weiteres Leitsymptom der PNH. Die Erkrankung ist klinisch vielgestaltig, sie kann isoliert auftreten oder in Verbindung mit anderen Veränderungen des Knochenmarks, wie einer aplastischen Anämie (AA), eines myelodysplastischen Syndroms im Stadium einer refraktären Anämie (RA-MDS) [12] oder eine Osteomyelofibrose (OMF). Aktuelle Untersuchungen zufolge finden sich bei Anwendung hoch-sensitiver Nachweismethoden bei bis zu 70% der AA-Patienten sowie bei bis zu 55% der MDS-Patienten PNH-Zellen [14].

Zur Behandlung der PNH standen bis 2007 ausschließlich unspezifische Maßnahmen wie Bluttransfusionen, Kortikosteroide, Antikoagulanzen, Folsäure und Eisen zur Verfügung. Eine allogene Stammzelltransplantation ist zwar die einzige kurative Therapiemöglichkeit der PNH, sie ist jedoch mit einer hohen Mortalität und Morbidität assoziiert: Die 2-Jahres-Mortalität mit HLA-identischem Spender beträgt bis zu 44% [12, 15]. Die einzige den Patienten heute zur Verfügung stehende zielgerichtete Therapie ist die Komplementinhibition durch Eculizumab (Soliris®), die in Europa seit Juni 2007 zugelassen ist [6, 16–19]. Eculizumab ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper, der an den Komplement-Faktor C5 bindet. Er verhindert dadurch dessen Spaltung in die Fragmente C5a und C5b und blockiert die Bildung des terminalen Komplementkomplexes C5b [2, 20]. Da durch die Therapie mit Eculizumab ein Teil der unspezifischen Immunabwehr blockiert wird, besteht ein erhöhtes Infektionsrisiko vor allem gegenüber Meningokokken. Daher müssen alle Patienten vor Beginn einer Eculizumab-Therapie mit einem tetravalenten, konjugierten Impfstoff geimpft werden.

### PNH-Diagnostik

Die Diagnose der PNH ist oft schwierig, da die initiale Symptomatik vielgestaltig und auch die Hämoglobinurie nicht zwingend vorhanden ist [4, 5, 21]. Die *Immunphänotypisierung GPI-verankerter Proteine oder des GPI-Ankers selbst* ist heute die empfindlichste und aussagekräftigste Nachweismethode und damit Goldstandard in der PNH-Diagnostik. Im Vergleich zu anderen PNH-Nachweismethoden liefert sie quantitativ und qualitativ die besten und auch verlässlichsten Informationen [22, 23]. Andere diagnostische Testverfahren, wie z. B. der Säurehämolyse-Test (Ham's-Test), sind weniger sensitiv und spezifisch als die Durchflusszytometrie und erfassen nur die Erythrozyten. Sie sind sowohl für Screening als auch Diagnostik inzwischen obsolet.

Zur weiteren Basisdiagnostik der PNH gehören eine ausführliche Familien und Eigenanamnese, eine körperliche Untersuchung und eine Oberbauchsonographie. Als weitere Laboruntersuchungen sollten außer der GPI-Durchflusszytometrie durchgeführt werden: Blutbild mit Differenzialblutbild und Retikulozytenzahl,

Retikulozytenproduktionsindex (RPI) [24], LDH, Bilirubin (direkt und indirekt), Haptoglobin, direkter Coombs-Test, Folsäure, Vitamin B12, Eisenstoffwechsel (Ferritin, Transferrin, Transferrinsättigung, Retikulozytenhämoglobin, löslicher Transferrin-Rezeptor), Nieren- und Leberfunktionsparameter. Der lösliche Transferrin-Rezeptor ist aufgrund der gesteigerten Erythropoiese meist erhöht und damit nicht gut beurteilbar [24]. Eine Knochenmarkdiagnostik mit Zytologie, Histologie und Zytogenetik ist bei gleichzeitiger Zytopenie und Verdacht auf eine PNH im Kontext einer anderen hämatologischen Erkrankung (besonders bei aplastischer Anämie oder myelodysplastischem Syndrom) indiziert [12].

Bei der Durchflusszytometrie mit spezifischen Antikörpern gegen GPI-verankerte Proteine [23] lassen sich Zellen, deren GPI-verankerte Oberflächenproteine vollständig fehlen (Typ III-Zellen), von Zellen mit nur teilweisem Verlust (Typ II-Zellen), unterscheiden. Den Typ III-Zellen liegen solche PIGA-Mutationen zugrunde (meist Insertionen oder Deletionen mit Verschiebung des Leserasters), welche zu einem völligen Funktionsverlust des Genprodukts führen [25]. Dagegen liegen in PNH-Typ II-Zellen meist Punktmutation mit Aminosäureaustausch vor, welche eine reduzierte, aber nicht völlig aufgehobene Aktivität der kodierten Glykosyltransferase verursachen [10]. Zellen mit normaler Expression der GPI-verankerten Proteine werden als Typ I-Zellen (= normale Zellen) bezeichnet.

**Ziel der GPI-Durchflusszytometrie** Der Nachweis oder Ausschluss einer signifikanten GPI-defizienten Population kann bei initialer Diagnostik und im Verlauf verschiedenen Zwecken dienen:

- Diagnose oder Ausschluss einer PNH oder eines Überlappungssyndroms von PNH mit anderen Erkrankungen der Hämatopoese (immer im Gesamtkontext mit Anamnese und klinischen Untersuchungsbefunden).
- Nachweis und Quantifizierung GPI-defizienter Populationen als prognostischer Marker (z. B. Risiko thromboembolischer Komplikationen bei PNH; Ansprechen auf Immunsuppression bei Überlappungssyndromen mit aplastischer Anämie oder MDS) oder als Basis für Therapieentscheidungen.
- Nachweis und Quantifizierung von GPI-defizienten Populationen zur Therapiekontrolle (z. B. unter Eculizumab; Immunsuppression bei Überlappungssyndromen; Remissionskontrolle nach allogener Stammzelltransplantation).

Das erste Ziel einer Screening-Untersuchung ist der Nachweis einer signifikanten Population von Blutzellen mit reduzierter oder fehlender Expression GPI-verankerter Proteine. Ist das der Fall, wird bestimmt, welche hämatopoetischen Zellreihen betroffen sind. Das Ausmaß des Defektes wird durch Bestimmung des Anteils der GPI-defizienten Zellen, bzw. des Anteils an PNH-Typ II- und PNH-Typ III-Zellen, in den einzelnen Zellreihen quantifiziert [4, 7, 12, 26]. Bei Verlaufsuntersuchungen von Patienten mit bekannter GPI-Defizienz sollen Änderungen im Anteil der GPI-defizienten Zellen und der Beteiligung der Zellreihen erfasst werden.

**Wann ist die durchflusszytometrische Diagnose PNH gesichert?** Der Nachweis einer signifikanten GPI-defizienten Population, d. h. von PNH-Zellen, steht fest, wenn folgende Bedingungen erfüllt sind:

- bei mindestens zwei Zellreihen (z. B. Erythrozyten und Granulozyten oder Retikulozyten und Granulozyten) liegt eine signifikante GPI-defiziente Population vor.
- Es müssen auf jeder Zellreihe mindestens zwei GPI-verankerte Proteine oder mindestens ein GPI-verankertes Protein und der GPI-Anker selbst (mittels FLAER) untersucht werden („2x2-Regel“, d. h. mindestens zwei Zellreihen, mindestens zwei GPI-verankerte Marker pro Zellreihe).
- Die Ergebnisse dieser Untersuchungen müssen konkordant sein. Defizienz eines GPI-verankerten Markers (z. B. CD16, welches auf Eosinophilen oder zirkulierenden Vorstufen nicht exprimiert ist) bei normaler Expression anderer GPI-verankerter Proteine (z. B. CD24 oder CD66b) spricht für ein analytisches Problem oder einen isolierten Defekt eines Proteins, aber nicht für eine GPI-Ankerdefizienz im Sinne einer PNH [12, 22, 27].

Der durchflusszytometrische Nachweis GPI-defizienter Zellen ist zwar ein zentrales diagnostisches Werkzeug, wird aber nie exklusiv zur Diagnose einer PNH herangezogen. Dieser essentielle Laborbefund muss immer in eine Gesamtbewertung, einschließlich Anamnese, Verlauf, klinischer Symptomatik und weiterer Laborbefunde, einfließen.

## Notwendigkeit standardisierter Empfehlungen, Zweistufendiagnostik und Zielgruppen [22]

Ein korrekter Nachweis GPI-defizienter Zellen ist für ein optimales Patientenmanagement unerlässlich. Wegen der Seltenheit der Erkrankung können nur wenige Laboratorien regelmäßige Kontrolluntersuchungen durchführen, so dass sich bislang die Vorgehensweisen zum Nachweis GPI-defizienter Klone zum Teil beträchtlich unterscheiden. Das spiegelt sich auch darin wider, dass in der bislang zu dieser Fragestellung veröffentlichten Literatur keine einheitliche Empfehlung zur Methodik gegeben wird. Um standardisierte Richtlinien zur PNH-Diagnostik zu entwickeln und in diesem Sinne die PNH-Diagnostik zu verbessern, ist es daher zwingend notwendig, die Diagnostik-Empfehlungen den ICCS-Leitlinien anzupassen. Diese Empfehlungen sollen in der vorliegenden Übersicht zusammengefasst werden.

## Analysemethoden

*Analysen zur Diagnose einer PNH und Hochsensitivitäts-Analysen* unterscheiden sich in der Sensitivität. Hochsensitivitäts-Analysen können sehr kleine GPI-defiziente Populationen nachweisen (0,01% oder kleiner) und sind derzeit wissenschaftlichen Fragestellungen vorbehalten. In den folgenden Abschnitten werden daher primär die Analysen zur Diagnosestellung und Verlaufsbeurteilung dargestellt, mittels derer ein Anteil GPI-defizienter Erythrozyten oder Granulozyten von 1% noch nachweisbar sein sollten.

Um als PNH-Screeningtest geeignet zu sein, muss eine diagnostische Methode in der Lage sein, sowohl die Patienten mit großen GPI-defizienten Populationen zu identifizieren, die in der Regel mit hämolytischer und/oder thrombotischer PNH assoziiert sind, als auch diejenigen mit sehr kleinen GPI-defizienten Populationen, z. B. im Kontext von AA und anderen Knochenmarkinsuffizienzen, zu detektieren. Diagnostische Methoden sind in der Literatur mehrfach beschrieben. Sie erfordern eine gute Standardisierung und regelmäßige Qualitätskontrollen. Um die Diagnostik zu verbessern und gleichzeitig zu vereinfachen, wird die Durchführung einer Zweistufendiagnostik empfohlen (Konsensus; siehe Kapitel *Präanalysephase*).

### Welche Patienten sollten hinsichtlich PNH getestet werden?

Eine PNH wird aufgrund von unspezifischen Symptomen oft nicht oder sehr verzögert diagnostiziert. Gemäß den Empfehlungen der ICSS-Leitlinien zur Evaluierung von Patienten mit PNH ist daher bei den folgenden Indikationen eine PNH-Diagnostik sinnvoll [12, 22, 26].

1. erworbene Coombs-negative hämolytische Anämien (ohne Zeichen einer mikroangiopathischen Hämolyse)
2. Intravasale Hämolyse mit Hämoglobinurie/Hämosiderinurie und erhöhtem freien Plasmahämoglobin
3. Anzeichen einer ungeklärten Hämolyse bei gleichzeitigem Vorliegen von
  - Eisenmangel oder
  - abdominalen Schmerzen oder Dysphagie oder
  - Thrombosen oder
  - Granulozytopenie und/oder Thrombozytopenie
4. Thrombosen, wenn mindestens eines der folgenden Kriterien erfüllt ist:
  - „atypische“ Lokalisation
  - Lebervenen (Budd-Chiari Syndrom)
  - andere Bauchvenen (Pfortader, Milzvene, viszerale Venen)
  - zerebraler Sinus
  - dermale Venen
5. Thrombosen (unabhängig von ihrer Lokalisation) mit Anzeichen einer gleichzeitigen Hämolyse
6. Thrombosen (unabhängig von ihrer Lokalisation) mit ungeklärter Zytopenie
7. Thrombosen (unabhängig von ihrer Lokalisation) ohne bekannte Risikofaktoren
8. Vorliegen einer Knochenmarkinsuffizienz
  - Verdacht auf oder Nachweis einer aplastischen Anämie
  - Verdacht auf oder Nachweis eines myelodysplastischen Syndroms (Refraktäre Anämie, Refraktäre Anämie mit multilineärer Dysplasie).
  - Andere Knochenmarkerkrankungen (z. B. chronisch myeloproliferatives Syndrom) mit Hämolyse
  - Andere Zytopenien unbekannter Ursache nach angemessener Diagnostik

Häufige klinische Symptome bei Diagnosestellung sind in Tabelle 1 aufgeführt: Die prognostischen und therapeutischen Implikationen erfordern eine frühestmögliche und eindeutige Diagnosestellung [22]. Daher empfehlen die ICCS-Leitlinien für PNH sowie die International PNH Interest Group (IPIG) eine kontinuierliche Überwachung von Patienten mit hohem Risiko für PNH [12, 22].

### Häufigkeit der Kontrolluntersuchungen

Bei Patienten mit einer gesicherten PNH-Diagnose sollte die Größe des PNH-Klons in regelmäßigen Abständen überprüft werden [22]. Während der ersten zwei Jahre nach Diagnosestellung sollte eine durchflusszytometrische Analyse im Abstand von sechs Monaten erfolgen und bei stabilem Verlauf anschließend jährlich. Jegliche Änderungen der klinischen und hämatologischen Parameter erfordern jedoch eine individuelle Anpassung der Untersuchungsintervalle. Das gilt für Verschlechterungen und Verbesserungen des Krankheitszustands gleichermaßen, da Veränderungen der Klongröße in beide Richtungen Rückschlüsse auf die veränderte Klinik zulassen. Bei Patienten, die eine Therapie mit Eculizumab erhalten, sind regelmäßige Kontrollen hilfreich, um die Stabilisierung des Erythrozyten-Klons zu belegen. Wenn dieser Nachweis erbracht ist, sollte die Untersuchung in jährlichen Abständen bzw. bei Änderung der klinischen Symptomatik oder bei Therapieänderung erfolgen. Nach allogener Stammzelltransplantation empfehlen wir regelmäßige durchflusszytometrische Analysen (etwa alle drei Monate) bis die GPI-defiziente Population nicht mehr nachweisbar ist. Danach sind jährliche Remissionskontrollen zu empfehlen.

Weiterhin sind regelmäßige Kontrolluntersuchungen (bei Diagnosestellung und danach einmal pro Jahr, bzw. bei Zeichen einer Hämolyse) bei folgenden Patienten wichtig:

- Patienten mit aplastischer Anämie mit kleinen Klonen, die eine klinisch relevante PNH entwickeln können
- Patienten mit einem myelodysplastischen Syndrom (Refraktäre Anämie, Refraktäre Anämie mit multilineärer Dysplasie).

Bei Patienten unter Eculizumab-Therapie kann es zu einem positiven Antiglobulin-Test kommen, welcher durch eine C3d-Beladung der Erythrozyten bedingt ist [31, 32].

**Tabelle 1** Häufige klinische Symptome bei Diagnosestellung.

Symptome	Häufigkeit, %
Anämie	bis zu 100% [5]
Fatigue, eingeschränkte Lebensqualität	96% [28]
Dyspnoe	66% [28]
Chronische Niereninsuffizienz (Stadium 1 bis 5)	65% [29]
Abdominelle Schmerzen	57% [28]
Erektile Dysfunktion	47% [28]
Dysphagie	41% [28]
Thrombose	39% [4]
Hämoglobinurie	26% [30]



Die für die PNH oft gebrauchte Klassifikation als „Coombs-negative hämolytische Anämie“ gilt somit nicht mehr zwingend für Verlaufsuntersuchungen während Eculizumab-Therapie [31–33].

## Empfehlungen zur Durchflusszytometrie-Analyse

### Allgemeines

Vorab sind folgende Punkte zu klären:

- **Einsendeinformationen:** Das beauftragte Labor sollte auf einem Begleitschein zur Probeneinsendung folgende Informationen erhalten: Klinische Symptome und Laborbefunde, welche den Verdacht auf eine PNH begründen (Hämoglobinurie, Hämolyse-Parameter, Antiglobulin-Test, thromboembolische Ereignisse, Eisenmangel unklarer Genese), aktuelle klinische Diagnose des Patienten, Vorerkrankungen mit erhöhtem PNH-Risiko in der Anamnese (aplastische Anämie, myelodysplastisches Syndrom des Subtyps RA), zurückliegende Transfusionen (falls ja, Anzahl und Zeitpunkt der Transfusionen in den letzten drei Monaten). Bei Verlaufsuntersuchungen ist insbesondere die aktuelle Therapie mitzuteilen (vor allem Eculizumab-Therapie einschließlich Beginn). Bei Kontrollen nach Immunsuppression oder Stammzelltransplantation sind die Art der Therapie und der Zeitpunkt anzugeben.
- Durchgeführte **Bluttransfusionen** vor Blutentnahme, da diese das Ergebnis verfälschen.
- **Untersuchungsmaterial: Peripheres Blut (bevorzugt EDTA-antikoaguliert).** Knochenmark ist zur Routinediagnostik nicht geeignet, da hämatopoetische Progenitorzellen verschiedener Differenzierungsstadien die GPI-verankerten Proteine in unterschiedlichem Ausmaß exprimieren und entsprechend die Interpretation sehr schwierig ist.
- **Probenvolumen:** 1 mL ist das Minimum, 3 mL sind für die meisten Testungen geeignet. Wenn die Anzahl der Leukozyten sehr gering ist, kann eine größere Probenmenge nötig sein [22, 27, 34].
- **Antikoagulanzen:** EDTA ist als Antikoagulanzen der Wahl allgemein akzeptiert [22, 27, 34]. Konträr zu den aktuellen internationalen Leitlinien raten wir von der Verwendung von Heparin als Antikoagulanzen ab, da es zu einer problematischen Thrombozytenaggregation kommen kann. Dadurch kann es beim Messvorgang zu Überlagerungen der Granulozyten durch Thrombozyten mit dem Risiko von Falschmessungen kommen. Häufig kommt es darüber hinaus zur Agglutination der Thrombozyten mit Monozyten oder Granulozyten [34].
- **Probenversand:** jahreszeitabhängiger Hitze-/Kälteschutz.
- **Probenalter sollte möglichst unter 48 Stunden liegen (für die Untersuchung von Leukozyten):** Das maximale Probenalter für die Untersuchung der Erythrozyten beträgt sieben Tage, anzustreben ist jedoch ebenfalls ein Probenalter von maximal 48 Stunden [22].

### Präanalytik

#### Kühlung der Probe

Nach Ablauf von 24 h ist die Probe bei 4°C zu lagern [22].

### Lysereagenz

Vor der Leukozyten-Analyse müssen die Erythrozyten lysiert werden. Alle kommerziellen Reagenzien sind hierfür einsetzbar. Jedoch ist zu erwähnen, dass es keinen umfassenden Vergleich zwischen den kommerziell erhältlichen Reagenzien gibt. Als Alternative wird Ammoniumchlorid empfohlen. Bei der Verwendung von Ammoniumchlorid ist jedoch nach unserer Erfahrung zu beachten, dass es zu einem selektiven Verlust an Granulozyten (insbesondere bei alternden Granulozyten) und damit zu Messfehlern führt. Ammoniumchlorid ist zudem nicht für längere Zeit stabil [34].

### Durchflusszytometrie

Wir empfehlen eine Zweistufendiagnostik bei der PNH: In der Screeningphase wird bei Verdacht auf eine PNH die Messung von Erythrozyten bzw. Retikulozyten und Neutrophilen mit einem kleinen Antikörper-Panel durchgeführt (2x2 Regel, d. h. zwei Zellreihen mit jeweils mindestens zwei Markern). Ergibt das Screening einen pathologischen Befund, wird das Markerpanel erweitert, und es werden weitere Zellreihen (Monozyten, Lymphozyten, eventuell Thrombozyten) einbezogen. Das Ziel dieser erweiterten Diagnostik ist die Befundbestätigung einer PNH und die genaue Beschreibung der betroffenen Zellreihen.

### Zellmarkierung

#### Leukozyten

Bei der Untersuchung der Leukozyten sollte neben den GPI-verankerten Proteinen immer auch ein nicht-GPI-verankerter Marker eingesetzt werden, um den jeweiligen Zelltyp zu identifizieren (z. B. CD11b für Granulozyten, CD33 für Monozyten, CD3 und CD19 für T- und B-Lymphozyten). Pro Zellreihe sind mindestens zwei GPI-verankerte Proteine zu untersuchen, und es müssen in jedem Ansatz geeignete Isotyp-Kontrollen mitgeführt werden.

Grundsätzlich müssen bei der PNH-Diagnostik die neutrophilen Granulozyten einbezogen werden, zumal signifikante Erythrozytenklone nie ohne PNH-Klone der Neutrophilen beobachtet wurden [35]. Bei Patienten mit sehr schwerer aplastischer Anämie kann es aufgrund der ausgeprägten Neutropenie und Retikulozytopenie vorkommen, dass man auf die Untersuchung der Neutrophilen und eventuell auch der Retikulozyten verzichten muss [34]. Dann sollte jedoch die Untersuchung dieser Zellreihen bei hämatopoetischer Rekonstitution nach Therapie nachgeholt werden.

### Probenvorbereitung bei Leukozytentestung

EDTA-Blut wird mit dem entsprechenden Antikörper inkubiert. Nach 15- bis 30-minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur im Dunkeln wird gewaschen und das Lysereagenz

zugesezt. Nach einer weiteren Inkubationsphase erfolgt ein mehrfaches Waschen [27, 36].

**Antikörperwahl bei Neutrophilentestung (Tabelle 2) – Screeningphase**

Für die Analyse neutrophiler Granulozyten existieren die meisten Erfahrungen mit CD16, CD24 und CD66b. Bei der Verwendung von CD16 muss darauf geachtet werden, dass CD16 auf Eosinophilen fehlt und bei Patienten mit myelodysplastischem Syndrom auch auf Granulozyten fehlen kann. Darüber hinaus existieren polymorphe CD16-Varianten, die von einigen CD16-Antikörpern nicht erkannt werden. Daher sollte CD16 nicht als alleiniger Marker verwendet werden [4]. Zur Vereinfachung der Methodik bei Erhalt einer hohen Spezifität lassen sich auch mit einem Fluorochrom markierte Antikörper gegen verschiedene GPI-verankerte Proteine (z. B. CD24 und CD66b) mit einem anderen Antikörper, markiert mit einem anderen Fluorochrom, kombinieren (z. B. CD24-FITC/CD66b-FITC und CD16-PE). Bei einem GPI-Anker-Defekt müssen alle GPI-verankerten Marker betroffen sein.

Generell müssen die gewählten Fluorochrom-Konjugate und die Antigendichte eine klare Separation positiver und negativer Zellen erlauben (sogenannte bimodale Verteilung), was insbesondere bei Fluorescein (FITC) oder Peridinium-Chlorophyll-Protein A (PerCP) nicht immer der Fall ist. Entsprechende Waschschritte vor und nach der Markierung und der Ausschluss toter Zellen steigern die Sensitivität der Detektion, vor allem im Bereich von etwa 1% GPI-defizienter Zellen.

**Antikörperwahl bei Leukozytentestung – Erweiterte Diagnostik (Tabelle 2)**

Zum Nachweis von Monozyten-Klonen empfiehlt sich CD14 und CD48. Auch CD55 kann zur Analyse der Monozyten eingesetzt werden [39]. Für die Untersuchungen der Lymphozyten können CD48 und CD52 eingesetzt werden [36]. Ein spezieller Marker für den GPI-Anker ist FLAER (fluorescently labeled aerolysin). FLAER bindet direkt an den

GPI-Anker. Es eignet sich zur Analyse von Granulozyten und Monozyten. Bei FLAER wird eine Variabilität der Chargen beobachtet. Wir empfehlen FLAER daher nur in Kombination mit Antikörpern gegen GPI-verankerte Proteine einzusetzen. Als „Stand-Alone-Reagenz“ bietet es keinen Vorteil und ist zudem nur von einem Hersteller verfügbar [34].

**Erythrozyten/Retikulozyten – Screeningphase**

Die alleinige Messung der Erythrozyten ist für die PNH-Diagnostik nicht ausreichend. Durch Hämolyse und Transfusion kann es zu Unterschätzungen des PNH-Klons und zu falsch-negativen Befunden kommen. Die Testung der Retikulozyten weist eine höhere Sensitivität auf, da diese weniger von akuter Hämolyse oder Transfusionen beeinflusst werden und daher der Anteil GPI-defizienter Retikulozyten in den meisten Fällen größer ist als der Anteil GPI-defizienter Erythrozyten [36]. Außerdem korrelieren die GPI-defizienten Retikulozyten besser mit den GPI-defizienten Neutrophilen [36]. Die Abgrenzung von Erythrozyten und Retikulozyten erfolgt mit Hilfe von RNA-Farbstoffen, welche für die Durchflusszytometrie geeignet sind, oder mit einem Antikörper gegen den Transferrinrezeptor (CD71).

**Probenvorbereitung bei Erythrozytentestung**

Eine verdünnte, zweimal mit Puffer gewaschene Vollblutprobe wird mit dem gewählten Antikörper für 15 bis 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Auf die Inkubationsphase folgt eine Auswaschphase. Für die Analyse von Retikulozyten wird die Probe mit Thiazol Orange oder Reticount™-Lösung (Becton Dickinson) inkubiert. Die so vorbehandelten Proben sollten dann innerhalb von zwei Stunden analysiert werden [27].

**Antikörperwahl bei Erythrozytentestung – Screeningphase (Tabelle 2)**

Um die Diagnose PNH zu sichern, ist der Nachweis der Defizienz der GPI-verankerten Proteine mit mindestens zwei

**Tabelle 2** Antikörperauswahl und Analysestrategie in der durchflusszytometrischen PNH-Diagnostik.

Zielzellen	Reagenzien [29, 32]	Gating Strategien (Kombination zelllinien-spezifischer Marker und/oder Streulicht) [23, 37]
Granulozyten	CD16 <sup>a</sup> , CD24, CD55, CD66b, FLAER <sup>b</sup>	CD15 und Seitwärtsstreulicht, CD45 und Seitwärtsstreulicht, CD11b und Seitwärtsstreulicht
Monozyten	CD14, CD48, CD55, FLAER	CD33 und Seitwärtsstreulicht, CD45 und Seitwärtsstreulicht [27, 38] evtl. zusätzlich CD64, falls Monozyten schwer zu trennen sind
Erythrozyten / Retikulozyten <sup>c</sup>	CD58, CD59, (CD55)	Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht, Glycophorin A (CD235a)

<sup>a</sup>Anti-CD16 nicht als alleinigen Marker anwenden: Es existieren polymorphe CD16-Varianten und CD16 fehlt auf Eosinophilen bzw. auf unreifen Vorläuferzellen (Linksverschiebung!). CD14 und CD16 sind Cluster von monoklonalen Antikörpern gegen reifungsabhängige Differenzierungsantigene. Bei Monozyten und Granulozyten können unreife Vorläuferzellen im Blut auftreten. <sup>b</sup>FLAER (fluorescently labeled aerolysin) bindet spezifisch an den GPI-Anker und verbessert dadurch die Detektion kleiner Mengen an PNH-Zellen [12, 23, 37]. <sup>c</sup>Durch Testung der Retikulozyten anstelle von Erythrozyten kann die Frage, ob der Patient vor Blutabnahme transfundiert wurde (und damit die Testung durch Fremderythrozyten verfälscht wird) vernachlässigt werden.

Antikörpern erforderlich. Dabei ist die Verwendung von CD59-Antikörpern bei Erythrozyten allgemeiner Konsens. Die Verwendung von CD58-Antikörpern wird in den Leitlinien als problematisch betrachtet, da CD58 auf den Erythrozyten sowohl als GPI-verankertes Antigen als auch als transmembrane Form exprimiert wird. Das kann zu Interpretationsschwierigkeiten bei den Messresultaten führen [40, 41]. Nach unseren Erfahrungen besteht jedoch eine sehr gute Korrelation zwischen der mit CD58- bzw. CD59-Antikörpern bestimmten Expression des GPI-Ankers [36]. Es gibt kongenitale CD55-Defizienzen und CD55 ist generell weniger stark als CD59 auf roten Blutzellen exprimiert, wodurch die Abgrenzung von Erythrozyten mit reduzierter Expression von Zellen mit normaler Expression schwieriger wird. Daher ist CD55 als alleiniger Antikörper nicht empfehlenswert. Wir empfehlen daher primär die Verwendung von CD59 und CD58 als zweite bzw. CD55 als dritte Wahl, so dass sich daraus unsere Empfehlung ergibt, in der *Screeningphase* CD58 und CD59 zu verwenden [27, 36].

#### **Antikörperwahl bei Erythrozytentestung – Erweiterte Diagnostik (Tabelle 2)**

Zur Befundbestätigung in der *Spezialdiagnostikphase* kann das Antikörper-Panel mit CD55 erweitert werden. Wurden Erythrozyten und Retikulozyten initial nicht untersucht, empfiehlt es sich, bei der erweiterten Diagnostik beide zu untersuchen [27, 36].

#### **Analysephase**

##### **Leukozyten: Zellakquise und Gating (Tabelle 2)**

Zur Differenzierung von Granulozyten und Monozyten wird das Seitwärtsstreulicht in Kombination mit entsprechenden zelllinienspezifischen Markern gemessen.

Für Untersuchungen mit der Zielsetzung eine GPI-defiziente Population von 1% noch nachzuweisen, ist die Datenakquise von 15.000 Zellen ausreichend [22, 34].

##### **Erythrozyten: Zellakquise und Gating (Tabelle 2)**

Erythrozyten können anhand ihrer spezifischen Lichtstreuungseigenschaften identifiziert werden. Durch die Auswertung des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichts (angezeigt im logarithmischen Modus) können Zelldebris und signifikante Zellaggregationen von Erythrozyten abgegrenzt werden. Noch eindeutiger können Erythrozyten und deren Vorläuferstadien durch Zugabe von Antikörpern gegen Glykophorin A(CD235a) identifiziert werden, welches als erythrozytenspezifisches Transmembranprotein eine sichere Abgrenzung gegenüber Leukozyten erlaubt.

Üblicherweise ist die Akquise von ca. 15.000 Erythrozyten bzw. Retikulozyten für eine Untersuchung mit einer Nachweisgrenze von 1% bei PNH-Diagnostik ausreichend [22, 34].

Da die negativen, d. h. nicht mit den Antikörpern reagierenden Ereignisse (im Idealfall Zellen) für die Diagnostik entscheidend sind, müssen Verunreinigungen aus

den Reagenzien (Waschlösungen, Antikörper, Verdünnungslösungen etc.) und Debris aus der Probe und den Geräteleitungen sehr sorgfältig entfernt werden. Die Verwendung von fluoreszenten Antikörpern gegen nicht GPI-verankerte Membranproteine zur positiven Identifikation der interessierenden Zellklasse (z. B. CD15, CD235, CD33) verringert diese Gefahr. Es ist auch aus diesem Grund für die PNH-Diagnostik essentiell, dass der Person, die den Befund beurteilt und herausgibt, die Messausdrucke vorliegen und nicht nur die Messergebnisse in Zahlen (Abbildungen 1 und 2) [34].

#### **Hochsensitivitäts-Durchflusszytometrie**

Die Hochsensitivitäts-Durchflusszytometrie ist für die Diagnostik der klassischen PNH nicht notwendig. Hilfreich kann sie bei sehr kleinen GPI-defizienten Populationen (0,01% oder kleiner) sein, z. B. bei Patienten mit aplastischer Anämie [22, 23].

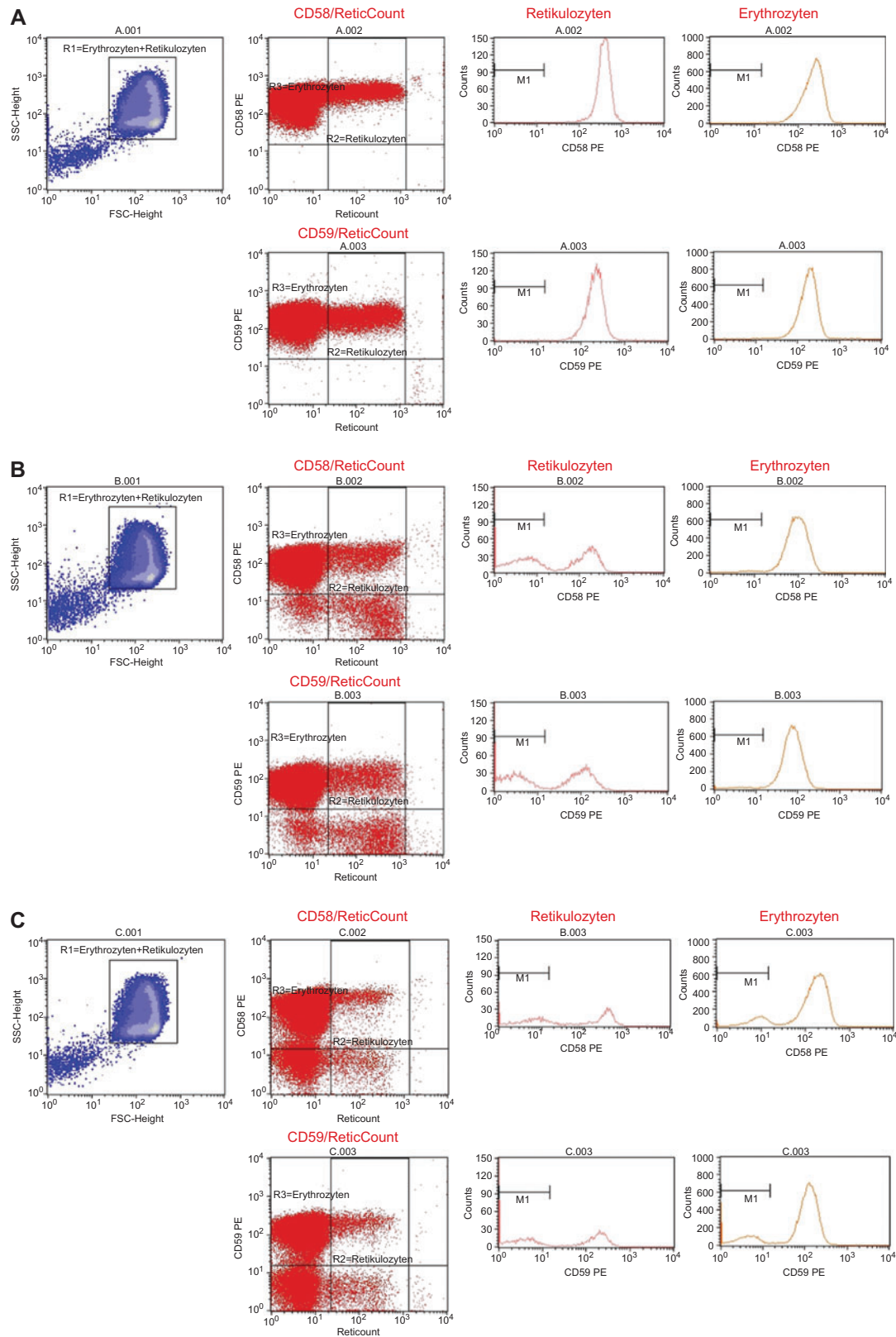
#### **Evaluation**

Zur Qualitätskontrolle sollten Proben mit Verdacht auf PNH gegen Normal-Proben getestet werden. Wünschenswert ist der gleichzeitige Einsatz einer Positivkontrolle, d. h. einer bekannten PNH-Probe. Da PNH sehr selten ist, haben die meisten Laboratorien keine oder nur sehr wenige PNH-Proben verfügbar, so dass es kaum möglich ist, jede Probe mit einer Positivkontrolle auf PNH zu testen. Kommerzielles Kontrollmaterial ist derzeit nicht erhältlich [22]. Daher ist es wichtig, dass eine möglichst große Anzahl von Laboratorien an den seit März 2011 von INSTAND e.V. angebotenen Ringversuchen teilnehmen. Zum anderen ist zu empfehlen, dass PNH-Proben, insbesondere bei zweifelhaftem Befund (z. B. Klinik und Anamnese passen nicht zur detektierten Klongröße oder große Diskrepanz zwischen den verschiedenen GPI-Markern innerhalb der Untersuchung), zur Befundbestätigung an ein auf die PNH-Analyse spezialisiertes Laboratorium versendet werden (Abbildung 3).

#### **Befundausgabe/-dokumentation**

Dem befundenden Arzt oder Naturwissenschaftler müssen zur Bewertung die Originalausdrucke der immunzytometrischen Messungen vorliegen, damit er die Qualität der Probe, der Gates, der Histogramme und die Zahl der untersuchten Zellen überprüfen kann. Bei wiederholter Untersuchung ist es vorteilhaft, wenn die Ausdrucke der Voruntersuchungen vorliegen.

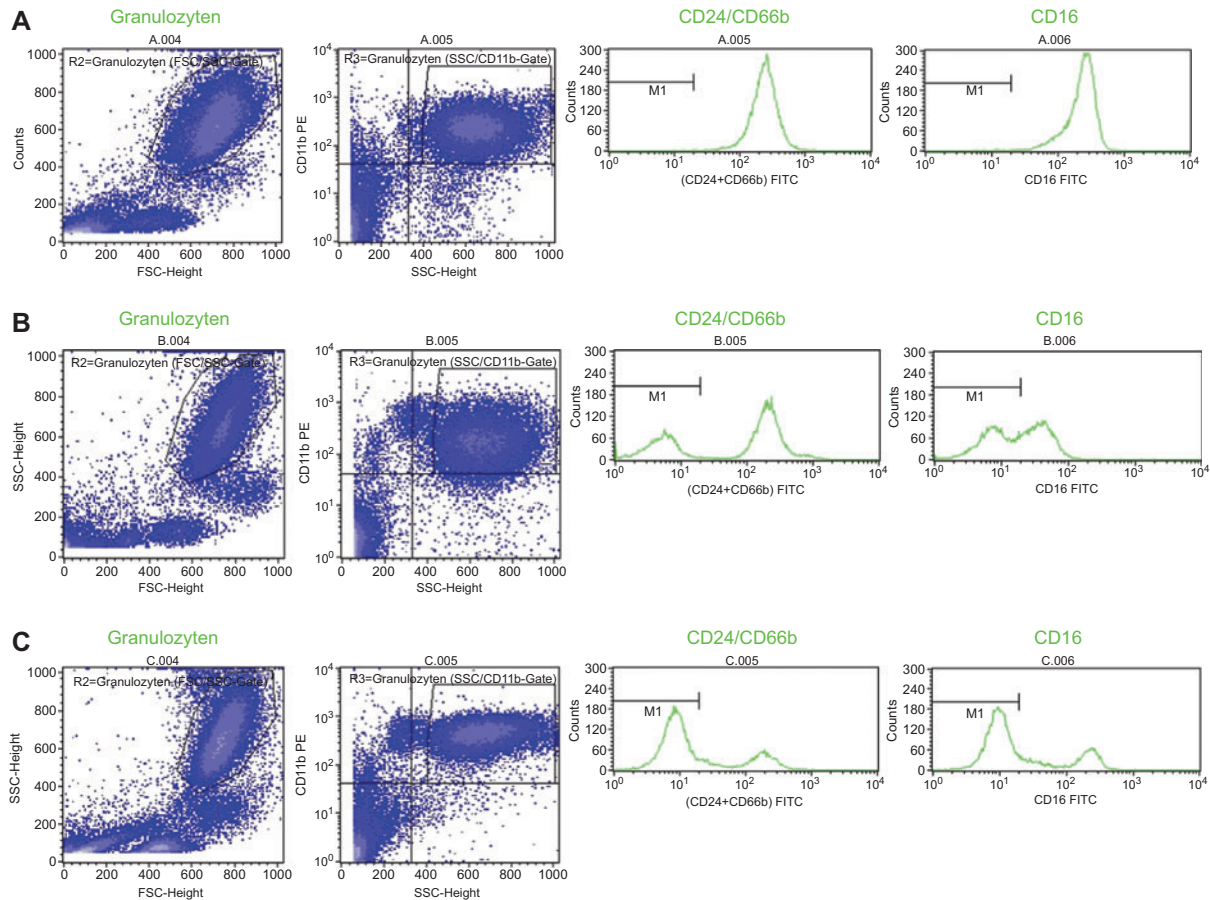
Eine wesentliche zukünftige Aufgabe ist die Vereinheitlichung der Befunddokumentation. Das dient zum einen der Vereinfachung der Diagnosestellung, vor allem ist es aber wichtig, Missverständnisse bei der Kommunikation zwischen diagnostischen Laboratorien und behandelnden Ärzten zu vermeiden - ein Aspekt, welcher bei der seltenen Erkrankung PNH sehr wichtig ist. Oft suchen die Patienten neben den lokalen Ärzten auch überregionale Expertenzentren für eine Zweit- und Drittmeinung auf. Die praktische Erfahrung zeigt, dass dabei oft Befunde kommuniziert werden, bei denen es



**Abbildung 1** Untersuchung der Expression von CD58 und CD59 auf Erythrozyten (4. Spalte) und Reticulozyten (3. Spalte), welche mit Thiazolorange diskriminiert werden (2. Spalte).

Teil A zeigt eine gesunde Kontrollperson. Teil B zeigt einen Patienten mit PNH im Kontext einer anderen hämatologischen Erkrankung. Der Anteil GPI-defizienter Reticulozyten und Erythrozyten beträgt 41% bzw. 1.2%. Teil C zeigt einen Patienten mit klassischer hämolytischer PNH. Der Anteil GPI-defizienter Reticulozyten und Erythrozyten beträgt 47% bzw. 16%.





**Abbildung 2** Untersuchung der Expression von CD24, CD66b und CD16 auf neutrophilen Granulozyten.

Teil A zeigt eine gesunde Kontrollperson. Teil B zeigt einen Patienten mit PNH im Kontext einer anderen hämatologischen Erkrankung. Der Anteil GPI-defizienter Granulozyten beträgt 15%. Teil C zeigt einen Patienten mit klassischer hämolytischer PNH. Der Anteil GPI-defizienter neutrophiler Granulozyten beträgt 66%.

nicht klar ist, ob sich die Prozentangaben auf die normalen oder GPI-defizienten Zellen beziehen und auf welcher Zellreihe eine quantitative Angabe der „Klongröße“ beruht und wie sensitiv die eingesetzte Methode war.

In diesem Sinne sollte das Messergebnis immer im Kontext mit anderen hämatologischen Befunden angegeben werden und folgende Aspekte berücksichtigen:

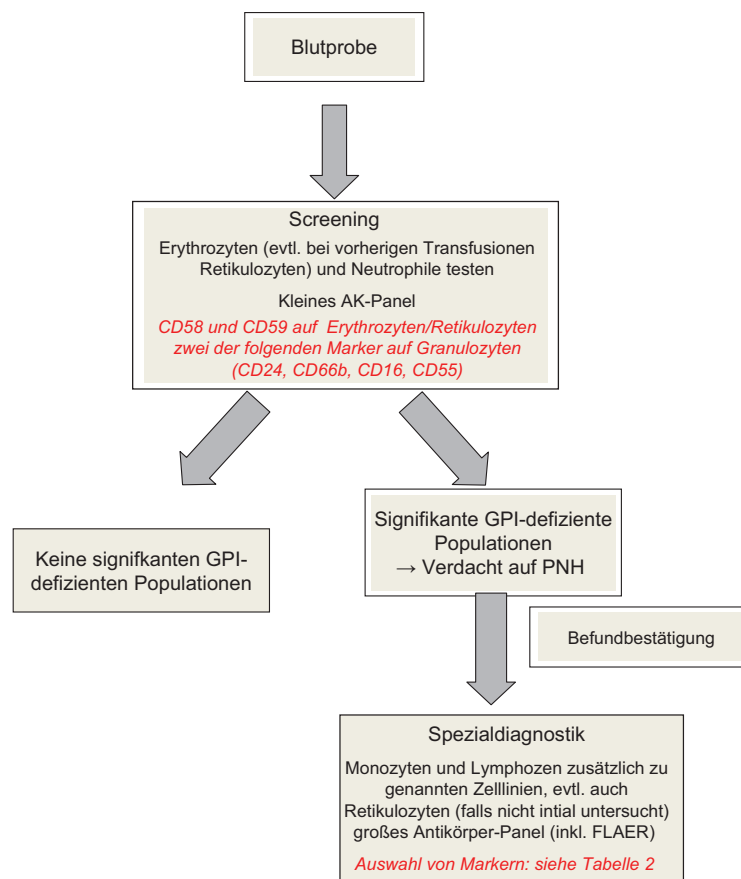
- großes Blutbild: Hb, Erythrozyten, MCV, MCH, RDW, Thrombozyten
- Retikulozyten: Anzahl prozentual und absolut; Retikulozytenproduktionsindex (RPI)
- PNH-Klongröße (Prozentsatz der defizienten Zellen, d. h. immer die pathologischen Zellen mit reduzierter/fehlender Expression angeben) mit Angabe, welche Zellreihen getestet wurden
- Verteilung der Typ II und III-Zellen mit Angabe, welche Zellreihen betroffen sind
- Information mit welchen nicht-GPI-verankerten Markern die untersuchten Zellreihen identifiziert wurden
- Sensitivitätslevel (Prozentsatz der GPI-defizienten Zellen, die sicher detektiert werden können). Da diese Angabe für

die einzelnen GPI-verankerten Proteine und die einzelnen Zellreihen unterschiedlich sind, ist diese Angabe pro Marker und Zellreihe erforderlich.

Wird bei einem Patienten eine normale Expression GPI-verankerter Proteine nachgewiesen, sollte das in möglichst einfacher und eindeutiger Sprache ausgedrückt werden: „Granulozyten, Monozyten und Erythrozyten zeigen eine normale Expression der GPI-verankerten Proteine. Es wurden keine PNH-Klone detektiert“. Zurückhaltung ist bei negativer oder positiver Terminologie geboten (z. B. „Der PNH-Test war negativ“ oder „Alle Zellen sind positiv“), da diese leicht zu Fehlinterpretationen führen kann.

### Störquellen und Problembehebung

Störquellen, die das Ergebnis verfälschen, können sowohl in der Vorbereitungsphase als auch in der eigentlichen Analysephase auftreten. Jedes Labor sollte im Rahmen der Validierung der PNH-Diagnostik seine eigene Sensitivitätsgrenze bestimmen, d. h. das Hintergrundsignal an negativen Ereignissen bezüglich der Reaktion mit den entsprechenden



**Abbildung 3** Algorithmus Stufendiagnostik bei PNH-Verdacht.

fluoreszenten Antikörpern kennen. Das kann unvorbereitet oft im Bereich von 0,5–2% liegen, je nach Verunreinigung der Antikörperpräparation, des Gerätes, der Waschlösungen oder der Hüllstromflüssigkeit, d. h. im Bereich der gewünschten Nachweisgrenze des PNH-Klons.

Häufige Fehlerquellen und Empfehlungen zur Problembehebung sind in Tabelle 3 zusammen gefasst.

### Klinische Konsequenzen des Labor-Befundes

#### Keine Bestätigung des PNH-Verdachts – weitere Schritte

Konnte der PNH-Verdacht nicht bestätigt werden, sind folgende Möglichkeiten zu überdenken: Wenn Messfehler oder Fehlinterpretationen ausgeschlossen werden können (überprüfen, gegebenenfalls Messung wiederholen), müssen die klinischen Symptome, die den PNH-Verdacht begründen, differenzialdiagnostisch weiter abgeklärt werden. Handelt es sich hingegen um die Blutprobe eines Patienten mit bekannter Grunderkrankung, die mit einem erhöhten PNH-Risiko, einhergeht (z. B. aplastische Anämie, RA-Myelodysplastisches Syndrom), sollte die Untersuchung in regelmäßigen Abständen wiederholt werden.

Unplausible Befunde, bei denen Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen der zwei Antikörper an zwei Zellreihen bestehen, sollten in einem zweiten Laboratorium mit

Erfahrung auf dem Gebiet der PNH-Diagnostik abgeklärt werden. Das Laboratorium sollte in der Lage sein, differentialdiagnostisch in Frage kommende Erkrankungen abklären zu können (Erythrozyten-Fragmentationssyndrome, Sphärozytose u. a.). Dazu ist die mikroskopische Beurteilung des Blutausrichs eine Mindestvoraussetzung.

#### Nachweis einer PNH – weitere Schritte

Konnte eine PNH zweifelsfrei nachgewiesen werden, d. h. der Befund wurde in Diagnostikstufe 2 (erweiterte Diagnostik) bestätigt, muss ohne Verzögerung ein Gesamtkonzept für die weitere Betreuung erstellt werden. Dieses umfasst neben unspezifischen Maßnahmen wie Bluttransfusionen, der Gabe von Kortikosteroiden, Antikoagulanzen, Folsäure und Eisen auch die Entscheidung, ob eine Indikation für eine spezifische Therapie besteht. Dies ist zum einen die seit 2007 zur Therapie der PNH zugelassene zielgerichtete Therapie mit dem Komplementinhibitor Eculizumab. Zum anderen muss die Indikation für eine allogene Stammzelltransplantation geprüft werden, der einzigen kurativen Behandlungsmöglichkeit, bei der jedoch die hohe assoziierte Morbidität und Mortalität zu berücksichtigen ist. In Abhängigkeit vom gewählten Prozedere ist auch der Umfang und die Frequenz von Verlaufsuntersuchungen festzulegen. Schließlich sind noch die Auswirkungen der Diagnose und einer eventuellen

**Tabelle 3** Fehlermöglichkeiten und Empfehlungen zur Problemkorrektur bei der durchflusszytometrischen PNH-Diagnostik.

Ursache	Auswirkung	Problembehebung
Knochenmarkaspirat als Material	Für die PNH-Diagnostik nicht aussagekräftige Anteile der Zellen, verschiedene Differenzierungsstadien	Einsender informieren; neue Probe anfordern (peripheres Blut)
Probe zu alt, Probe unter Einfluss extremer Klimabedingungen (Hitze, Kälte)	Hämolyse, Apoptose, Veränderung der Oberflächenproteine	Vitalitätsbestimmung Bei „Verdacht“ Entnahmzeitpunkt erfragen, ggfs. neue Probe anfordern
Transfusionen vor Blutentnahme	Hoher Anteil an Spendererythrozyten, keine aussagefähige Analyse über Patientenerythozyten möglich	Analyse der Retikulozyten anstelle der Erythrozyten
Verwendung von Heparin als Antikoagulanzen	Risiko problematische Thrombozytenaggregation: – Überlagerung der Granulozyten bei Messung – „Kleben“ auf Monozyten oder Granulozyten	EDTA als Antikoagulanzen verwenden
Verwendung von Ammoniumchlorid als Lysereagenz	Kann zu Verlust an Granulozyten (insbesondere ältere Zellen) führen	Kommerzielle Reagenzien (FACSLysing Solution) verwenden
Hauptfehlerquelle: Kontamination des Analyseegates mit unerwünschten Zellen, z. B.:		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zelllinienspezifische Marker verwenden (siehe Tabelle 2)</li> <li>• Anti-CD16 nicht als alleinigen Marker verwenden</li> <li>• Analyse von CD16, CD24, CD55 oder CD59 mit FLAER überprüfen</li> </ul>
• Eosinophile oder Progenitorzellen im Neutrophilen-Gate	Exprimieren kein CD16 oder CD24 → kann zu Fehlinterpretation als GPI-defiziente Neutrophile führen	Verwendung von Anti-Glycophorin A (CD235a)
• Leukozyten im Erythrozyten-Gate	Fehlinterpretation als GPI-defiziente Erythrozyten	

Therapie auf die Lebensumstände des Patienten zu berücksichtigen. Da es sich bei der PNH um eine seltene Erkrankung handelt und komplexe Aspekte zu beachten sind, empfiehlt sich zur Diagnosebestätigung und Erstellung eines Behandlungskonzepts die Vorstellung in einem Expertenzentrum. Empfehlungen zum therapeutischen Vorgehen bei PNH finden sich unter [www.onkopedia.de](http://www.onkopedia.de) [42].

Das PNH-Register ist eine internationale, multizentrische nicht-interventionelle Beobachtungsstudie zur PNH – unabhängig von der Behandlung. Ziel des Registers ist es, für diese seltene Erkrankung mehr über den langfristigen Verlauf, prognostische Faktoren und Auswirkungen der verschiedenen therapeutischen Interventionen zu erfahren. Patienten sollten über dieses Register informiert und eine Teilnahme angeboten werden. Detaillierte Informationen sind über den nationalen Koordinator in Deutschland (H. Schrezenmeier) und in Österreich (P. Bettelheim) zu erhalten.

## Diskussion

Die Durchflusszytometrie ist heute eine allgemein etablierte diagnostische Methode. Insbesondere in der PNH-Diagnostik und Verlaufskontrolle ist sie der anerkannte Goldstandard. Dennoch existieren bisher keine standardisierten Empfehlungen, wie das Proben-Handling in der Vorbereitungs- und Analysephase erfolgen soll und wie eine sinnvolle Unterteilung der Diagnostik in eine Screeningphase und eine erweiterte Diagnostik zur Befundbestätigung gestaltet werden kann. Die mittlerweile publizierten internationalen Leitlinien stellen diese Fragen ebenfalls weiterhin zur

Diskussion. Daher hat sich das Expertenpanel zur Aufgabe gemacht, mit der vorliegenden Arbeit auf der Grundlage der neuen Leitlinien die Lücke zu schließen und einen deutsch-österreichischen Konsens zu verfassen.

Wichtig war dabei, Empfehlungen zu geben, die eine korrekte und vor allem zeitige Diagnose ermöglichen, die für PNH-Patienten therapie- und prognoserelevant ist. Dabei sollte die Labor-Realität nicht aus den Augen verloren werden, so dass im Sinne der Praktikabilität und Wirtschaftlichkeit die beschriebene Zweistufendiagnostik vorgeschlagen wird. Die Stufe 2 der Diagnostik, bei der es um eine Befundbestätigung geht, kann von wenigen Speziallaboratorien übernommen werden. Die Stufe 1 ist als Screeningstufe zu sehen, die von allen Laboren als Routine geleistet werden sollte. Wesentliche Voraussetzung – auch für Laboratorien, die PNH-Diagnostik auf der Screeningstufe betreiben – ist die regelmäßige Teilnahme an Ringversuchen. Im Sinne der Qualitätssicherung wurde daher im März 2011 von INSTAND e.V. (Gesellschaft zur Förderung der Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien e.V.) erstmals ein Ringversuch zur PNH-Diagnostik durchgeführt. Es haben sich mehr als 40 Laboratorien aus Deutschland, Österreich und weiteren Ländern beteiligt. Der Ringversuch soll weiterhin regelmäßig zweimal im Jahr angeboten werden.

## Literatur

1. Les Cahiers d'Orphanet; November 2008;1:2–26.
2. Hill A, Ridley SH, Esser D, Oldroyd RG, Cullen MJ, Kareclas P, et al. Protection of erythrocytes from human complement-mediated

- lysis by membrane-targeted recombinant soluble CD59: a new approach to PNH therapy. *Blood* 2006;107:2131–7.
3. Socie G, Mary JY, de GA, Rio B, Leporrier M, Rose C, et al. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: long-term follow-up and prognostic factors. *French Society of Haematology. Lancet* 1996;348:573–7.
  4. Hillmen P, Lewis SM, Bessler M, Luzzatto L, Dacie JV. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 1995;333:1253–8.
  5. de Latour PR, Mary JY, Salanoubat C, Terriou L, Etienne G, Mohty M, et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: natural history of disease subcategories. *Blood* 2008;112:3099–106.
  6. Brodsky RA, Young NS, Antonioli E, Risitano AM, Schrezenmeier H, Schubert J, et al. Multicenter phase 3 study of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2008;111:1840–7.
  7. Johnson RJ, Hillmen P. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: nature's gene therapy? *Mol Pathol*. 2002;55:145–52.
  8. Luzzatto L, Gianfaldoni G. Recent advances in biological and clinical aspects of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Int J Hematol* 2006;84:104–12.
  9. Araten DJ, Nafa K, Pakdeesuwan K, Luzzatto L. Clonal populations of hematopoietic cells with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria genotype and phenotype are present in normal individuals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:5209–14.
  10. Bessler M, Mason PJ, Hillmen P, Luzzatto L. Mutations in the PIG-A gene causing partial deficiency of GPI-linked surface proteins (PNH II) in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 1994;87:863–6.
  11. Rother RP, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *J Am Med Assoc* 2005;293:1653–62.
  12. Parker C, Omine M, Richards S, Nishimura J, Bessler M, Ware R, et al. For International PNH Interest Group. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2005;106:3699–709.
  13. Hall SE, Rosse WF. The use of monoclonal antibodies and flow cytometry in the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1996;87:5332–40.
  14. Galili N. Prevalence of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) cells in patients with myelodysplastic syndromes (MDS), aplastic anemia (AA) or other bone marrow failure syndromes (BMF): interim results from the EXPLORE trial. *J Clin Oncol*. 2009; 27(suppl.):7082.
  15. Saso R, Marsh J, Cevreska L, Szer J, Gale RP, Rowlings PA, et al. Bone marrow transplants for paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Brit J Haem* 1999;104:392–6.
  16. Hillmen P, Young NS, Schubert J, Brodsky RA, Socie G, Muus P, et al. The complement inhibitor eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 2006;355:1233–43.
  17. Hillmen P, Muus P, Dührsen U, Risitano AM, Schubert J, Luzzatto L, et al. Effect of the complement inhibitor eculizumab on thromboembolism in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2007;110:4123–8.
  18. Rother RP, Rollins SA, Mojciak CF, Brodsky RA, Bell L. Discovery and development of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Nat Biotechnol* 2007;25:1256–64.
  19. Röth A, Dührsen U, Schrezenmeier H, Schubert J. Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie (PNH)-Pathogenese, Diagnostik und Therapie. *Dtsch med Wochenschr* 2009;134:404–9.
  20. Schrezenmeier H, Höchsmann B. Eculizumab opens a new era of treatment for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Expert Rev Hematol* 2009;2:7–16.
  21. Späth-Schwalbe E, Schrezenmeier H, Heimpel H. Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie: Klinische Erfahrungen bei 40 Patienten in einem Zentrum über 25 Jahre. *Dtsch med Wochenschr* 1995;120:1027–33.
  22. Borowitz M, Craig F, DiGuseppe J, Illingworth A, Rosse W, Sutherland D, et al. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. *Cytometry Part B Clin Cytom* 2010;78B:211–30.
  23. Richards SJ, Barnett D. The role of flow cytometry in the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in the clinical laboratory. *Clin Lab Med* 2007;27:577–90.
  24. Röth A, Hock C, Konik A, Christoph S, Dührsen U. Chronic treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria patients with eculizumab: safety, efficacy, and unexpected laboratory phenomena. *Int J Hematol* 2011;93:704–14.
  25. Brodsky RA, Hu R. PIG-A mutations in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and in normal hematopoiesis. *Leuk Lymphoma* 2006;47:1215–21.
  26. Maciejewski JP, Rivera C, Kook H, Dunn D, Young NS. Relationship between bone marrow failure syndromes and the presence of glycosylphosphatidylinositol-anchored protein-deficient clones. *Br J Haematol* 2001;115:1015–22.
  27. Nebe T, Schubert J, Gutensohn K, Schrezenmeier H. Flow cytometric analysis of GPI-deficient cells for the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *J Lab Med* 2003;27:257–65.
  28. Meyers G, Weitz I, Lamy T, Cahn JY, Kroon HA, Severino B, et al. Disease-related symptoms reported across a broad population of patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Blood* 2007;110:Abstract 3683.
  29. Hillmen P, Elebute MO, Kelly R, Urbano-Ispizua A, Rother RP, Fu CL, et al. High incidence of progression to chronic renal insufficiency in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Blood* 2007;110:Abstract and Poster 3678.
  30. Dacie JV, Lewis SM. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: clinical manifestations, haematology, and nature of the disease. *Ser Haematol* 1972;5:3–23.
  31. Röth A, Peine S, Dührsen U. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria turning Coombs-positive. *Int J Hematol* 2010;91:159–60.
  32. Höchsmann B, Leichtle R, Zubern I von, Kaiser S, Flegel WA, Schrezenmeier H. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and targeted therapy with the C5 antibody Eculizumab – Lessons for transfusion medicine. *Vox Sang* 2011 Sep 19; [epub ahead of print].
  33. Risitano AM, Notaro R, Marando L, Serio B, Ranaldi D, Seneca E, et al. Complement fraction 3 binding on erythrocytes as additional mechanism of disease in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria patients treated by eculizumab. *Blood* 2009;113:4094–100.
  34. Bettelheim P, Nebe C, Panse J, Röth A, Schubert J, Schrezenmeier H. Konsensusmeeting Diagnostik der PNH 24.11.2010 München.
  35. Sutherland DR, Kueck N, Azcona-Olivera J, Anderson T, Acton E, Barth D, et al. Use of FLAER-based WBC assay in the primary screening of PNH clones. *Am J Clin Pathol* 2009;132:564–72.
  36. Höchsmann B, Rojewski M, Schrezenmeier H. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH): higher sensitivity and validity in diagnosis and serial monitoring by flow cytometric analysis of reticulocytes. *Ann Hematol* 2011;90:887–99.
  37. Richards SJ, Whitby I, Cullen MJ, Dickinson AJ, Granger V, Reilly JT, et al. Development and evaluation of a stabilized whole-blood preparation as a process control material for screening of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* 2008;76:47–55.



38. Sutherland DR, Kuek N, Davidson J, Barth D, Chang H, Yeo E, et al. Diagnosing PNH with FLAER and multiparameter flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* 2007;72:167–77.
39. Olteanu H, Karandikar NJ, McKenna RW, Xu Y. Differential usefulness of various markers in the flowcytometric detection of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in blood and bone marrow. *Am J Clin Pathol* 2006;126:781–8.
40. Ariel O, Kukultansky T, Raz N, Hollander N. Distinct membrane localization and kinase association of the two isoforms CD58. *Cell Signal* 2004;16:667–73.
41. Navenot JM, Bernard D, Harousseau JL, Muller JY, Blanchard D. Expression of glycosyl-phosphatidylinositol-linked glycoproteins in blood cells from paroxysmal nocturnal haemoglobinuria patients: a flow cytometry study using CD55, CD58 and CD59 monoclonal antibodies. *Leuk Lymphoma* 1996;21:143–51.
42. Schubert J, Brümmendorf T, Schrezenmeier H, Röth A. Leitlinie Paroxysmale Nächtliche Hämoglobinurie 2011. <http://www.dgho-onkopedia.de/onkopedia/leitlinien/paroxysmale-naechtliche-haemoglobinurie-pnh>. Accessed June 13, 2011.