

## Implementatie en actualisering

De Richtlijn is bestemd voor alle zorgverleners die betrokken zijn bij bloedtransfusies en geautoriseerd door de wetenschappelijke verenigingen van alle disciplines die bij transfusie van bloedproducten betrokken zijn. Daarmee is deze richtlijn deel geworden van de professionele standaard van de leden van die verenigingen.

Bloedtransfusiecommissies in ziekenhuizen hebben een belangrijke rol bij de implementatie en toetsing op naleving van de Richtlijn. De in deze Richtlijn aangeboden kwaliteitsindicatoren zijn voor dat laatste een belangrijk instrument. De landelijke rapportage en analyse van deze indicatoren door het Hemovigilantie bureau TRIP middels benchmarking kan hierin ook een stimulerende rol spelen.

De Landelijke Gebruikersraad van Sanquin Bloedvoorziening, de Nederlandse Vereniging voor Bloedtransfusie (NVB) en de Vereniging voor Hematologisch Laboratoriumonderzoek (VHL) is gevraagd zich te beraden op een structurele aanpak van het stimuleren van de implementatie met name door de klinische afdelingen en het bewaken van de actualiteit van de Richtlijn alsmede het initiatief nemen voor revisie van deze Richtlijn of onderdelen ervan.

Tenslotte: Bij de revisie van deze Richtlijn is in ruime mate gebruik gemaakt van internationale richtlijnen. Daarom vonden wij het belangrijk dat deze herziene Richtlijn Bloedtransfusie ook beschikbaar is voor onze buitenlandse collega's. Daartoe wordt er een Engelse vertaling van de Richtlijn gemaakt, die ook als pdf file beschikbaar zal komen.

Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2011; 36: 213-218

## Onvoorziene PNH diagnose: een hoofdrol voor CD24 in het flowcytometrie protocol voor screening op leukemieën en lymfomen?

J. NIGTEN<sup>1</sup>, P.W.G. VAN DER LINDEN<sup>2</sup> en F.J.M. BERGKAMP<sup>1</sup>

Paroxysmale nachtelijke hemoglobinurie (PNH) is een zeldzame chronische ziekte die wordt gekenmerkt door complement geïnduceerde intravasculaire hemolytische anemie. PNH kan een diepgaande impact hebben op de kwaliteit van leven en overleving van een individu. Het beschikbaar komen van eculizumab, een monoklonaal antilichaam gericht tegen complement factor C5, als nieuwe therapie voor patiënten met PNH lijkt een sterk positieve invloed te hebben op de prognose. Bij een

*Medial diagnostische centra, Haarlem/Hoofddorp<sup>1</sup> en Kennemer Gasthuis afd. Interne geneeskunde, Haarlem<sup>2</sup>*

Correspondentie: F.J.M. Bergkamp, Medial diagnostische centra, Postbus 231, 2130 AE Hoofddorp  
E-mail: f.bergkamp@medial.nl

*Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2011, vol. 36, no. 4*

## Dankbetuiging

We willen de werkgroep leden, de wetenschappelijke en patiënten verenigingen, de medewerkers van het CBO en alle anderen, die een bijdrage hebben geleverd aan de realisatie van de herziening van de Richtlijn Bloedtransfusie hartelijk danken voor hun inzet en volharding. Voor de samenstelling en taakverdeling van werkgroep, kerngroep en voorbereidend projectteam alsmede de deelnemende wetenschappelijke en patiëntenverenigingen en CBO medewerkers: zie [www.cbo.nl/bloedtransfusie](http://www.cbo.nl/bloedtransfusie).

De revisie van deze Richtlijn werd mogelijk gemaakt door een subsidie van ZonMw. Sanquin Bloedvoorziening financierde de druk- en distributiekosten van de Transfusiegids evenals de kosten van de Engelse vertaling.

## Referenties

1. Buiting AMJ, van Aken WG. Richtlijn 'Bloedtransfusie' (3<sup>de</sup> algehele herziening). Ned. Tijdschr Geneesk. 2005; 149: 2613-2618.
2. Castel A. Voorwoord richtlijn Bloedtransfusie. Ned Tijdschr Klin Chem. 2003; 28: 223.
3. Buiting AMJ, van Aken WG. De doorlopen procedures ten behoeve van de CBO-richtlijn 'Bloedtransfusie'. Ned Tijdschr Klin Chem. 2003; 28: 255-259.

### Nieuw in deze Richtlijn

Aparte paragrafen met  
Transfusiebeleid voor neonaten en kinderen  
Richtlijnen voor verpleegkundige aspecten  
Kwaliteitsindicatoren  
Landelijke Transfusiegids voor klinici en verpleegkundigen met de belangrijkste aanbevelingen voor de praktijk

klinische verdenking op PNH kan met de juiste flowcytometrische analyse de diagnose in korte tijd bevestigd worden. Echter, lang niet alle patiënten met PNH presenteren zich met een duidelijke kliniek en het kan soms jaren duren voordat de diagnose gesteld wordt. Onderstaande casus laat zien hoe het klinisch chemisch laboratorium, door middel van het gebruik van CD24 in het flowcytometrie protocol voor screening op leukemieën en lymfomen, in belangrijke mate kan bijdragen aan het opsporen van PNH patiënten.

Patiënten met een verworven mutatie in het X-gebonden *PIG-A*-gen in de hematopoïetische stamcel hebben een gedeeltelijke of volledige deficiëntie van eiwitten welke via een glycosylfosfatidylinositol (GPI)-ankereiwit aan het celoppervlak gebonden zijn.

*PIG-A* codeert voor een enzym wat essentieel is voor de synthese van het GPI-ankereiwit en een defect in dit enzym resulteert in een stoornis in de verankering van bepaalde membraaneiwitten. Als gevolg hiervan ontbreken een aantal belangrijke eiwitten op de celmembraan van erythrocyten, leukocyten en trombocyten. Tot de groep van GPI-verankerde eiwitten behoren onder andere CD14, CD16, CD24, CD48, CD52, CD55, CD58, CD59, CD66b, CD73, CD87, CD90, CD108, CD109 en CD157 (1-4). Paroxysmale nachtelijke hemoglobinurie (PNH) is een ziekte die gekarakteriseerd wordt door de hierboven beschreven afwijking. Tegenwoordig wordt PNH gezien als een klonale ziekte van de hematopoietische stamcel aanwezig het defect in het GPI-ankereiwit invloed heeft op alle lijnen van uitrijping van de hematopoietische stamcel. Echter, in eerste instantie is PNH beschreven als een bepaalde vorm van hemolytische anemie. De deficiëntie van de complementregulerende GPI-verankerde eiwitten CD55, CD59 en C8-bindend eiwit, welke een rol spelen bij de inactivatie van geactiveerd complement dat zich op het celoppervlak heeft afgezet, verklaart de overgevoeligheid van erythrocyten voor door complement geactiveerde lysis. Dit fenomeen kan zich bij de patiënt uiten door middel van donkergekleurde urine door hemoglobinurie ten gevolge van intravasculaire hemolyse (5, 6). Wanneer hemolyse op de voorgrond staat met daarbij een bepaalde mate van actieve erythropoïese en beenmerg hypoplasie, dan spreken we van klassieke PNH. Bij klassieke PNH wordt onderscheid gemaakt in erythrocyten met complete deficiëntie van GPI-verankerde eiwitten (type III) en erythrocyten met gedeeltelijke deficiëntie (type II). Naast klassieke PNH zijn er ook patiënten met bijvoorbeeld MDS of aplastische anemie bij wie een PNH-kloon waargenomen wordt en ook bestaat er een zogenaamde subklinische PNH. Voor zowel de klassieke PNH als voor de PNH-kloon bij andere hematologische aandoeningen geldt dat de mate van intravasculaire hemolyse afhankelijk is van het percentage PNH-cellen. Behalve intravasculaire hemolytische anemie vertonen patiënten met PNH nog een aantal andere klinische kenmerken die kunnen worden toegeschreven aan het ontbreken van GPI-verankerde eiwitten. Van deze klinische kenmerken is trombose de meest belangrijke en in sommige gevallen levensbedreigende complicatie. Patiënten met een grote PNH-kloon (waarbij 'groot' gedefinieerd wordt als >50% van de granulocyten welke deficiënt zijn voor GPI-verankerde eiwitten) lijken een groter risico te hebben op het ontwikkelen van trombose dan patiënten met een kleinere PNH-kloon (7). Onder subklinische PNH vallen die patiënten welke een kleine PNH-kloon hebben zonder klinische of biochemische tekenen van hemolyse of trombose (8-10). De diagnose PNH wordt gesteld met behulp van flowcytometrie, waarmee populaties van cellen worden opgespoord welke deficiënt zijn voor bepaalde GPI-verankerde eiwitten. De meest gebruikte markers in de routine diagnostiek voor PNH zijn CD55 en CD59 op erythrocyten, CD16, CD24 en CD66b op granulocyten en CD14 en CD55 op monoccyten. Over het algemeen geldt dat de diagnose PNH gesteld kan wor-

den wanneer de afwezigheid van twee verschillende GPI-verankerde eiwitten op minimaal twee verschillende cellijnen bevestigd kan worden (8). Voor het bepalen van de grootte van de PNH-kloon wordt het percentage granulocyten wat deficiënt is voor GPI-verankerde eiwitten gebruikt, aangezien hemolyse en eventuele bloedtransfusies het percentage erythrocyten wat deficiënt is voor GPI-verankerde eiwitten sterk kan beïnvloeden. Een gevoeliger methode, welke ook ingezet kan worden bij de detectie van een kleine kloon, maakt gebruik van fluorescent-gelabeld aerolysine (FLAER), een bacterieel toxine dat specifiek bindt aan het GPI-anker zelf. De afwezigheid van de binding van FLAER aan granulocyten en monoccyten is karakteristiek voor PNH-cellen (11, 12). Van oudsher richt de behandeling van PNH zich voornamelijk op de preventie en behandeling van klachten van anemie. Daartoe kunnen bloedtransfusies worden toegediend. Foliuimzuur dient gesuppleerd te worden bij sterk toegenomen erythropoïese vanwege verhoogd verbruik. Verder dient regelmatig de ijzerstatus gecontroleerd te worden omdat, afhankelijk van de mate van hemolyse en hemoglobinurie en het aantal bloedtransfusies, zowel een ijzergebrek als een ijzerstapeling kan optreden (8). Sinds enkele jaren is er een nieuwe therapie op de markt, eculizumab, die de behandeling van PNH sterk heeft veranderd. Eculizumab, een monoklonaal antilichaam gericht tegen complementfactor C5, blokkeert de vorming van een 'membrane attack complex' (MAC C5b-C9) op de PNH-erythrocyten en voorkomt daarmee hemolyse. In 50% van de patiënten resulteert de behandeling met eculizumab in opheffing van de noodzaak tot bloedtransfusies (4, 13-19). Bij patiënten met een populatie PNH-cellen van >50% dient tromboseprophylaxe overwogen te worden in verband met een verhoogd risico op veneuze trombose (7). Behandeling met eculizumab blijkt overigens ook een gunstig effect te hebben op het trombose-risico (20). Voor de behandeling is het van belang om onderscheid te maken tussen klassieke PNH, een PNH-kloon als onderdeel van een andere aandoening van het beenmerg en subklinische PNH, aangezien eculizumab het meest effectief is in patiënten met klassieke PNH. Bij een PNH-kloon als onderdeel van een andere aandoening van het beenmerg kan beter andere therapie, zoals immunosuppressie of stamceltransplantatie, overwogen worden. PNH staat in de differentiaal diagnose als oorzaak van een intravasculaire hemolytische anemie. Bij een klinische verdenking op PNH kan met de juiste flowcytometrische analyse de diagnose in korte tijd bevestigd worden. Echter, lang niet alle patiënten presenteren zich met een duidelijke kliniek en PNH staat dan veelal niet bovenaan in een differentiaal diagnose. Het kan soms zelfs jaren duren voordat de diagnose gesteld wordt. Onderstaande casus illustreert dat door eenvoudig CD24 aan het flowcytometrie protocol voor screening op leukemieën en lymfomen toe te voegen, het opsporen van PNH geholpen kan worden.

### Casusbeschrijving

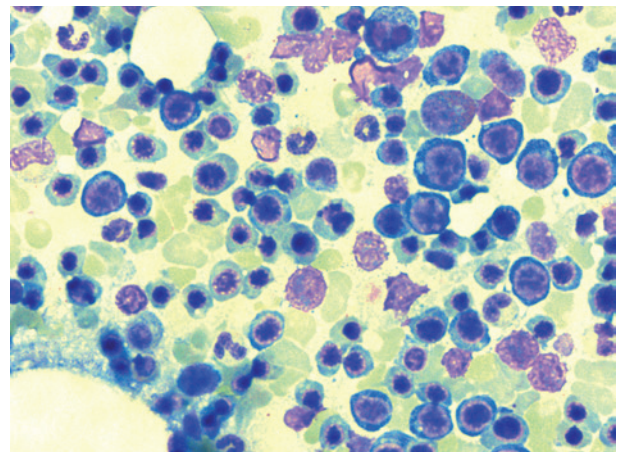
Een 42-jarige man wordt door de huisarts doorverwezen naar een internist in verband met een bij toeval, via de arbodienst, gevonden licht macrocytaire anemie.

De patiënt voelt zich erg moe, maar buiten dat geeft hij aan geen klachten te hebben. Hij heeft goede eetlust en geen last van passageklachten of een afwijkend defecatiepatroon. De patiënt geeft aan dat er geen sprake is van fecaal bloedverlies. De patiënt hoest niet en is niet kortademig. Bij lichamelijk onderzoek worden, buiten anemische conjunctivae, geen bijzonderheden geconstateerd. De huisarts geeft als reden voor verwijzing een ijzerebreksanemie op (zie tabel 1 voor de laboratoriumuitslagen via de huisarts op 22/11/2010). Twee weken later wordt door een internist nader laboratoriumonderzoek ingezet (zie tabel 1, kolom met datum 7/12/2010). Er blijkt sprake te zijn van een niet-immuun gemedieerde hemolytische anemie waarbij de microscopische beoordeling van het bloedbeeld traandruppelcellen, elliptocyten en enkele staven laat

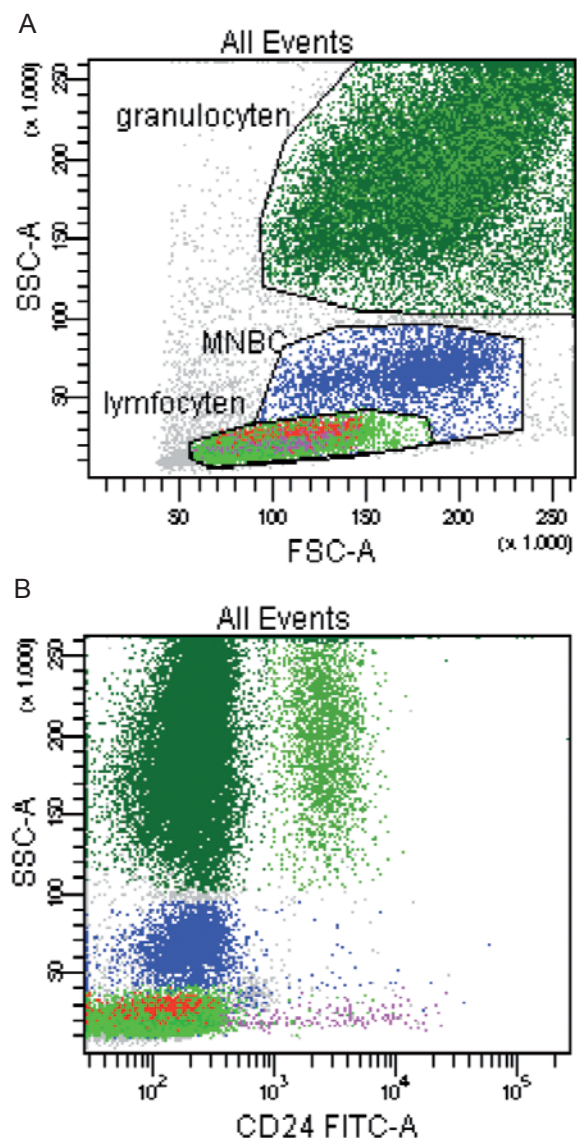
**Tabel 1.** Klinisch chemische laboratoriumuitslagen. De tabel toont de uitslagen van het laboratoriumonderzoek van de beschreven patiënt op twee verschillende dagen

Bepaling	22/11/2010	7/12/2010	Referentiewaarden	
Hb	<b>5,1</b>	<b>5,1</b>	8,5-11,0	mmol/l
Erythrocyten	<b>2,29</b>	<b>2,34*</b>	4,50-5,50	10 <sup>12</sup> /l
MCV	<b>104</b>	<b>103</b>	80-100	fl
RDW	<b>16,5</b>	<b>16,6</b>	10-15	%
Trombocyten	<b>115</b>	<b>131</b>	150-400	10 <sup>9</sup> /l
Leukocyten	<b>3,7</b>	<b>3,5</b>	4,0-10,0	10 <sup>9</sup> /l
Reticulocyten		165	30-90	10 <sup>9</sup> /l
Dir. antiglob. test (DAT)		neg	negatief	
Kreatinine	75	67	60-110	µmol/l
AF	58		10-120	U/l
Gamma GT	20		0-50	U/l
ASAT	<b>93</b>		5-40	U/l
ALAT	31		5-45	U/l
LD		<b>2564</b>	10-450	U/l
TE		71,1	62-80	g/l
IJzer	12		10-30	µmol/l
Ferritine	<b>23</b>		30-400	µg/l
Transferrine	43		25-45	µmol/l
Transfer. saturatie	0,15		0,15-0,45	
Haptoglobine		<b>&lt;0,10</b>	0,3-2,0	g/l
Vitamine B12	0,20		0,15-0,64	nmol/l
Foliumzuur	15,8		4,5-20,7	nmol/l
TSH	1,84		0,3-4,2	mU/l

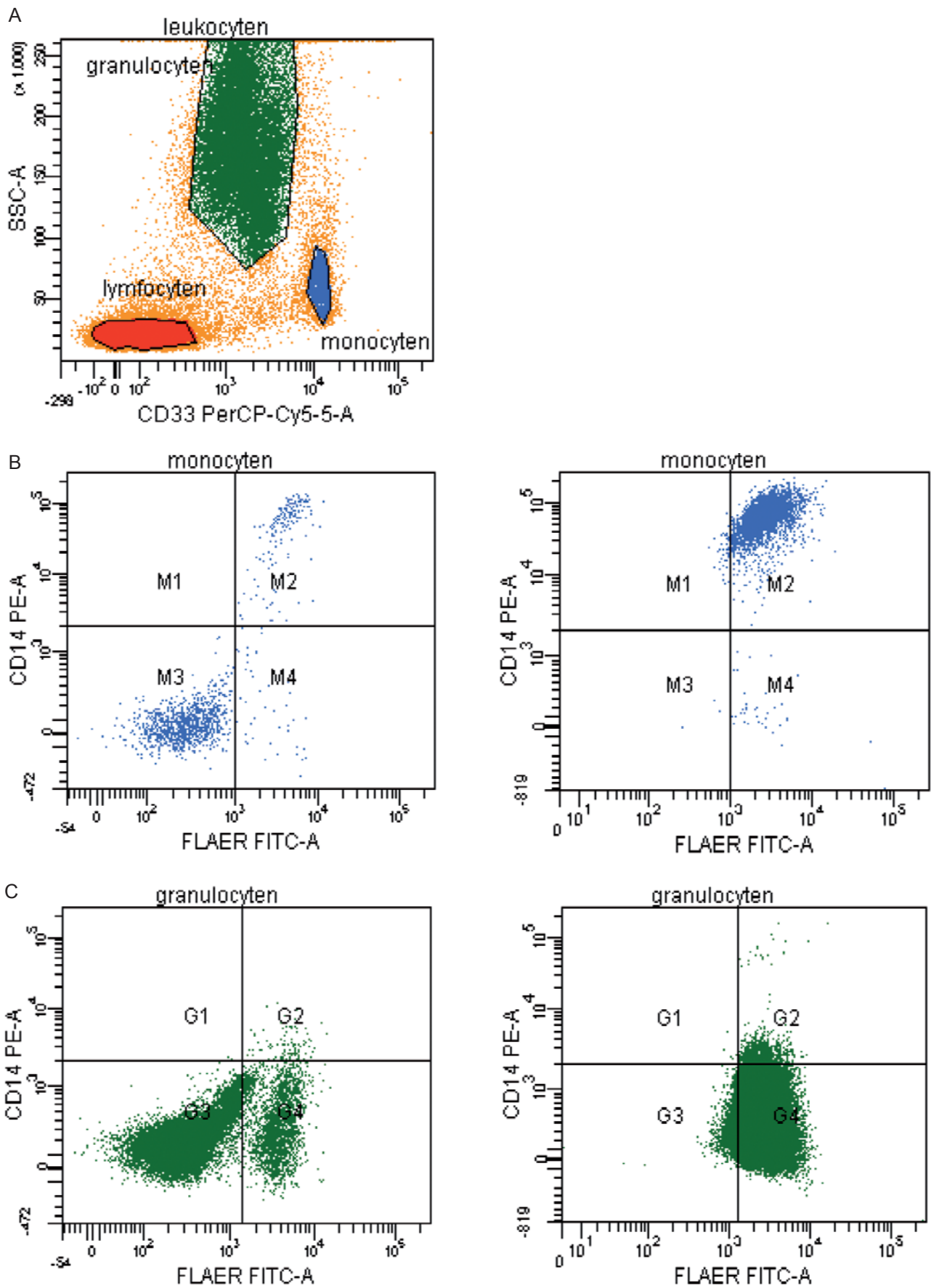
\* Microscopische differentiatie toont elliptocyten, traandruppelcellen en enkele staven



**Figuur 1.** Microscopisch beeld van een beenmerguitstrijk van de in de casus beschreven patiënt met PNH. Het beenmerg toont een zeer sterk toegenomen erythropoiese met dysplastische kenmerken.



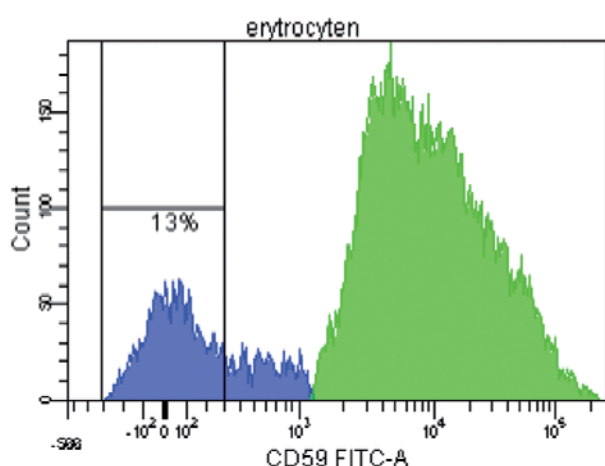
**Figuur 2.** Immunofenotypering van perifere bloedcellen m.b.v. CD24. Flowcytometrische dot plots van perifere bloedcellen van de in de casus beschreven patiënt. A) Forward scatterer (FSC) uitgezet tegen de side scatter (SSC): de verschillende populaties cellen in bloed zijn aangegeven. B) CD24 uitgezet tegen de SSC: een groot deel van de granulocyten in het bloed zijn negatief voor de marker CD24.



**Figuur 3.** Immunofenotypering van granulocyten en monocyten m.b.v. FLAER. Flowcytometrische dot plots van perifere bloedcellen van de in de casus beschreven patiënt en van een gezonde controle. A) CD33 uitgezet tegen de side scatter (SSC): de verschillende populaties staan weergegeven. B) FLAER uitgezet tegen CD14 en 'gating' op de granulocyttaire populatie: bijna 88% is negatief voor CD14 en FLAER (kwadrant G3). De onderste afbeelding geeft, ter vergelijking, een soortgelijke dot plot van een gezonde controle weer. C) FLAER uitgezet tegen CD14 en 'gating' op de monocyttaire populatie: ruim 85% is negatief voor CD14 en FLAER (kwadrant M3). Wederom geeft de onderste afbeelding een soortgelijke dot plot van een gezonde controle weer.

zien. Bij lichamelijk onderzoek wordt in de liezen beiderzijds klieren gevoeld. Het abdomen is niet goed palpeerbaar door passief spierverset. Er wordt een echo van het abdomen en een X-thorax aangevraagd met als vraagstelling splenomegalie en lymfadenopathie. De conclusie van de radioloog is dat er sprake is van splenomegalie, dat er geen lymfadenopathie wordt gezien en dat de thorax er normaal uitziet.

De internist-hematoloog doet een beenmergpunctie ten behoeve van morfologisch en immunologisch onderzoek met als vraagstelling 'uitsluiten leukemie of lymfoom'. Tevens wordt later die dag immunofenotypering van het bloed aangevraagd. Bij de morfologische beoordeling van het beenmerg wordt een zeer sterk toegenomen erythropoiese met enkele dysplastische kenmerken gezien (figuur 1). Tevens blijkt er sprake te zijn van ijzeregebrek. Aanwijzingen voor een leukemie of lymfoom ontbreken. Ook immunologisch zijn er geen aanwijzingen voor een acute leukemie of een lymfoom lokalisatie dan wel veel plasmacellen. Wel wordt bij de analyse opgemerkt dat de granulocyten geen CD24 tot expressie brengen. Bij immunofenotypering van bloed en/of beenmerg voor screening op leukemieën of lymfomen wordt standaard CD24 meegenomen in het screeningsprotocol. CD24 is een GPI-verankerd eiwit wat tot expressie wordt gebracht op B-cellen en granulocyten. De mate van expressie van CD24 op B-cellen kan richting geven aan de diagnose van patiënten met verdenking op lymfoide maligniteit. Een zwakkere expressie van CD24 op B-cellen wijst meer richting een reactief proces, terwijl een sterke CD24 expressie op B-cellen een aanwijzing kan zijn voor een maligne proces. PNH kan aangetoond worden in de vorm van CD24 negatieve granulocyten, ook dit benadrukt de toegevoegde waarde van CD24 screening bij leukemieën en lymfomen. De kracht van CD24 zit ook in het feit dat de expressie



**Figuur 4.** Immunofenotypering van erythrocyten m.b.v. CD59. Flowcytometrisch histogram van de populatie erythrocyten in perifeer bloed van de in de casus beschreven patiënt. CD59 werd uitgezet tegen CD235a en vervolgens werd er een 'gate' gezet om de populatie CD59-negatieve en zwak positieve populatie. 13% van de erythrocyten is volledig deficiënt voor het CD59 eiwit.

van CD24 op granulocyten niet sterk wordt beïnvloed door activatieprocessen, zoals dat wel het geval kan zijn bij CD16 op granulocyten of CD14 op monocyten, twee andere GPI-verankerde eiwitten welke in veel laboratoria onderdeel zijn van het screeningsprotocol voor leukemieën en lymfomen. CD16 wordt bovendien meestal samen met CD56 gebruikt om NK-cellen te detecteren. Daar CD56 geen PI-verankerd eiwit is, zal een deficiëntie van CD16 door PNH op basis van afwezigheid van NK-cellen niet gebeuren. Terug naar de casus. Bij de flowcytometrische analyse van het beenmerg wordt geconstateerd dat een substantieel gedeelte van de granulocyten negatief is voor CD24. Bij analyse van de flowcytometrische data van het bloed wordt eenzelfde CD24 negatieve granulocyttaire populatie gevonden (figuur 2). De bevinding van een duidelijke CD24 negatieve granulocyttaire populatie is opvallend en dient direct nader onderzocht te worden. Bij verdere analyse van de kleine B-celpopulatie blijkt dat ook de B-cellen vrijwel geen CD24 tot expressie brengen. Tevens blijkt dat een groot gedeelte van de monocyten CD14 negatief zijn. Deze duidelijke afwijkende bevinding ten opzichte van normaal leidt er toe dat er een volledige PNH-onderzoek wordt ingezet op zowel bloed als beenmerg. Hierbij wordt gebruik gemaakt van fluorescent-gelabeld aerolysine (FLAER), een bacterieel toxine dat specifiek bindt aan het GPI-anker op granulocyten en monocyten. Ook vindt er analyse plaats van CD55 en CD59 op erythrocyten, twee GPI-verankerde eiwitten. Uit dit onderzoek blijkt dat FLAER bij ruim 80% van de granulocyten en monocyten niet reageert (figuur 3), dat CD55 op een groot deel van erythrocyten ontbreekt dan wel zwak tot expressie komt en dat 13% van de erythrocyten in het beenmerg een complete deficiëntie heeft van het GPI-verankerde eiwit CD59, zogenaamde type III erythrocyten (figuur 4). De grootte van de PNH-kloon is duidelijk verschillend binnen de granulocyttaire/monocyttaire celpopulatie en de erythrocytaire celpopulatie als gevolg van hemolyse van PNH-erythrocyten. Om deze reden wordt voor het vaststellen van de grootte van de PNH-kloon gebruik gemaakt van het percentage granulocyten wat deficiënt is voor GPI-verankerde eiwitten. De diagnose klassieke PNH met een grote populatie PNH-cellen wordt gesteld. Pas bij navraag vertelt de patiënt dat hij soms rood/bruin gekleurde ochtendurine heeft. De patiënt achtte dit niet relevant om eerder te vermelden aangezien hij hier al jaren last van heeft. De patiënt is doorverwezen naar het Universitair Medisch Centrum St. Radboud te Nijmegen, hét expertisecentrum voor behandeling met eculizumab.

### Conclusie

Flowcytometrie speelt een belangrijke rol in de diagnose van PNH. Een goede anamnese bij een bevinding van intravasculaire hemolytische anemie vormt hierbij een belangrijk onderdeel. Echter, lang niet alle patiënten met PNH presenteren zich met duidelijke klinische kenmerken. Zelfs donker gekleurde ochtendurine wordt door patiënten soms niet genoemd. Hierdoor wordt het opsporen van patiënten met een PNH-kloon vertraagd. Ook kan het zijn dat bij een bepaalde klinische presentatie een andere hematologische af-

wijking/maligniteit aannemelijker wordt bevonden. In het laatste geval zal de aanvrager immunofenotypering aanvragen om een leukemisch proces uit te sluiten dan wel te bevestigen. Bovenstaande casus laat zien dat met een adequaat flowcytometrie protocol voor de screening op leukemieën en lymfomen het mogelijk is om een PNH-kloon op te sporen bij patiënten waarbij geen verdenking op PNH bestaat. Door eenvoudig CD24 aan een flowcytometrie protocol voor screening op leukemieën en lymfomen toe te voegen kunnen ook onverwachte PNH diagnoses aan het licht worden gebracht.

#### Referenties

- Bessler M, Mason PJ, Hillmen P, Miyata T, Yamada N, Takeda J, et al. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH) is caused by somatic mutations in the PIG-A gene. *EMBO J*. 1994; 13: 110-117.
- Iida Y, Takeda J, Miyata T, Inoue N, Nishimura J, Kitani T, et al. Characterization of genomic PIG-A gene: a gene for glycosylphosphatidylinositol-anchor biosynthesis and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 1994; 83: 3126-3131.
- Miyata T, Yamada N, Iida Y, Nishimura J, Takeda J, Kitani T, et al. Abnormalities of PIG-A transcripts in granulocytes from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med*. 1994; 330: 249-255.
- Schrezenmeier H, Hochsmann B. Eculizumab opens a new era of treatment for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Expert Rev Hematol*. 2009; 2: 7-16.
- Hillmen P, Lewis SM, Bessler M, Luzzatto L, Dacie JV. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med*. 1995; 333: 1253-1258.
- Hillmen P. The role of complement inhibition in PNH. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2008; 116-123.
- Hall C, Richards S, Hillmen P. Primary prophylaxis with warfarin prevents thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Blood*. 2003; 102: 3587-3591.
- Parker C, Omine M, Richards S, Nishimura J, Bessler M, Ware R, et al. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2005; 106: 3699-3709.
- Wang H, Chuhjo T, Yasue S, Omine M, Nakao S. Clinical significance of a minor population of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-type cells in bone marrow failure syndrome. *Blood*. 2002; 100: 3897-3902.
- Nakao S, Sugimori C, Yamazaki H. Clinical significance of a small population of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-type cells in the management of bone marrow failure. *Int J Hematol*. 2006; 84: 118-122.
- 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: 167-177.
- Sutherland DR, Kuek N, Aczona-Olivera J, Anderson T, Acton E, Barth D, et al. Use of a FLAER-based WBC assay in the primary screening of PNH clones. *Am J Clin Pathol*. 2009; 132: 564-572.
- Hillmen P, Hall C, Marsh JC, Elebute M, Bombara MP, Petro BE, et al. Effect of eculizumab on hemolysis and transfusion requirements in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med*. 2004; 350: 552-559.
- Hill A, Hillmen P, Richards SJ, Elebute D, Marsh JC, Chan J, et al. Sustained response and long-term safety of eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2005; 106: 2559-2565.
- Hill A, Rother RP, Hillmen P. Improvement in the symptoms of smooth muscle dystonia during eculizumab therapy in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica*. 2005; 90 (12 Suppl): ECR40.
- 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: 1233-1243.
- Rother RP, Rollins SA, Mojcik 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.
- Schubert J, Hillmen P, Roth A, Young NS, Elebute MO, Szer J, et al. Eculizumab, a terminal complement inhibitor, improves anaemia in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Br J Haematol*. 2008; 142: 263-272.
- 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: 1840-1847.
- Hillmen P, Muus P, Duhrsen 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: 4123-4128.

#### Summary

*Nigten J, van der Linden PWG, Bergkamp FJM. Unforeseen diagnosis of PNH: a leading role for CD24 in the flow cytometry protocol for screening of leukemia and lymphoma? Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2011; 36: 213-218.*

Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is a rare chronic disorder characterized by complement induced intravascular hemolytic anemia. PNH may have a great impact on the quality of life and survival of an individual patient. The availability of eculizumab, a monoclonal antibody against complement factor C5, as a new therapy for patients with PNH appears to have a strong positive impact on the prognosis. When there is a clinical suspicion of PNH, proper flow cytometric analysis can be used to confirm the diagnosis in a relatively short period of time. However, not all patients with PNH will have an obvious clinical presentation of the disease, and sometimes it can take years to correctly diagnose these patients. The following case report shows how a clinical laboratory is able to contribute significantly to the tracing of PNH patients by using CD24 in the flow cytometry protocol for screening of leukemia and lymphoma.

*Keywords: PNH, CD24, flow cytometry, immunophenotyping, eculizumab*