



ΠΑΡΟΞΥΣΜΙΚΗ ΝΥΚΤΕΡΙΝΗ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΟΥΡΙΑ (ΡΝΗ)

Αχιλλέας Θ. Καραμούτσιος
*Μονάδα Μοριακής Βιολογίας, Αιματολογικό
Εργαστήριο ΠΓΝ Ιωαννίνων*

Ιωάννινα, Σεπτέμβριος 2013

PNH

- Σπάνια διαταραχή του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου που έχει υποστεί μια σωματική μετάλλαξη στο PIG-A γονίδιο με κλινικά χαρακτηριστικά που ποικίλουν από ασθενή σε ασθενή κατά την πορεία της νόσου

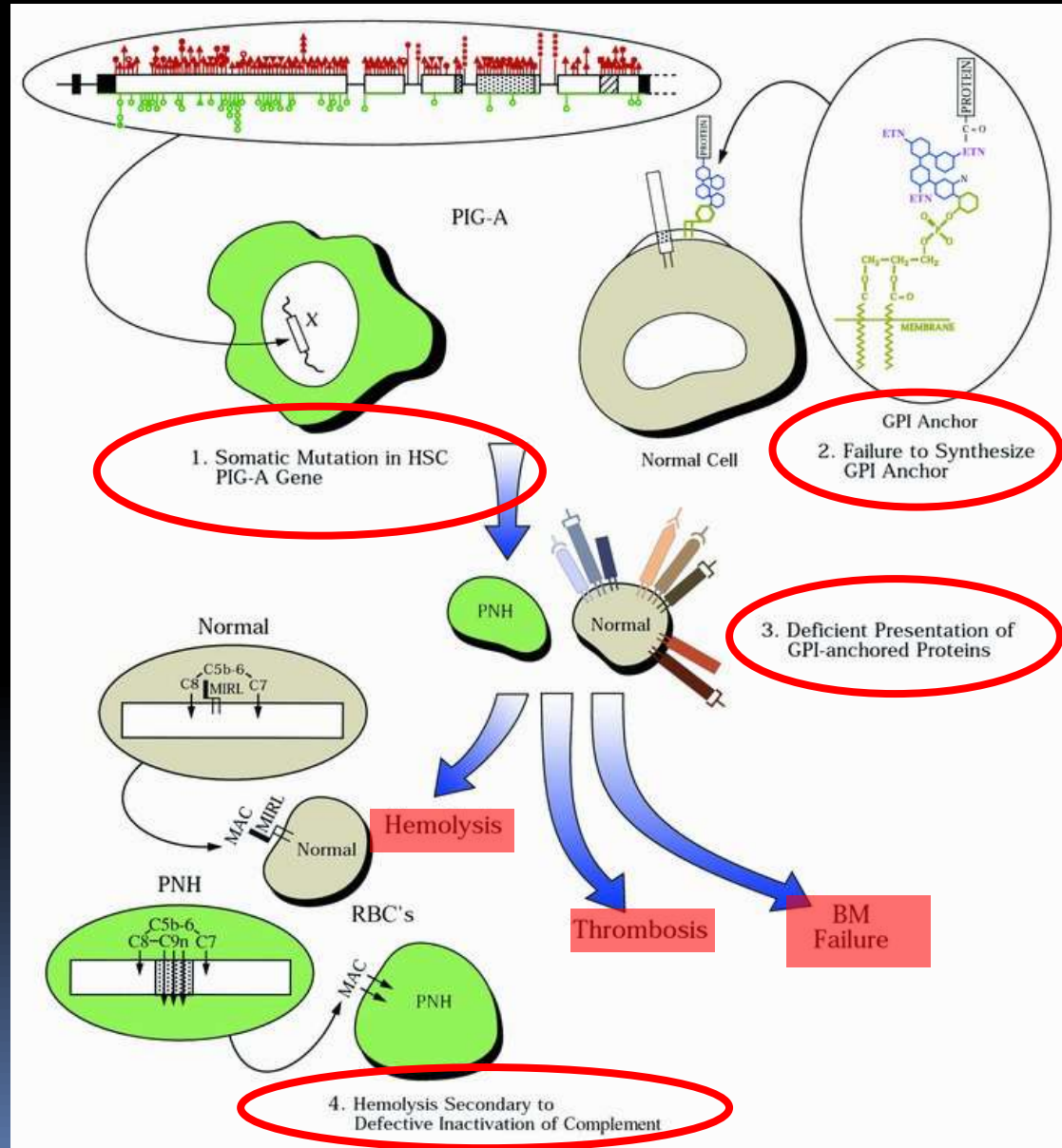
Παθογένεια

Σωματική μετάλλαξη του PIGA γονιδίου

Διαταραχή σύνθεσης GPI-anchor

Ανεπάρκεια όλων των πρωτεϊνών που φυσιολογικά συνδέονται στην κυτταρική μεμβράνη μέσω της GPI-anchor

Εκδήλωση κλινικών χαρακτηριστικών



Διάγνωση με ΚΡ

Μέθοδος αναφοράς για τη διάγνωση ΡΝΗ

- Ποσοτική πληροφορία
- Η πολυχρωματική ανάλυση παρέχει υψηλή ευαισθησία της τάξης του 0,05%
- Μελέτη πολλών κυτταρικών σειρών
- Μελέτη πληθώρας αντιγόνων

Διάγνωση με ΚΡ

- Βασίζεται στην απουσία τουλάχιστον δύο GPI-linked πρωτεϊνών στα ερυθρά και στα ουδετερόφιλα, ενώ η μελέτη των μονοκυττάρων μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως επιπλέον επαληθευτικό δεδομένο
- Η μελέτη των λευκοκυττάρων είναι επιβεβλημένη καθώς πρόσφατο επεισόδιο αιμόλυσης ή μετάγγιση καθιστά λανθασμένη εκτίμηση του παθολογικού κλώνου μόνο στα RBCs

Γιατί πρέπει να γίνεται η διάγνωση

- Ύπαρξη εγκεκριμένης θεραπείας για τους ασθενείς με αιμολυτικό PNH (Eculizumab, Alexion, Cheshire, CT)
- Ανακάλυψη και παρακολούθηση έστω και μικρών κλώνων που συνοδεύουν την απλαστική αναιμία και τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα
- MRD απλαστικής αναιμίας μετά από μεταμόσχευση

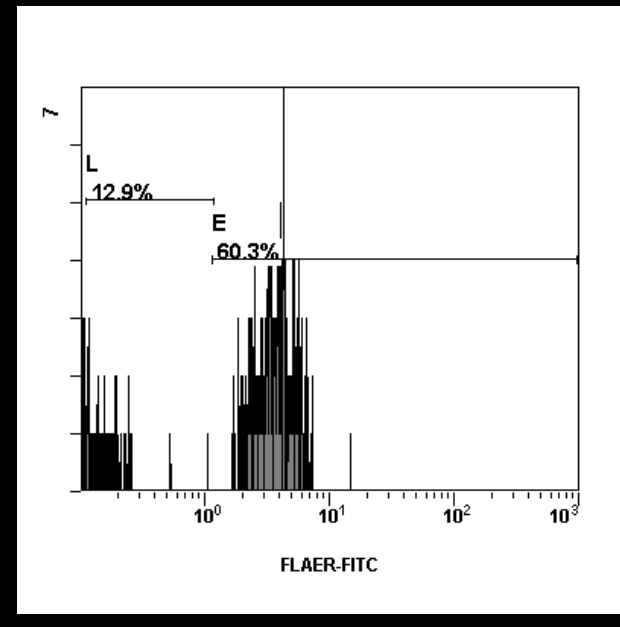
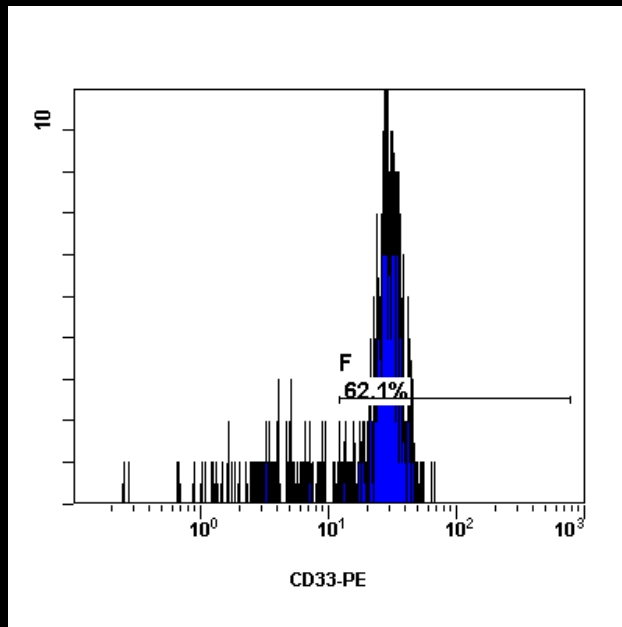
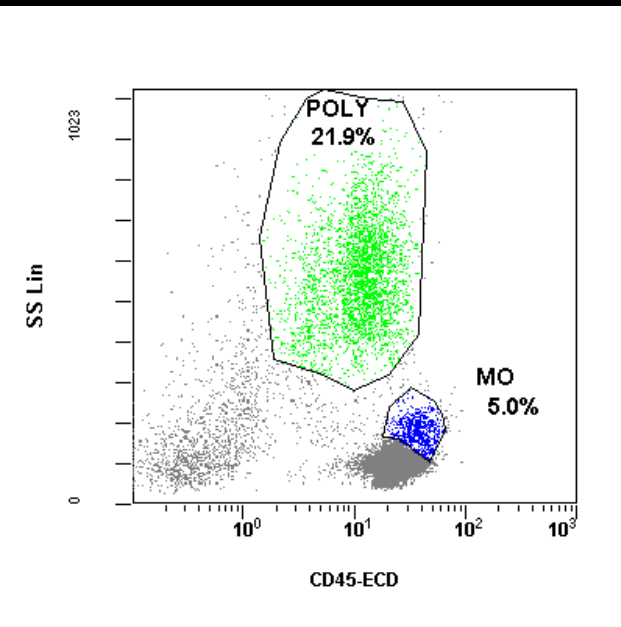
Γενικός χειρισμός του δείγματος

Δείγμα	Περιφερικό αίμα
Αντιπηκτικό	EDTA, heparin, ECD
Όγκος	1 – 3 mL
Μέγιστος χρόνος ανάλυσης από τη δειγματοληψία	~7 μέρες για τα RBC ~48h για τα WBC
Αποθήκευση δείγματος	4°C μετά τις 24h
Διαλύματα λύσης	Κανένας περιορισμός
Ευαισθησία στην ανάλυση ρουτίνας	1%, συλλογή τουλάχιστον 5,000 events του προς μελέτη πληθυσμού
Ανάλυσης υψηλής ευαισθησίας	0,01%, συλλογή τουλάχιστον 250,000 events του προς μελέτη πληθυσμού

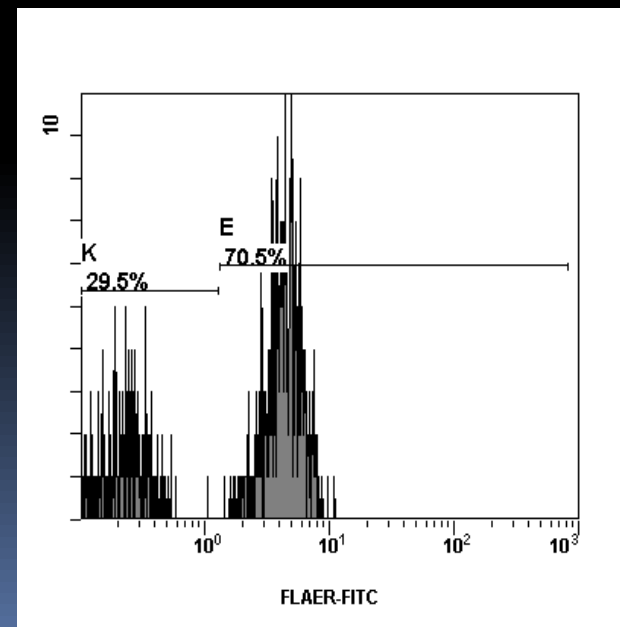
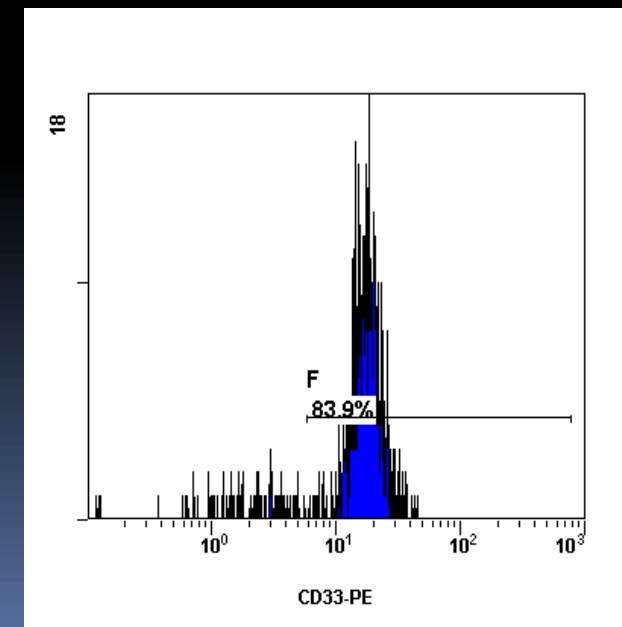
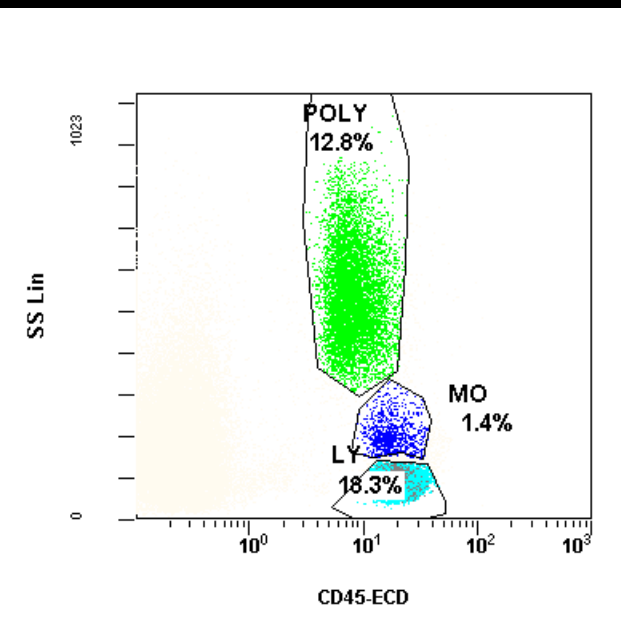
Σε τι δείγμα πρέπει να γίνεται ο προσδιορισμός PNH;

- Δείγμα επιλογής το PB
- Ωριμα λευκοκύτταρα και ερυθροκύτταρα
- Ενώ στο BM όλα τα στάδια διαφοροποίησης με ποικίλη έκφραση GPI-πρωτεϊνών
- Για ερευνητικούς σκοπούς και δείγματα BM

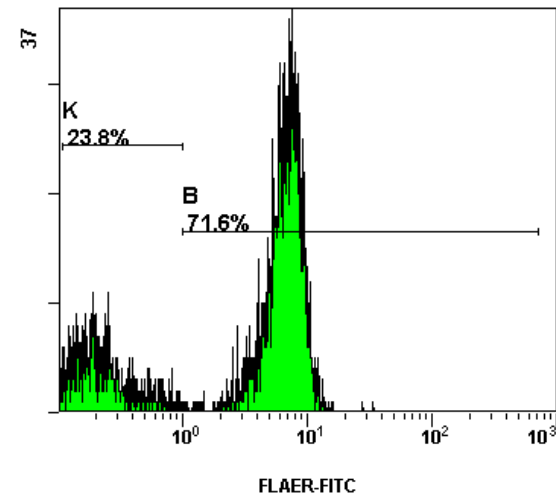
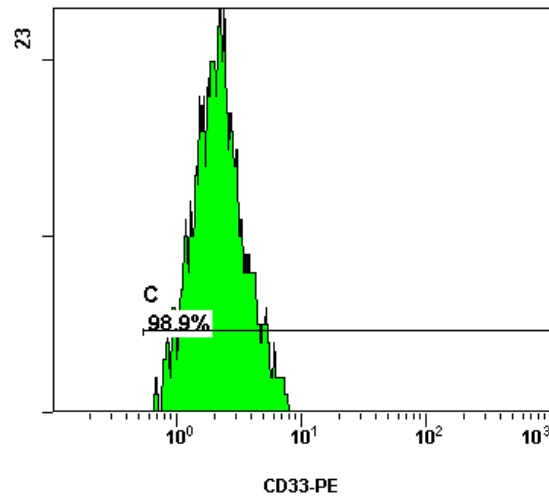
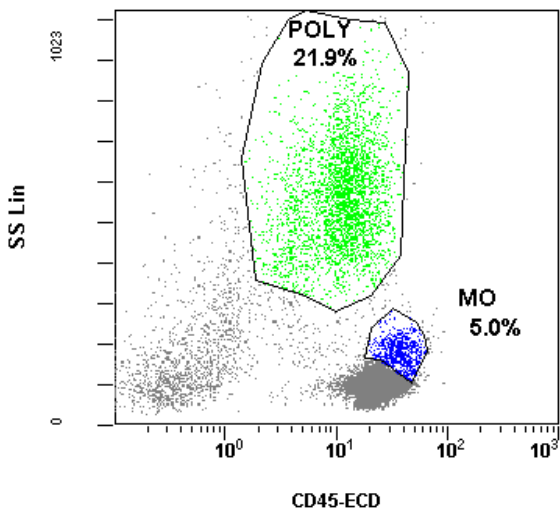
Μονοκύτταρα -BM



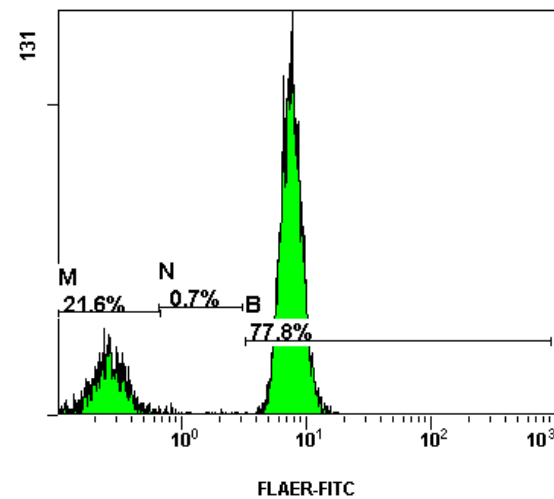
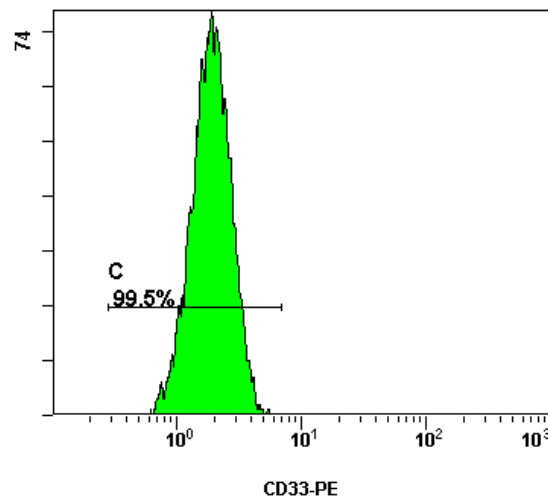
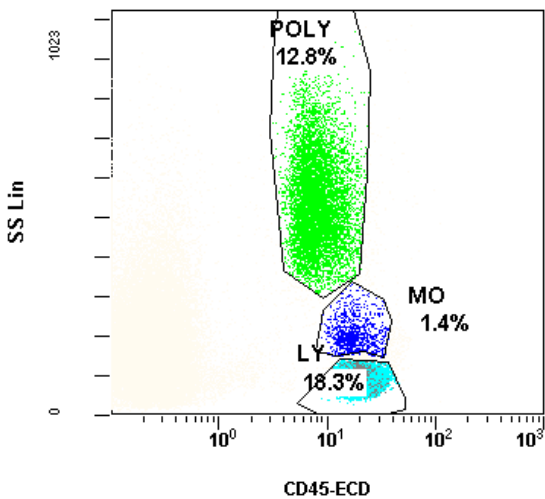
Μονοκύτταρα -PB



Κοκκιόκυτταρα - BM




Κοκκιόκυτταρα - PB





Σε ποιες κυτταρικές σειρές πρέπει να γίνεται ο προσδιορισμός PNH;

- Επίκτητη κλωνική διαταραχή του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου που φέρει τη μετάλλαξη PIG-A
 - Επηρεάζονται όλες οι κυτταρικές αιμοποιητικές σειρές.
- 

Πόσα αντιγόνα

- Κοκκιοκύτταρα CD16/24/55/59/66b/157
- Μονοκύτταρα CD14/55/157
- Β λεμφοκύτταρα CD24/48/52/55
- CD4+ Τ λεμφοκύτταρα CD48/52/55
- Ηωσινόφιλα CD55/59
- CD8+ Τ λεμφοκύτταρα CD48/55
- CD56low NK κύτταρα CD48
- BCCA-δενδριτικά CD55
- CD56high NK κύτταρα CD55
- Ερυθροκύτταρα CD59

Σε τι ποσοστό;

1. Μονοκύτταρα υψηλότερο ποσοστό αλλά μικρός υποπληθυσμός
2. Κοκκιοκύτταρα (παρόμοιο ποσοστό)
3. Ερυθροκύτταρα - αλλά δίνουν και την ευκαιρία τύπου II (ελάττωση έκφρασης), τύπου III (απουσία έκφρασης)

Χρόνος ημιζωής;


1. Κοκκιοκύτταρα (μέχρι 48h)
2. Ερυθροκύτταρα

Παραμένει ο χρυσός κανόνας της
κυτταρομετρίας

.... Το γοργόν και χάριν έχει



Κυτταρικές σειρές επιλογής

- Κοκκιοκύτταρα
 - Ερυθροκύτταρα
 - Μονοκύτταρα
- 

Ποια τα καλύτερα GPI - αντιγόνα

- **FLAER** (προ-αερολυσίνη συνδεδεμένη με Alexa-488)

+ CD24 ή CD16 κοκκιοκύτταρα

+ CD14 μονοκύτταρα

CD59 (κλώνοι MEM43 ή OV9420) – PE

για τη διάκριση τύπων II και III

ερυθροκύτταρα

Οριοθέτηση – πώς;

- ώριμα ερυθροκύτταρα
CD235α (KC16) – FITC σε μεγάλη αραιώση
- κοκκιοκύτταρα
σκεδαστικά χαρακτηριστικά CD33 CD15
- μονοκύτταρα
σκεδαστικά χαρακτηριστικά CD33 CD64

Ποιες τεχνικές;

Ερυθροκύτταρα

- cocktail μονοκλωνικών αντισωμάτων
- σε μεγάλη αραιώση
- απαλή ανάδευση
- ταχεία μέτρηση
- Racking
- 100000 ή
σε 2 θετικά 1000000



Πρωτόκολλο RBC

Μονοκλωνικά αντισώματα :

- CD235a
- CD55
- CD59

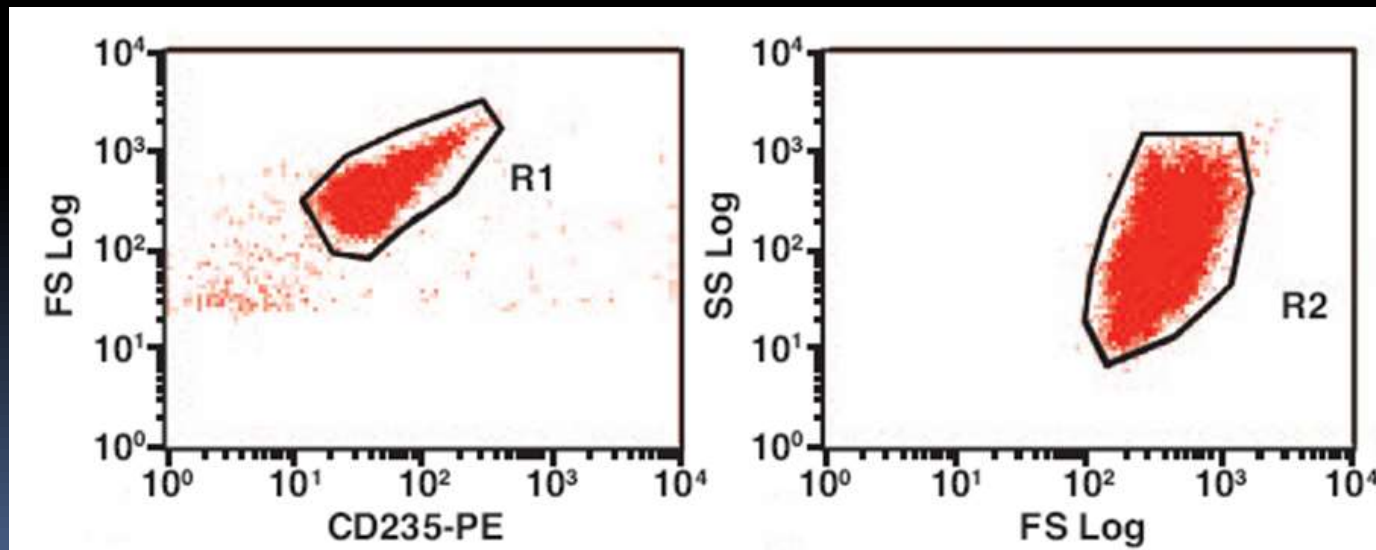
Αραίωση
μονοκλωνικών &
αναλογία MoAb /
sample σύμφωνα
με τις οδηγίες του
κατασκευαστή και
τα guidelines



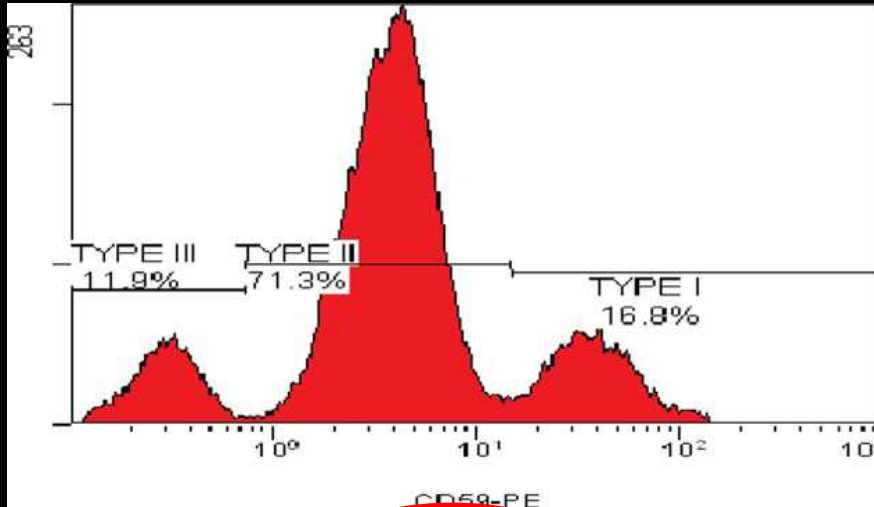
Αποφυγή
aggregation & μη
ειδικής δέσμευσης

Πρωτόκολλο RBC

Οριοθέτηση με βάση τις FS/SS ιδιότητες σε λογαριθμική κλίμακα (μονοχρωματική ανάλυση) + έκφραση του CD235a (διπλός φθορισμός)



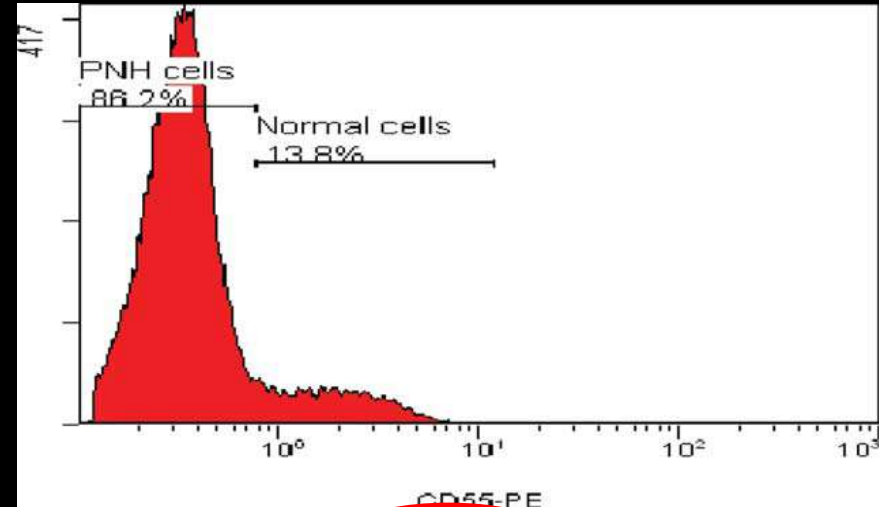
Πρωτόκολλο RBC



CD59



Διάκριση των 3 τύπων
PNH ερυθροκυττάρων
(TYPE I,II,III)



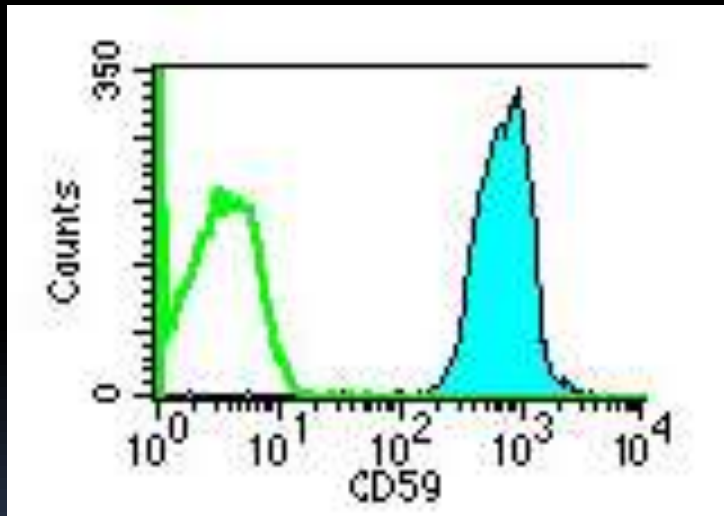
CD55



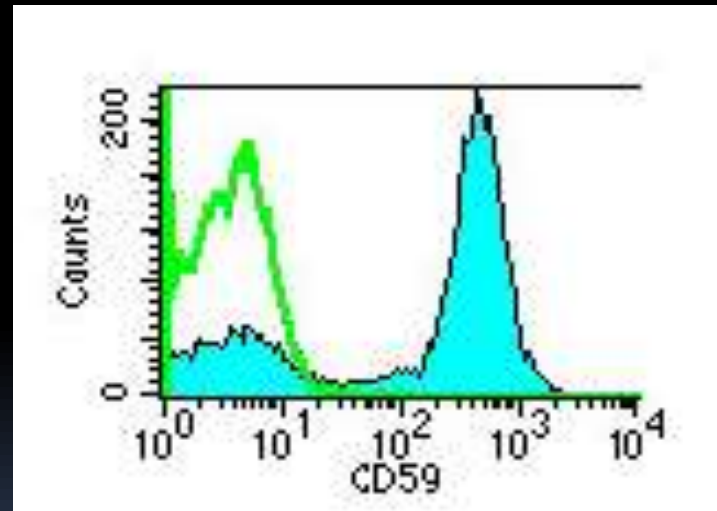
Διάκριση φυσιολογικών
& PNH ερυθροκυττάρων

Πρωτόκολλο RBC

- Χρήση ενός unstained δείγματος ως control του ασθενή



Normal Control



Patient

Πρωτόκολλο RBC

2 ΠΛΥΣΕΙΣ ΤΟΥΛΑΧΙΣΤΟΝ ΜΕΤΑ ΤΗΝ
ΕΠΩΑΣΗ ΤΩΝ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ

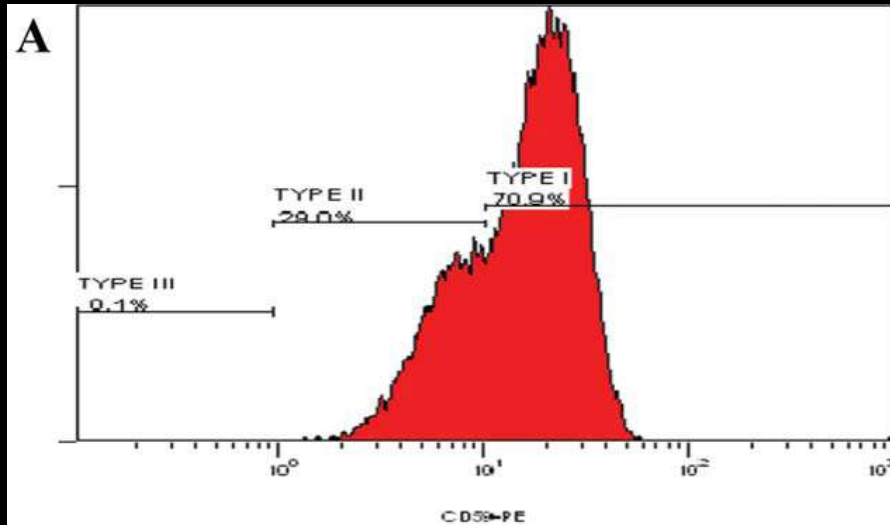


ΑΠΟΦΥΓΗ ΜΗ ΕΙΔΙΚΗΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ
ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

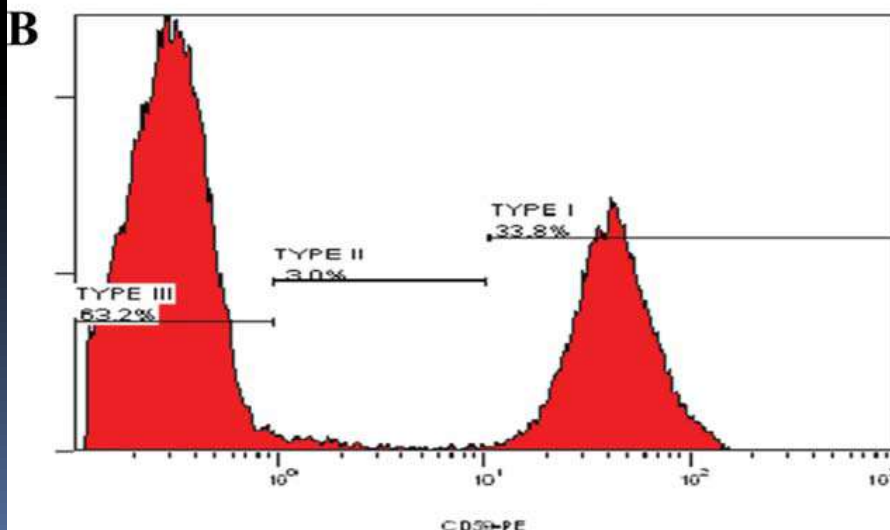


ΣΩΣΤΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΜΕΓΕΘΟΥΣ ΡΝΗ
ΚΛΩΝΟΥ

Πρωτόκολλο RBC



NO WASH!!!



AFTER 2
WASHES!!!

Ποιες τεχνικές;

κοκκιοκύτταρα και μονοκύτταρα

- Cocktail μονοκλωνικών και FLAER
- Συνήθη λυτικά
- 100000 κοκκιοκύτταρα
- 20000 μονοκύτταρα

Πρωτόκολλο WBC

- Μελέτη ουδετερόφιλων & μονοκυττάρων
- **ΌΧΙ μελέτη λεμφοκυττάρων**, λόγω του μεγάλου χρόνου ζωής τους & της μεταβαλλόμενης έκφρασης πολλών GPI-linked πρωτεϊνών

Μελέτη WBC

- Οριοθέτηση με βάση την έκφραση μη GPI-linked δεικτών

Ουδετερόφιλα: CD45, CD15 / SS

Μονοκύτταρα: CD45, CD64, CD33 / SS

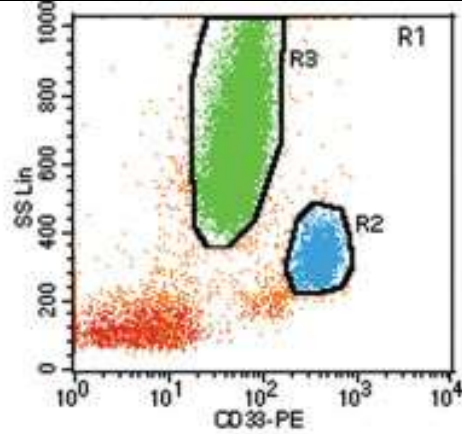
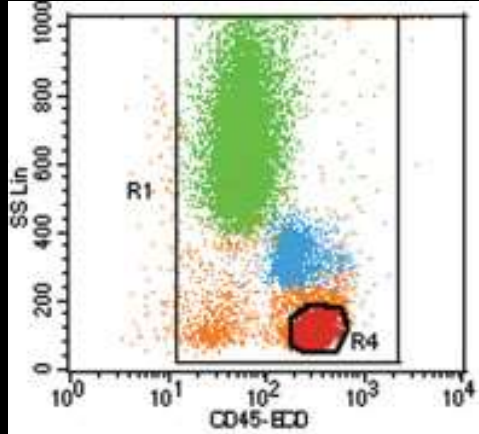
Μελέτη WBC

- GPI-linked δείκτες

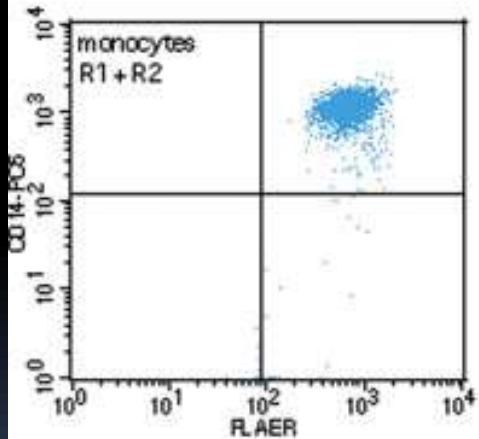
Ουδετερόφιλα: CD24, CD16, CD66b,
CD55, CD58, CD59

Μονοκύτταρα: CD14, CD55, CD58, CD59

Πρωτόκολλο WBC

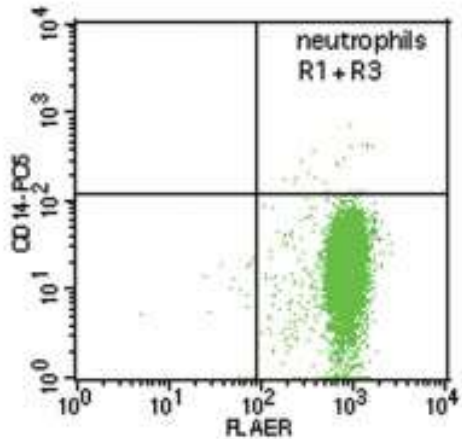


Normal PB



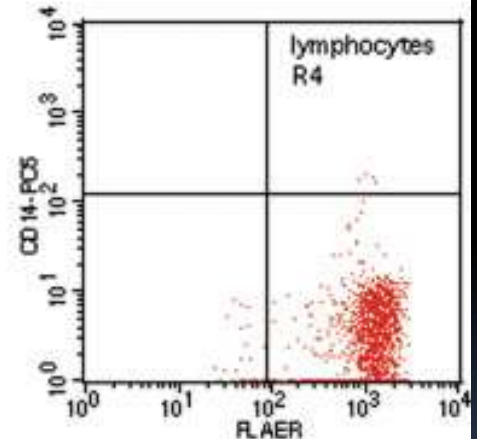
File: Normal PB
Gate: G2
Gated Events: 2059

Quad	Events	% Gated
UL	0	0.00
UR	2031	98.64
LL	7	0.34
LF	21	1.02



File: Normal PB
Gate: G3
Gated Events: 14292

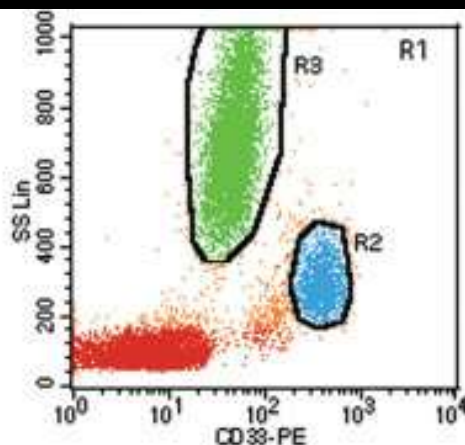
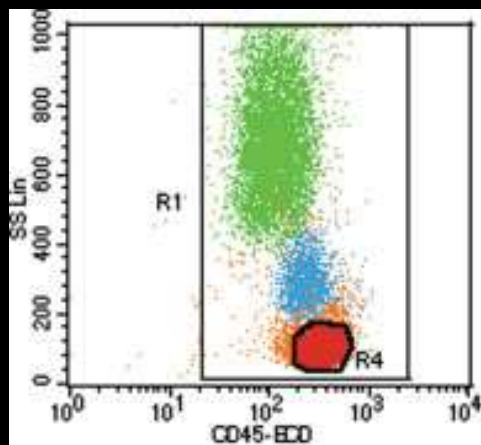
Quad	Events	% Gated
UL	0	0.00
UR	23	0.16
LL	17	0.12
LF	14252	99.72



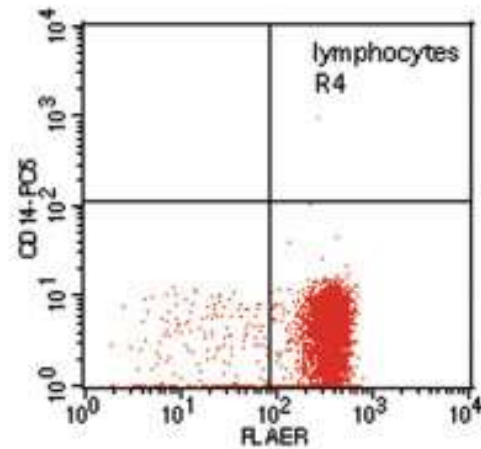
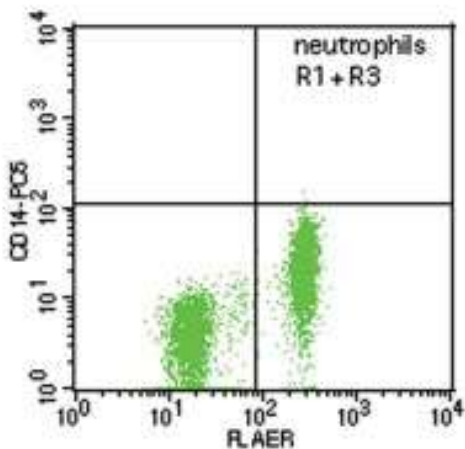
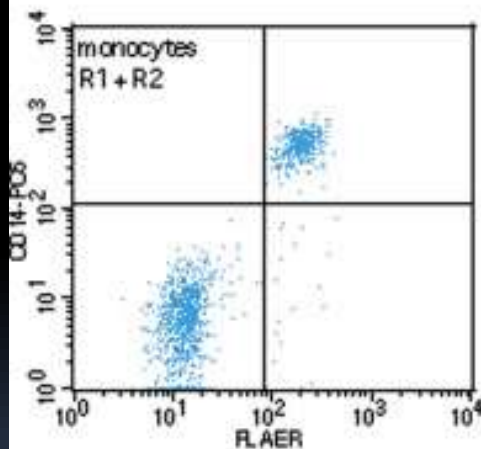
File: Normal PB
Gate: G4
Gated Events: 3175

Quad	Events	% Gated
UL	0	0.00
UR	4	0.13
LL	34	1.07
LF	3137	98.80

Πρωτόκολλο WBC



**PNH PB
Fresh**



Acquisition Date: 08-Jun-05
Gate: G2
Gated Events: 1514

Quad	Events	% Gated
UL	1	0.07
UR	412	27.21
LL	1081	71.40
LF	20	1.32

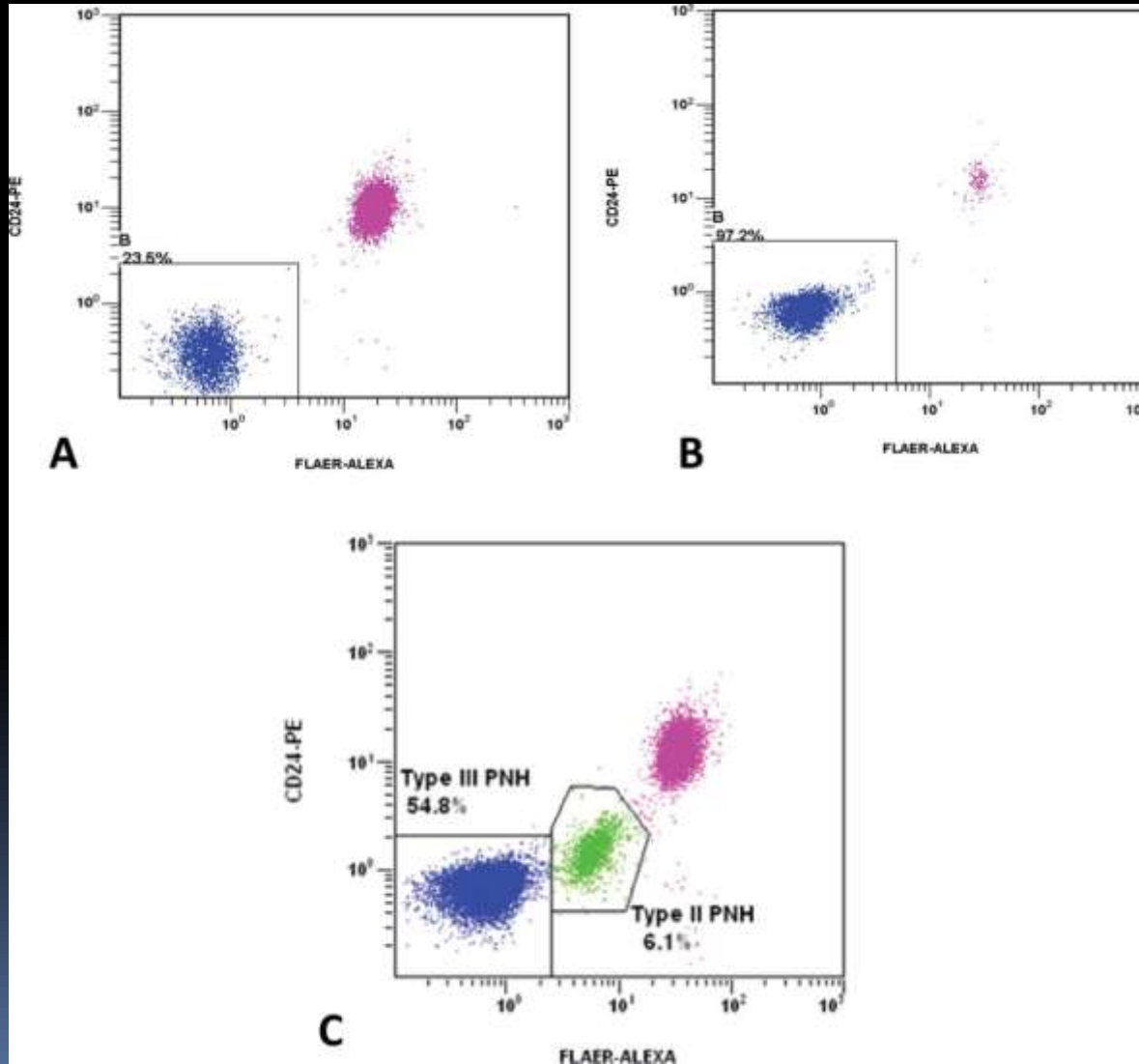
Acquisition Date: 08-Jun-05
Gate: G3
Gated Events: 6779

Quad	Events	% Gated
UL	0	0.00
UR	4	0.06
LL	3468	51.16
LF	3307	48.78

Acquisition Date: 08-Jun-05
Gate: G4
Gated Events: 11273

Quad	Events	% Gated
UL	0	0.00
UR	1	0.01
LL	238	2.11
LF	11034	97.88

CD15 / CD24 / FLAER



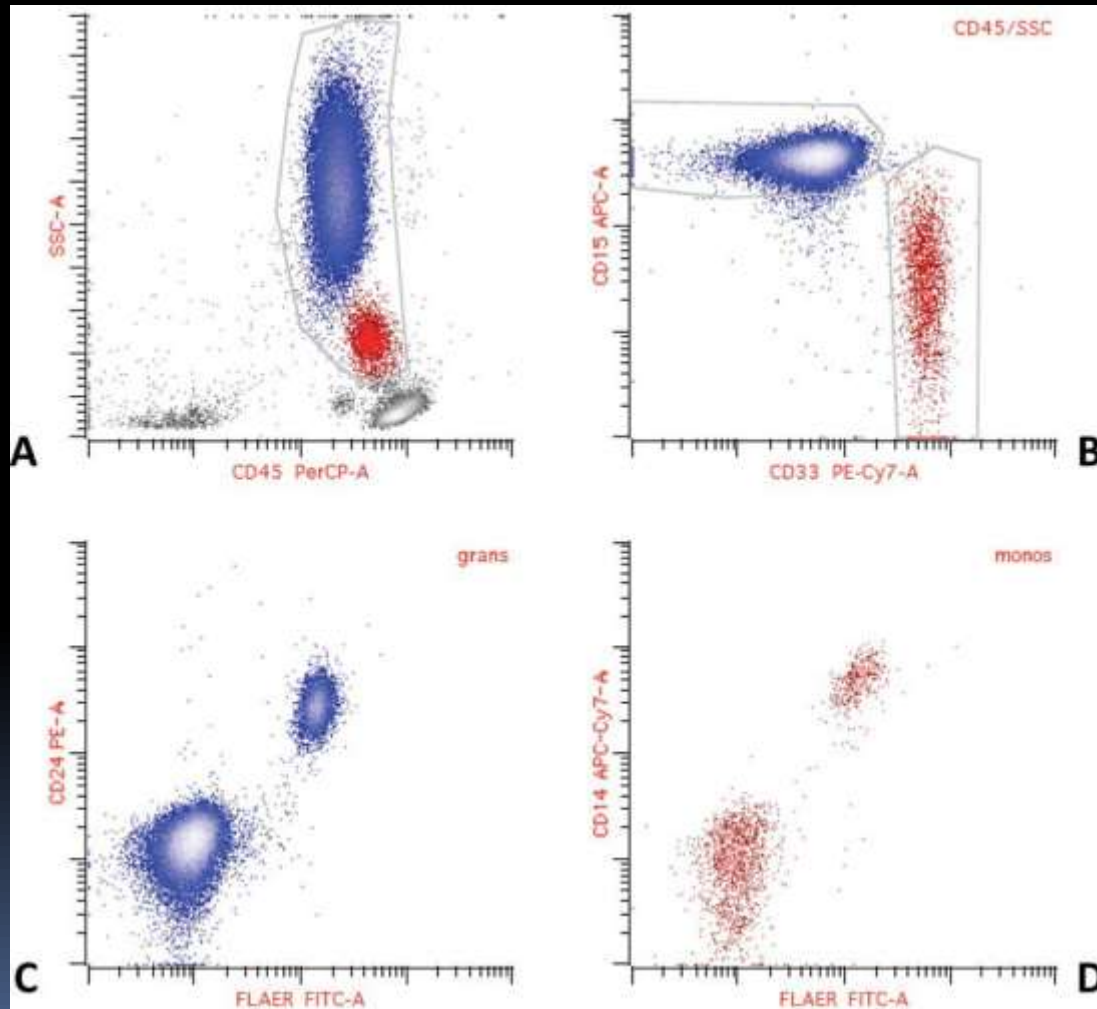
Πιθανοί συνδυασμοί για τα WBC

	Cells	1	2	3	4	5	6
3 color	G	FLAER	CD24	CD15			
3 color	M	FLAER	CD14	CD33/CD64			
4 color	G	FLAER	CD24	CD15	CD45		
4 color	M	FLAER	CD14	CD33	CD45		
4 color	G+M	FLAER	CD24	CD14	CD33		
5 color	G+M	FLAER	CD24	CD14	CD15	CD45	
5 color	G+M	FLAER	CD24	CD14	CD15	CD33/64	
6 color	G+M	FLAER	CD24	CD14	CD15	CD45	CD64
6 color	G+M	FLAER	CD24	CD14	CD15	CD45	CD33

6 χρώματα

- FLAER / CD24 / CD14 / CD15 / CD45 / CD64 (ή CD33)
- FLAER/CD24 για τον προσδιορισμό κυττάρων PNH (απουσία και των δύο) σε CD15++ κοκκιοκύτταρα/ουδετερόφιλα
- FLAER/CD14 για τον προσδιορισμό κυττάρων PNH (απουσία και των δύο) σε CD64++ (CD33++) μονοκύτταρα

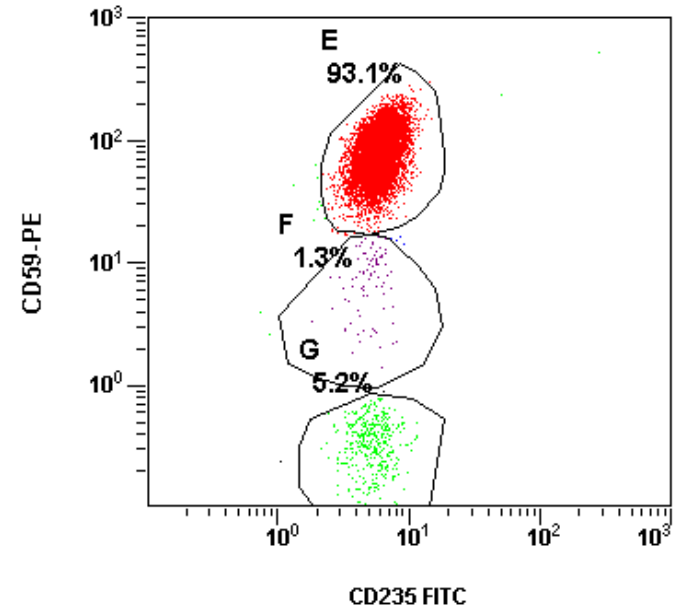
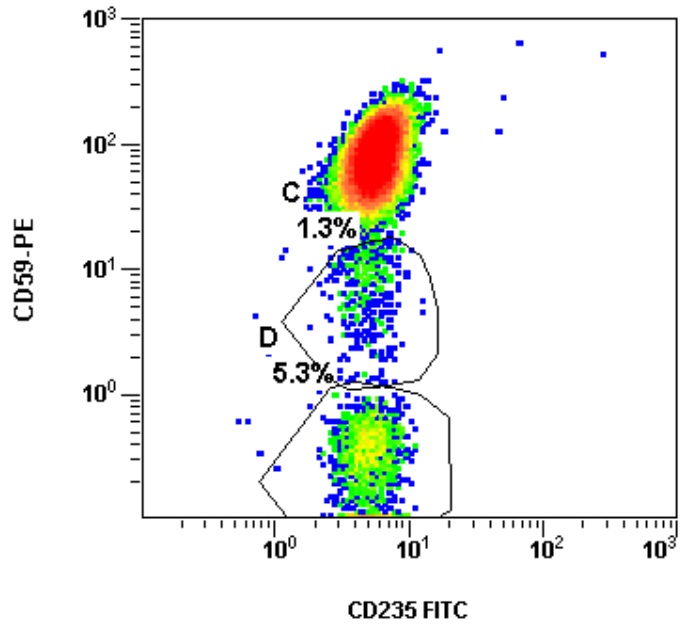
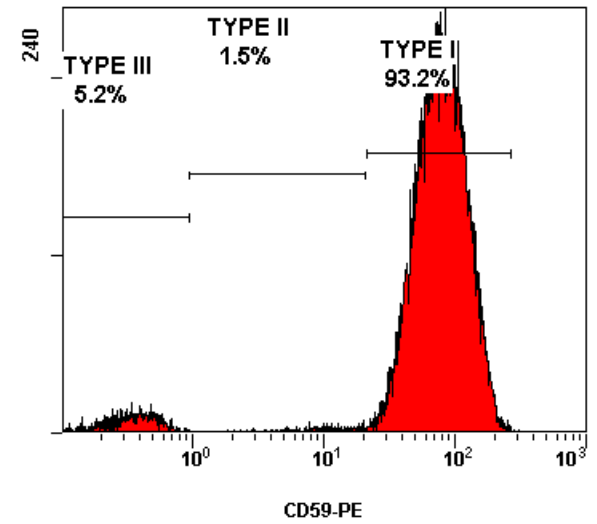
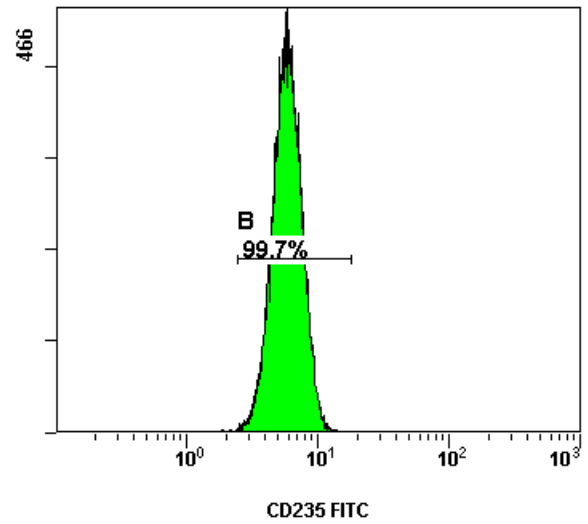
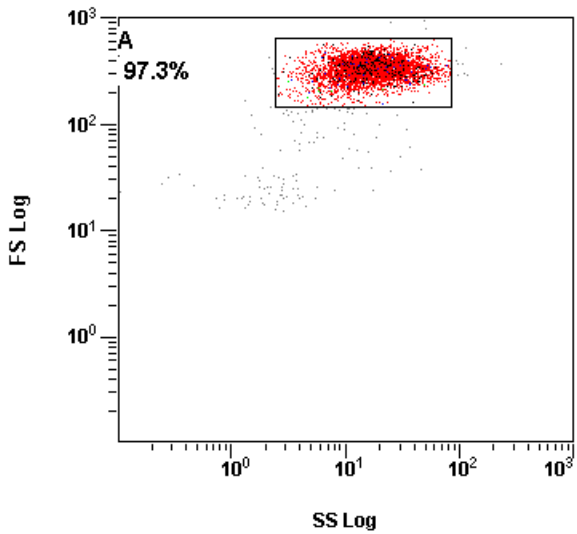
CD45 / CD15 / CD33 / CD24 / CD14 / FLAER



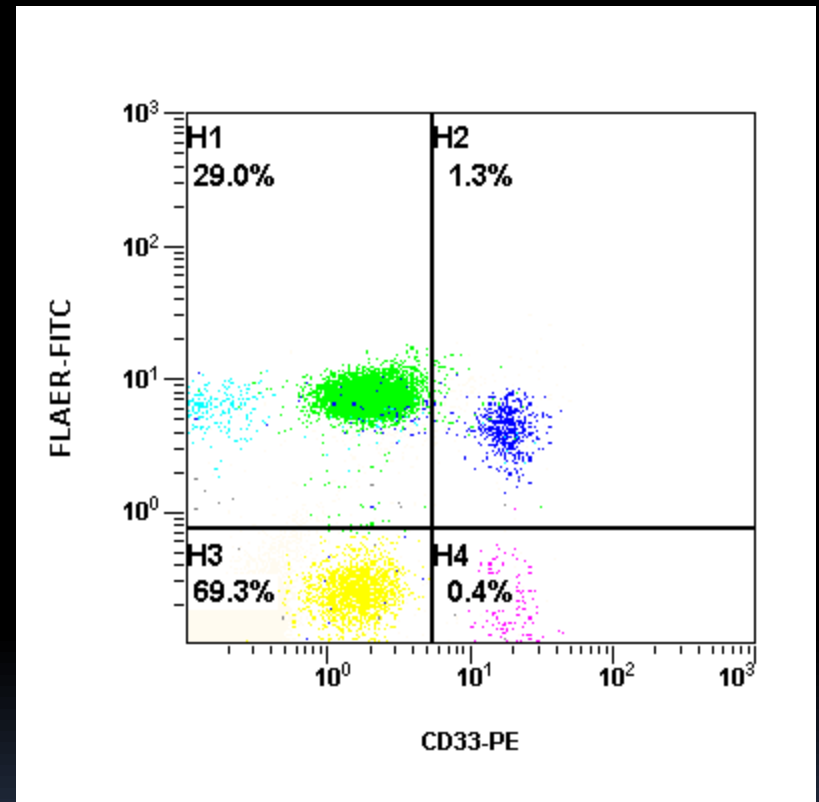
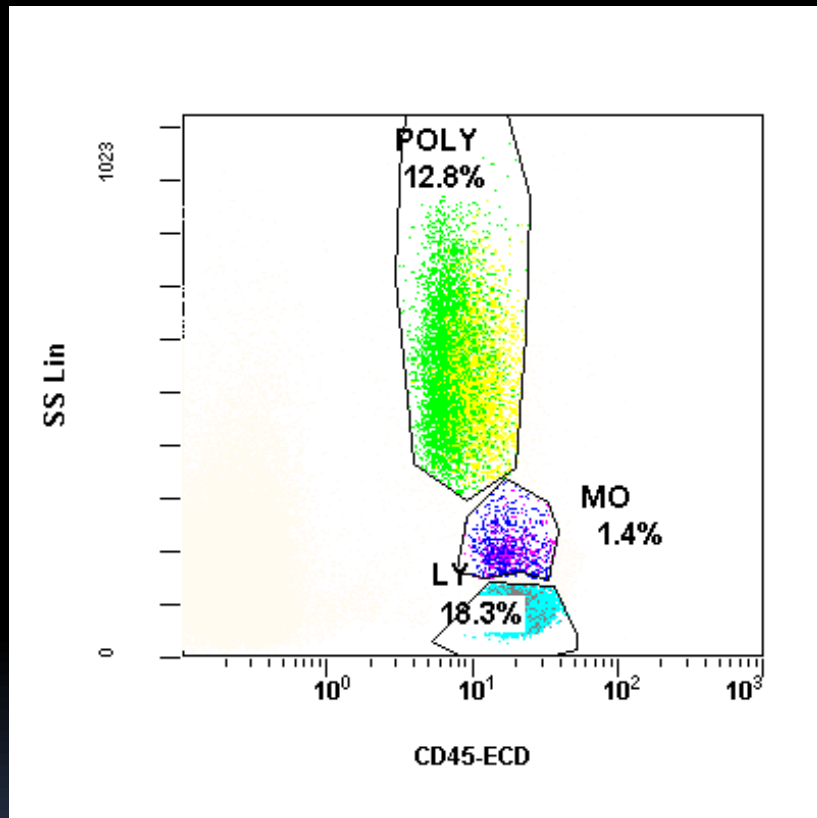
ερυθρά:
κοκκιοκύτταρα και μονοκύτταρα:
μονοκύτταρα μόνο :

CD235α-CD59
FLAER- CD24 - CD14 - CD15 - CD45
FLAER- CD33 - CD14 - CD64 - CD45

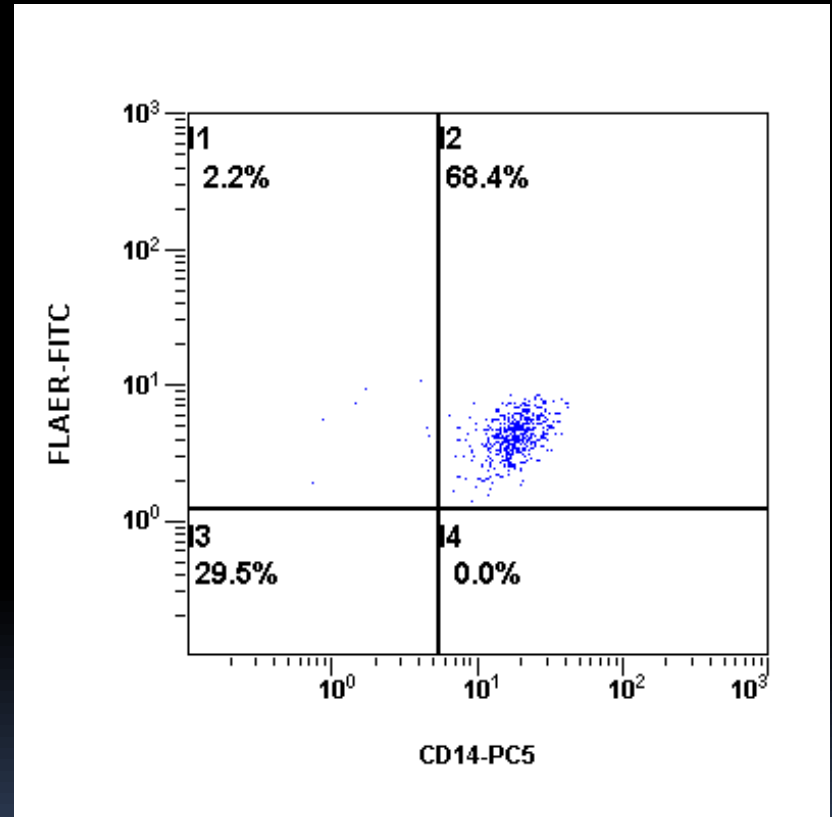
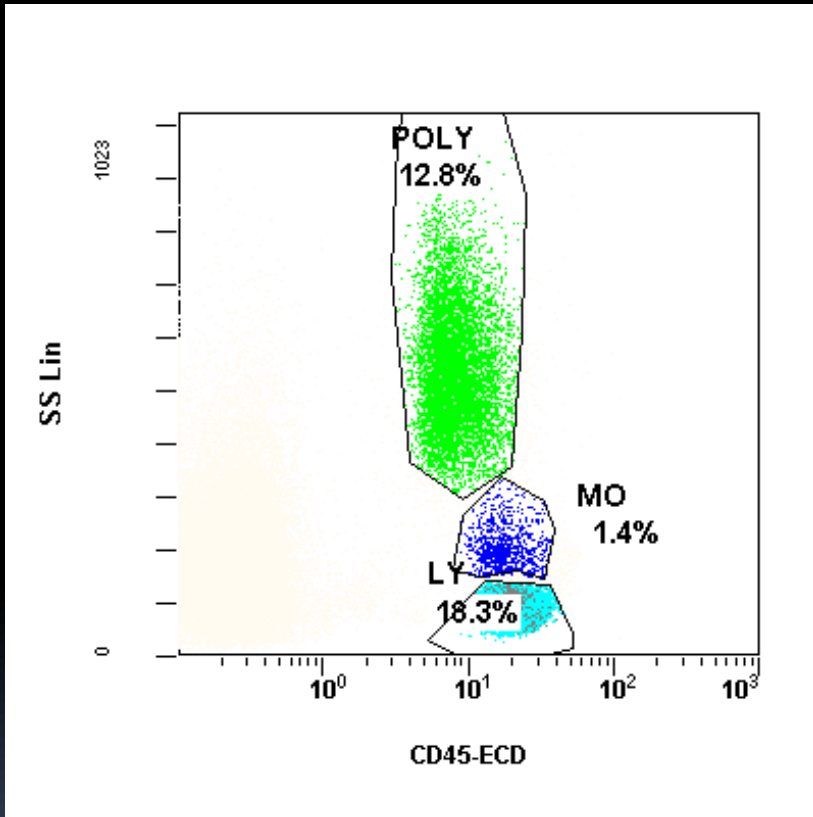
	Τι ψάχνουμε	Οριοθέτηση για υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα;	Πόσα κύτταρα μετρώνται τυπικά
RBC	απουσία ή ελάττωση έκφρασης CD59	CD235+ RBCs μόνο	50,000 ή περισσότερα
κοκκιοκύτταρα	απουσία FLAER και CD24	CD15+ ώριμα κοκκιοκύτταρα / ουδετερόφιλα	50,000 ή περισσότερα
μονοκύτταρα	απουσία FLAER και CD14	CD64 ή CD33	Ποικίλλει (20,000)



PNH διάγνωση



PNH διάγνωση



ΑΠΑΝΤΗΤΙΚΟ

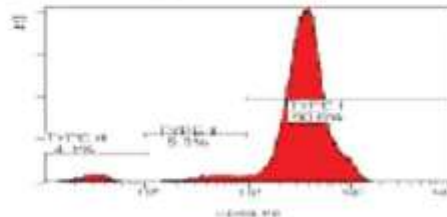
DIAGNOSIS: PNH CLONE IDENTIFIED IN BOTH WBC AND RBC

Comment: Flow cytometric analysis shows a PNH clone within the granulocytes (60.9%), monocytes (61.5%) and RBC's (9.4%). These findings are consistent with a diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). Any potential difference in clone size between the white blood cells and the red blood cells may be due to hemolysis and/or recent transfusion. The PNH clone in the monocytes and granulocytes showed a bimodal distribution, indicating Type II and Type III cells. The clinical significance of this finding is still under investigation.

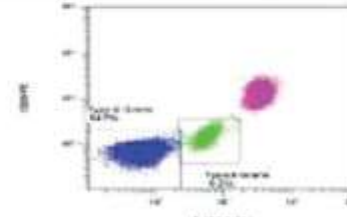
Reference: Richards et al: Diagnosis and Management of PNH, Blood 2005, 106 (12)

Flow Results: Immunophenotypic analysis was performed using gating antibodies CD45, CD15, CD33, CD64, GPI-linked antibodies CD59, CD14, CD24, as well as fluorescent Aerolysin (FLAER).

Cell Type	Deficiency	Result
RBC	Type II (partial CD59 deficiency)	5.3%
	Type III (complete CD59 deficiency)	4.1%
	PNH Clone size (Type II and Type III combined)	9.4%
WBC - Monocytes	FLAER/CD14 Deficiency	61.5% (57.2% Type III + 4.3% Type II)
WBC - Granulocytes	FLAER/CD24 Deficiency	60.9 (54.7% Type III + 6.2% Type II)



Type III and Type II PNH clone in RBC's



Type III (blue) and Type II (green) PNH Clone in Granulocytes

The markers used for this flow cytometric analysis are labeled as Analyte Specific Reagents (ASR) and are used for clinical purposes. The performance characteristics of these markers have been determined by DCD®-Flow Cytometry Laboratory. Their use has not been approved by the U.S. Food and Drug Administration; the FDA has determined that such approval is not necessary.

Electronic Signature
 Pathologist/Technologist
 Date

Απαντητικό

- Τα MoAbs που χρησιμοποιήθηκαν
- Οι κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν
- Τα ποσοστά των PNH κλώνων σε κάθε κυτταρική σειρά
- Ο τύπος του PNH κλώνου στα ερυθρά



Ευχαριστώ για την
προσοχή σας!!!