

FLAER verbetert flowcytometrische PNH diagnostiek

W.H.A. de JONG, R. BEKKEMA en A.B. MULDER

Paroxismale Nachtelijke Hemoglobinurie (PNH) is een zeldzame hematologische aandoening die wordt gekenmerkt door chronische hemolytische anemie, hemoglobinurie (ochtendurine), een sterk verhoogd risico op trombose en/of beenmergaplasië. De prevalentie is 1-10 per miljoen (1). De ziekte is het gevolg van een verworven somatische mutatie in het fosfatidyl-inositolglycaan klasse A gen (PIG-A) op het X-chromosoom (Xp22.1) in een of meerdere hematopoietische stamcellen. PIG-A codeert voor het glycosyl-fosfatidyl-inositol (GPI) dat noodzakelijk is voor de verankering van eiwitten op o.a. erythrocyten, granulocyten en monoccyten. Als gevolg van de mutatie ontstaat een kloon van hematopoietische cellen met verminderde expressie of verlies van één of meer GPI-verankerde eiwitten. Door het missen van deze eiwitten (met name membrane inhibitor of reactive lysis (MIRL of CD59)) worden erythrocyten gevoeliger voor hemolyse (2-4). De diagnose PNH wordt gesteld met behulp van meerkleurenflowcytometrie. Veelal worden hierbij gelabelde antistoffen tegen de GPI-verankerde eiwitten CD55, CD16, CD24, CD59 en CD66b op granulocyten, tegen CD14, CD59, CD55 op monoccyten en tegen CD59 en CD55 op erythrocyten gebruikt. Echter, verminderde expressie of verlies van deze eiwitten vindt ook plaats op granulocytair voorstadium bij een linksverschuiving als gevolg van bijvoorbeeld een infectie, bij eosinofilie en bij granulocytair dysplasie (2-4). De diagnose PNH op basis van verlies van GPI-verankerde eiwitten is niet specifiek en maakt morfologisch onderzoek naar de aanwezigheid van granulocytair voorstadium, eosinofielen en dysplasie noodzakelijk. Recent is gebleken dat fluorescent-gelabeld aerolysin (FLAER) een specifiekere en gevoeliger marker is voor het detecteren of uitsluiten van een PNH kloon. Dit 52 kDa bacteriële eiwit bindt namelijk direct aan het GPI-anker op granulocyten en monoccyten. FLAER is in staat zeer kleine PNH populaties, zoals die kunnen worden gevonden bij PNH en aplastische anemie, aan te tonen met een gevoeligheid van 0,5% (3, 5, 6). In deze studie is onderzocht of door het gebruik van FLAER zonder morfologie onderscheid kan worden gemaakt tussen PNH en andere oorzaken van verminderde GPI-verankerde eiwit expressie.

Methoden

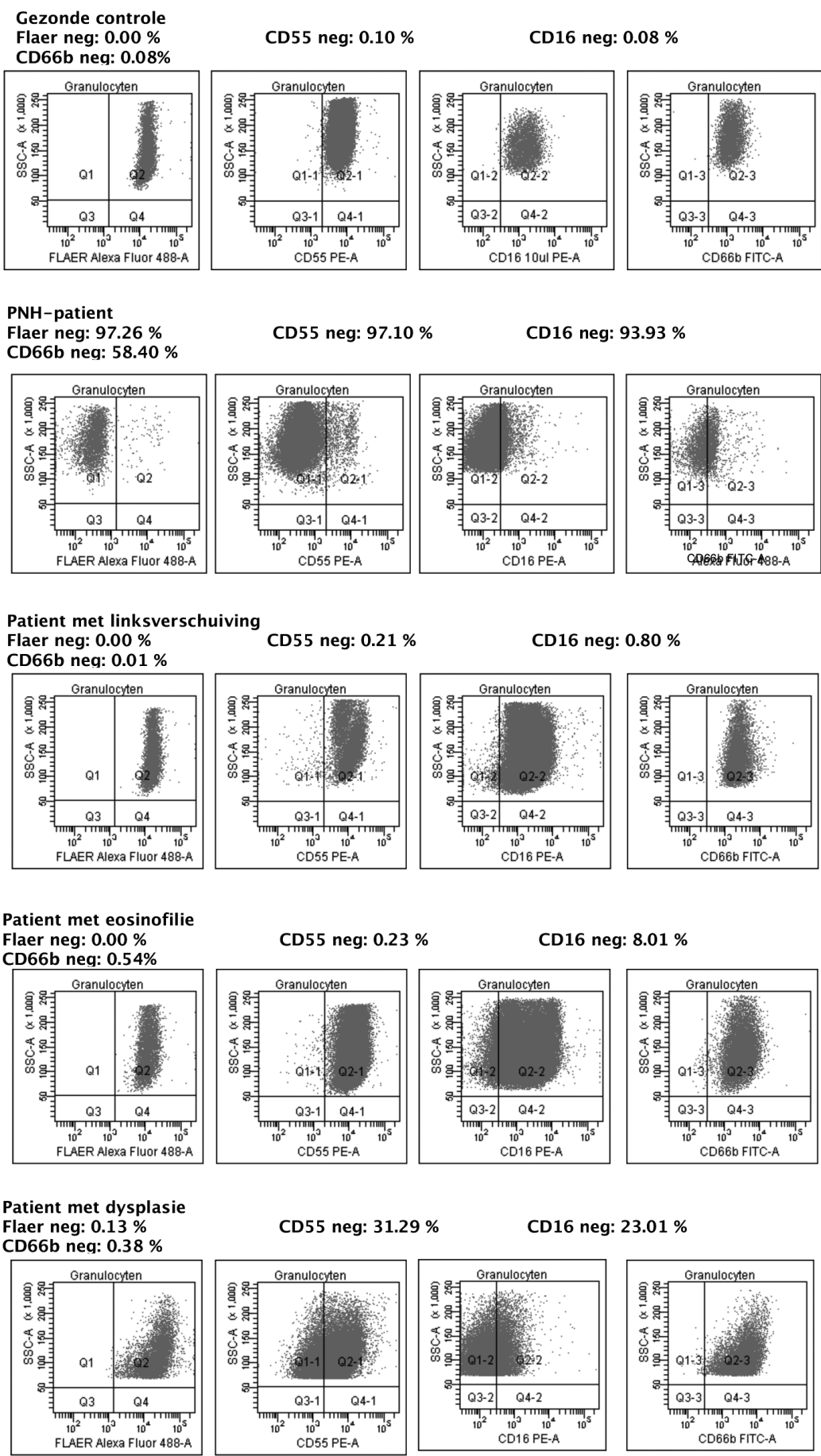
Antigeenexpressies op het celmembraan van granulocyten in gezonde controles, in patiënten met PNH, met dysplasie in de granulocytair reeks, met linksverschuiving als gevolg van een infectie of met eosinofilie zijn met elkaar vergeleken met behulp van meerkleurenflowcytometrie. Hiervoor werd door middel van een celtelling een leukocytenconcentraat in PBS met humaan albumine gemaakt van 5×10^6 leukocyten per ml. De verkregen celsuspensies werden voorafgaand aan de incubatie met antilichaam 15 minuten in het donker bij kamertemperatuur weggezet. Cellen werden geïncubeerd met enerzijds antilichamen gelabeld met Peridinin Chlorophyll Protein cytochrome 5.5 (PerCP-Cy5.5) gericht tegen de niet GPI-verankerde eiwitten CD45 (5 μ L), AlloPhycoCyanin (APC) (BD-Biosciences) gelabeld anti CD11b (10 μ L), en anderzijds met antilichamen gelabeld met PhycoErythrin (PE) (BD-Biosciences) tegen de GPI-verankerde eiwitten CD16 (10 μ L), met PE (BD Pharmingen) gelabeld CD55 (20 μ L), met FluoresceinIsoThioCynaat (FITC) (Sanquin) gelabeld CD66b (10 μ L) en met Alexa Fluor 488 (Protox Biotech) gelabeld anti-FLAER (10 μ L) in een eindvolume van 100 μ L. Vervolgens werden de erythrocyten gelyseerd met FACS-lysing (2 ml 1/10 verdund) door voorzichtig mengen en 10 minuten geïncubeerd in het donker bij kamertemperatuur. Na centrifugatie werd het supernatant afgezogen en werden de cellen 1x gewassen. Cellen werden geresuspendeerd in 200 μ L wasvloeistof. Analyse vond plaats met behulp van een FACS CANTO-2 (BD-Biosciences) waarbij 100.000 leukocyten per monster werden geanalyseerd met een detectiegrens van 0.05% en variatiecoëfficiënt van 10%. Data uitwerking vond plaats met FACSDiva Software (BD Biosciences), waarbij CD45/CD11b positieve granulocyten werden geselecteerd. Binnen deze populatie is gekeken naar het percentage cellen met verlaagde of afwezige expressie van de GPI-verankerde eiwitten.

Resultaten

De flowcytometrie resultaten verkregen met antilichamen tegen CD55, CD16, CD66b en FLAER in perifere bloed van 4 verschillende patiënten en de gezonde controle zijn weergegeven in figuur 1. In de gezonde controle waren alle bloedcellen FLAER positief, terwijl er nauwelijks verlies van CD55 (-0,10%), CD16 (-0,08%) en CD66b (-0,08%) optrad. Bij aanwezigheid van een PNH-kloon trad sterk verminderde expressie van FLAER (-97%), CD55 (-97%), CD16 (-94%), en CD66b (-58%) op.

Afdeling Laboratoriumgeneeskunde, Universitair Medisch Centrum Groningen

E-mail: a.b.mulder@lc.umcg.nl



Figuur 1. Flowcytometrie resultaten van een gezonde controle, en patiënten met PNH, met granulocyttaire voorstadia door linksverschuiving, eosinofilie en granulocyttaire dysplasie. De merker expressie (FLAER, CD55, CD16 of CD66b) is uitgezet op de horizontale as tegen de sideward scatter (celinhoud) op de verticale as.

Bij de patiënt met een linksverschuiving en hierdoor de aanwezigheid van granulocyttaire voorstadia werd verminderde expressie van met name CD16 (-0,8%) gezien, maar geen verlies in FLAER reactiviteit. Bij patiënten met eosinofilie werd een licht verminderde expressie van met name CD16 (-8%) en CD66b (-0,5%) gezien, terwijl alle cellen positief zijn voor FLAER. Bij een patiënt met dysplastische granulocyten werd net als bij PNH een sterk verminderde expressie van CD55 (-71%), CD16 (-23%) en daarnaast een licht verminderde expressie van CD66b (-0,4%) gevonden. De genoemde verminderde expressie in bovenstaande resultaten treedt op bij een deel van de cellen en niet bij de gehele celpopulatie. Onderscheid met PNH was alleen te maken op basis van FLAER, waarin bij dysplasie nauwelijks verlies optrad (-0,1%).

Discussie

Deze studie toont aan dat FLAER een specifieke marker kan zijn voor het aantonen van een PNH-kloon, omdat alleen bij aanwezigheid van PNH cellen een sterk merkerverlies optrad. Wanneer gebruik wordt gemaakt van verlies van GPI verankerde eiwitten voor de diagnose van PNH, treedt mogelijk overlap op met andere ziektebeelden. Bij linksverschuiving met granulocyttaire voorstadia als gevolg van een infectie, bij eosinofilie en bij granulocyttaire dysplasie treedt namelijk net zoals bij PNH in meer of mindere mate verlies op van de GPI verankerde granulocyttaire markers CD55, CD16 en CD66b. Tijdrovende morfologische controle van beenmerg is dan noodzakelijk om een onderscheid te kunnen maken. Bij PNH treedt een sterk verlies van FLAER reactiviteit op, in tegenstelling tot de normale FLAER expressie bij de andere bovengenoemde ziektebeelden.

Conclusie

Het gebruik van FLAER is een specifiekere flowcyto-metrische methode voor het aantonen van de aanwezigheid van PNH. Afwezige reactiviteit met FLAER onderscheidt een PNH-kloon van eosinofielen, granulocyttaire voorstadia en dysplastische granulocyten en maakt op die manier morfologische controle overbodig.

Referenties

1. Socie G, Mary JY, de Gramont A, 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: 573-577.
2. Dunn DE, Tanawattanacharoen P, Bocconi P, Nagakura S, Green SW, Kirby MR, et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria cells in patients with bone marrow failure syndromes. Ann Intern Med. 1999; 131: 401-408.
3. 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.
4. 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.
5. Battiwalla M, Hepgur M, Pan D, McCarthy PL, Ahluwalia MS, Camacho SH, et al. Multiparameter flow cytometry for the diagnosis and monitoring of small GPI-deficient cellular populations. Cytometry B Clin Cytom. 2010; 78: 348-356.
6. Madkaikar M, Gupta M, Jijina F, Ghosh K. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: diagnostic tests, advantages, & limitations. Eur J Haematol. 2009; 83: 503-511.