

# Иммунофенотипическая диагностика ПНГ

Гриневич В.Ю.

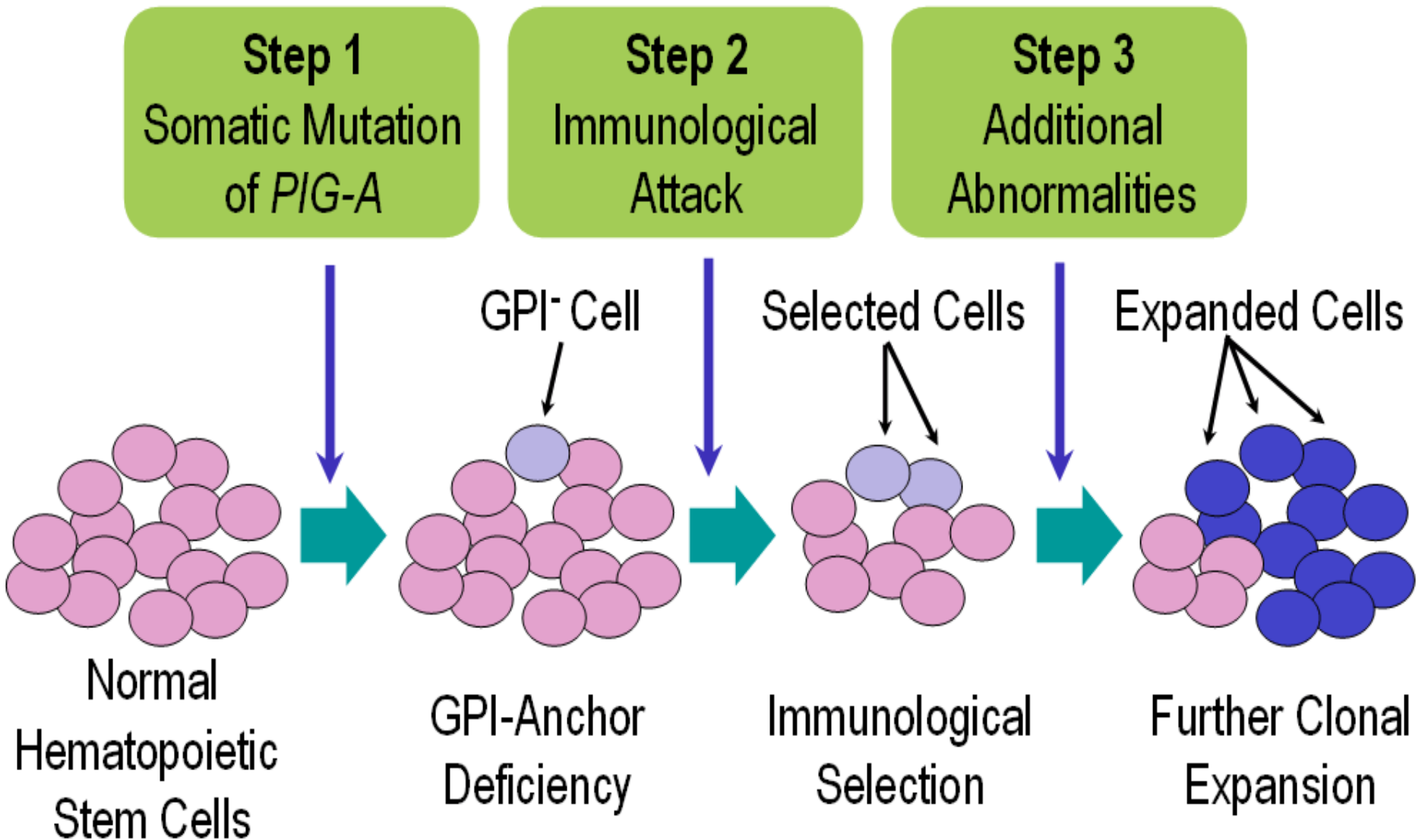
Республиканский центр гематологии и пересадки костного  
мозга

УЗ «9-я городская клиническая больница», г. Минск

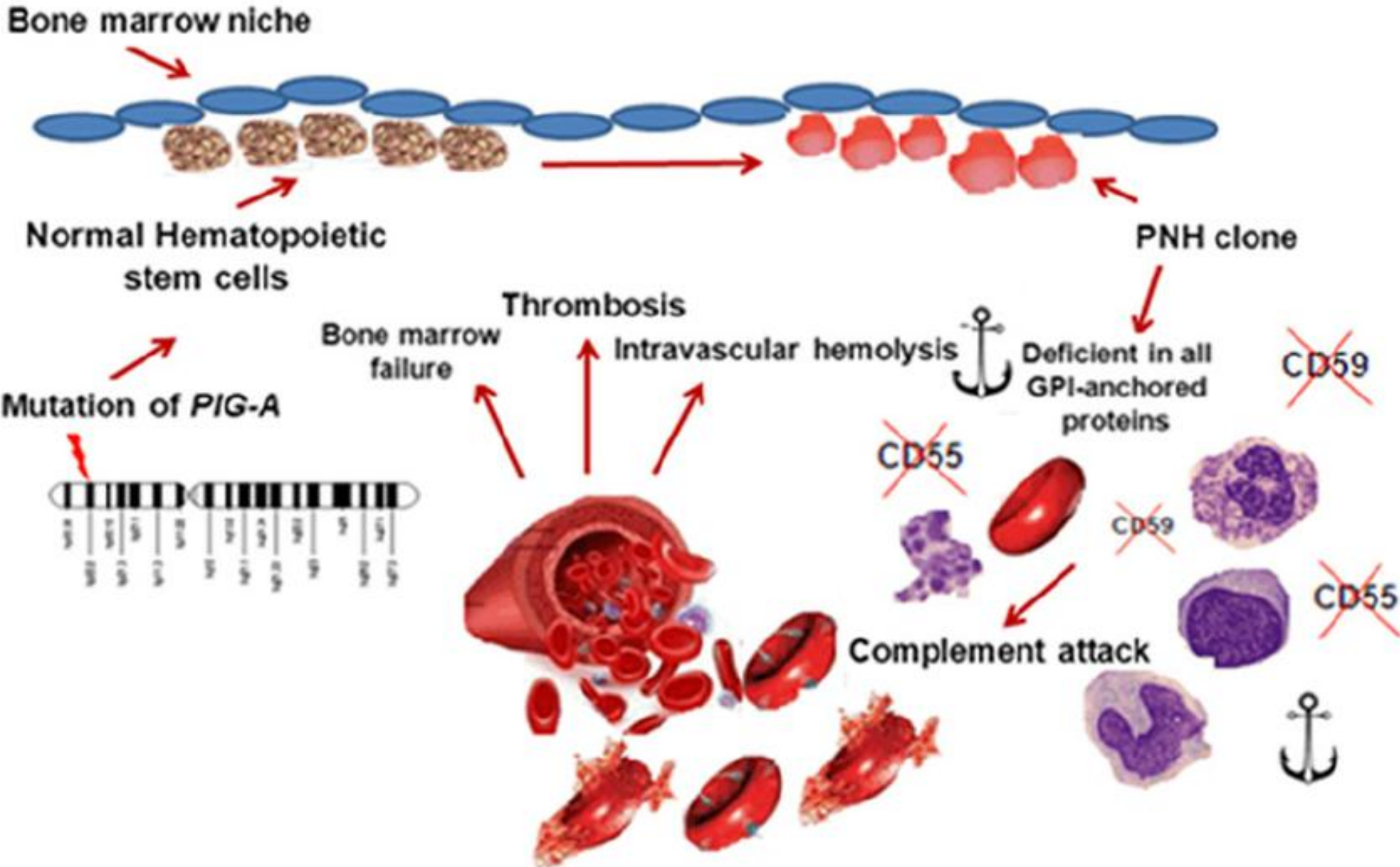
# Пароксизмальная ночная гемоглибинурия (PNH)

- крайне редкое, прогрессирующее заболевание крови
- последствие клональной экспансии одной или более гемопоэтических стволовых клеток, которые имеют приобретенную соматическую мутацию PIG-A гена, кодирующем синтез GPI-якоря
- дефицит GPI-заякоренных белков приводит к комплемент-зависимому внутрисосудистому гемолизу с гемоглибинурией и развитием анемии

# Эволюция ПНГ-клона



# Патогенез ПНГ



# Пароксизмальная ночная гемоглобинурия

- Пароксизмальная<sup>1</sup>:

Даже при отсутствии симптомов, продолжается разрушительный и неконтролируемый гемолиз

- Ночная<sup>2</sup>:

Гемолиз при ПНГ происходит непрерывно, 24 часа в сутки, а не только ночью (интенсивность бывает разной)

- Гемоглобинурия:

Наблюдается только у 1/4 пациентов

1. Rother R.P. et al. Nat Biotechnol 2007; 25, 11: 1256-64

2. Parker C. et al. Blood 2005; 106: 3699-709

# Основные причины для определения ПНГ-клона



- 35% пациентов с ПНГ умирают в течение первых 5 лет с момента установления диагноза
- Ранняя и своевременная диагностика может улучшить исход у пациентов с ПНГ и недостаточностью костного мозга
- Наличие ПНГ-клона является независимым предиктором хорошего ответа на иммуносупрессивную терапию при АА и МДС



# Диагностика ПНГ

# Когда необходимо проводить скрининг на ПНГ?



- Гемоглобинурия и признаки внутрисосудистого гемолиза в сочетании с тромбозами, лейко- и/или тромбоцитопенией
- Кумбс-негативная гемолитическая анемия
- Тромбозы с нетипичной локализацией
- Костномозговая недостаточность
- Доказанная или предполагаемая апластическая анемия
- Рефрактерная цитопения с однолинейной дисплазией
- Другие цитопении неясной этиологии



# Проточная цитометрия



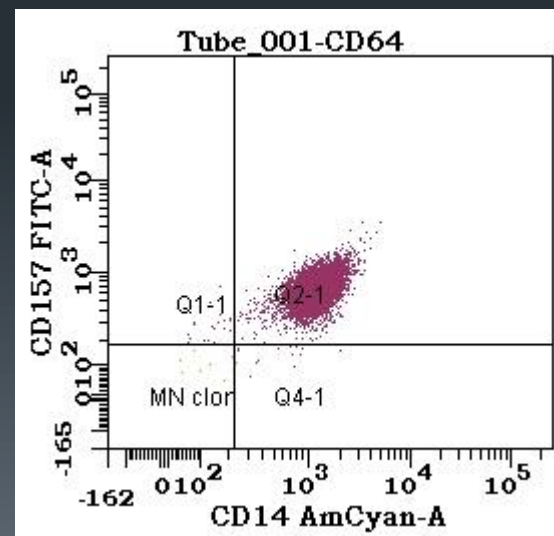
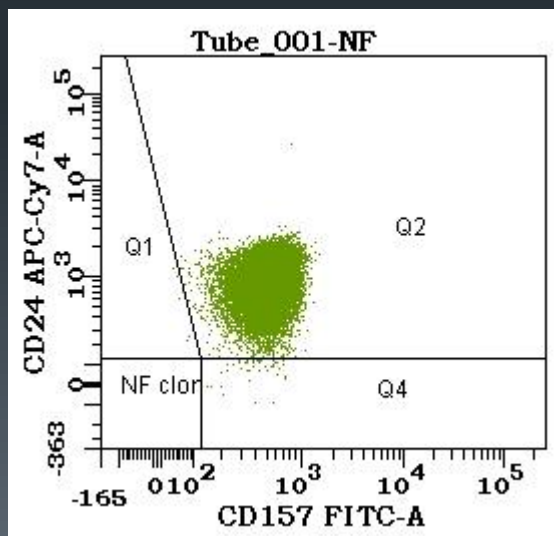
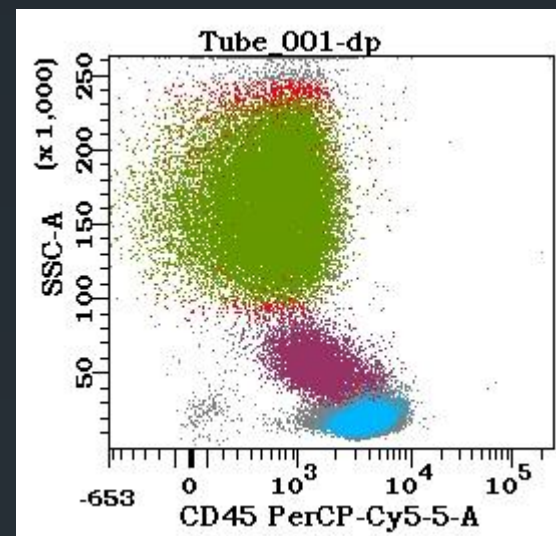
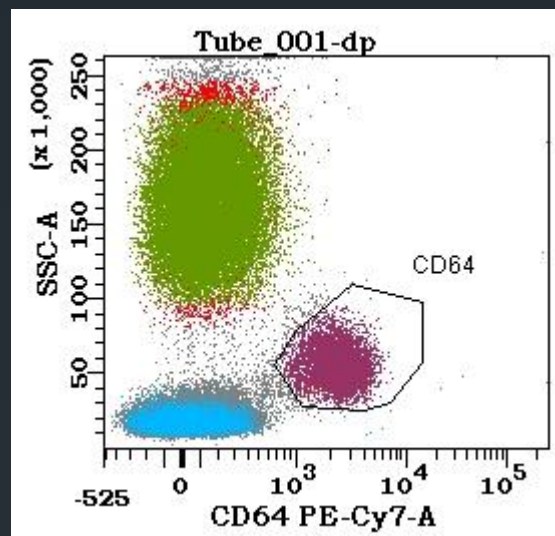
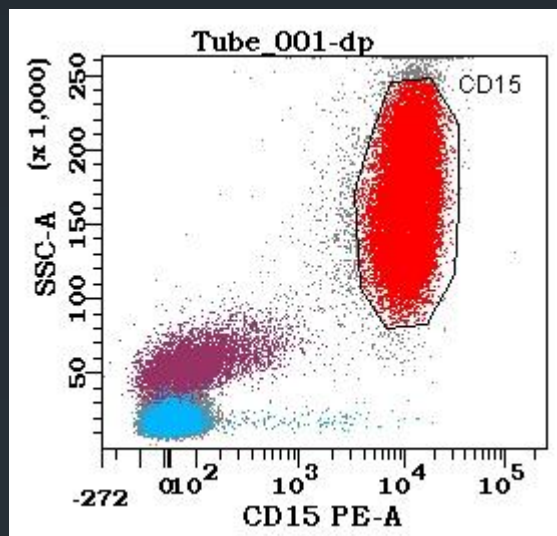
- «Золотой стандарт» диагностики и мониторинга ПНГ
- Позволяет провести точную идентификацию клеток с дефицитом GPI-связанных белков среди эритроцитов/ моноцитов/ гранулоцитов
- Размер клона определяется количеством клеток с ПНГ-фенотипом

# Преаналитическая подготовка

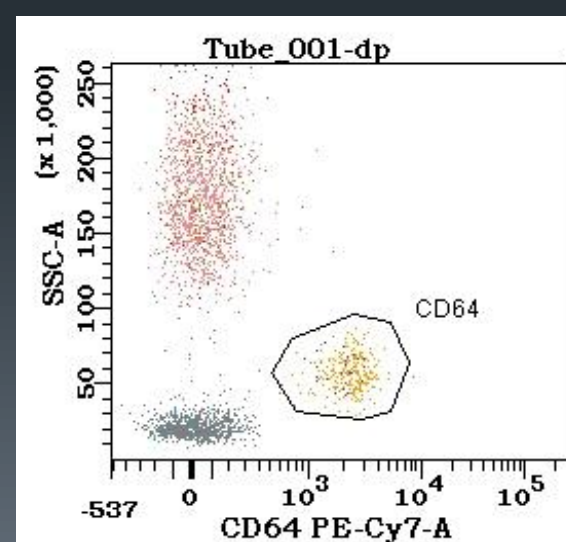
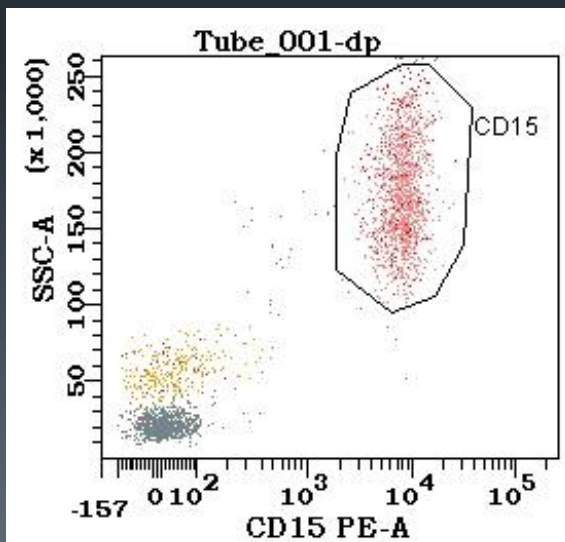
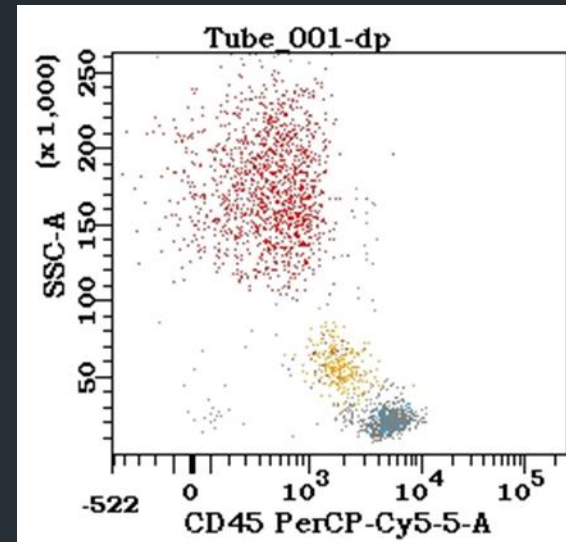
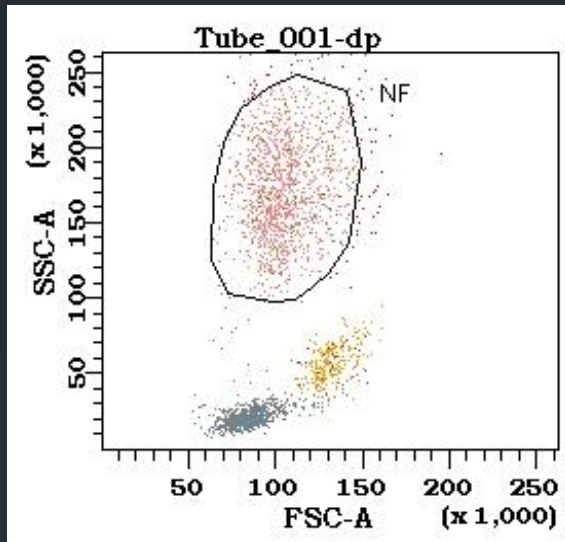
## Требования к образцам

- Материал: периферическая кровь
- Антикоагулянт: EDTA или гепарин
- Объем исследуемого образца: 1-3 mL
- Исследование гранулоцитов проводится в течение 48 часов, эритроцитов – в течение 7 дней
- Условия хранения: 4°C после 24 часов

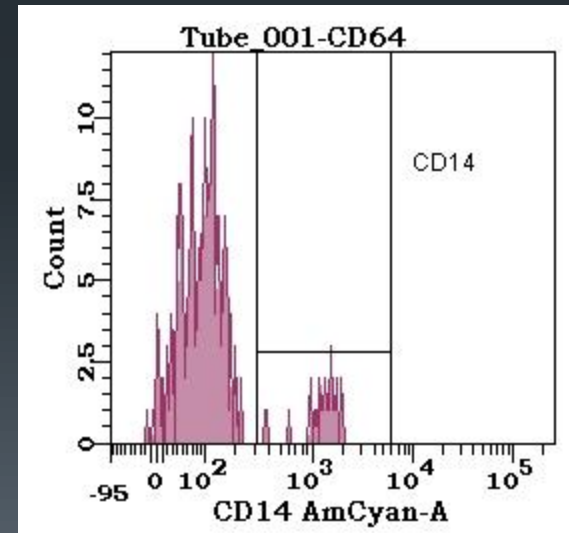
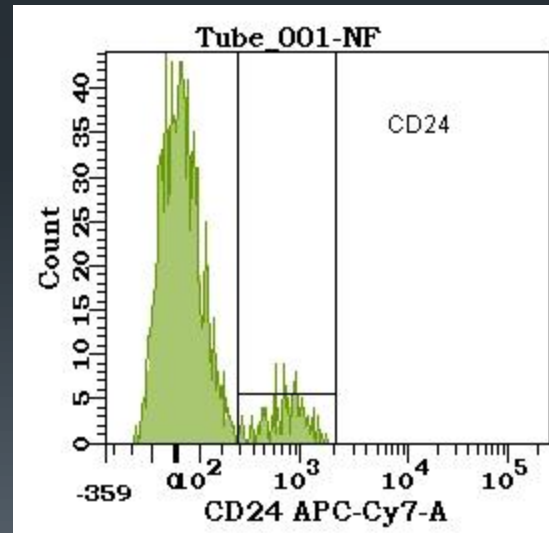
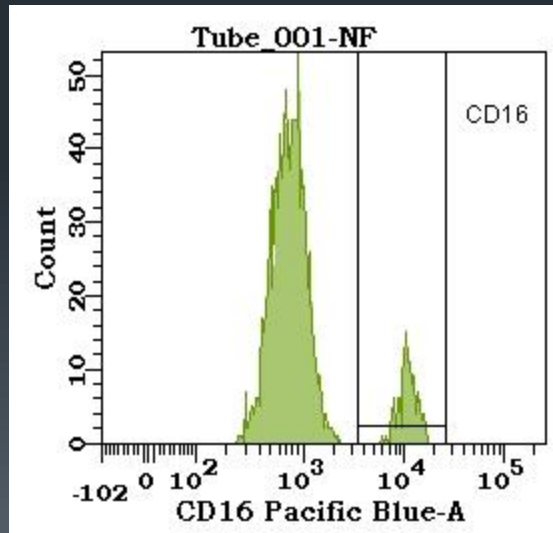
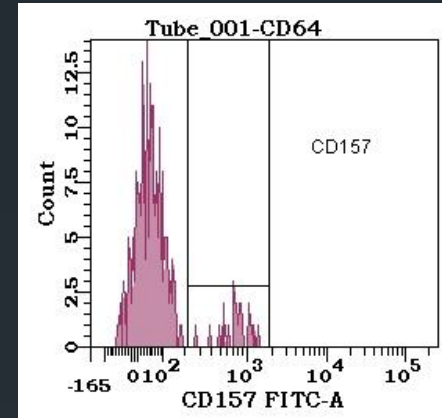
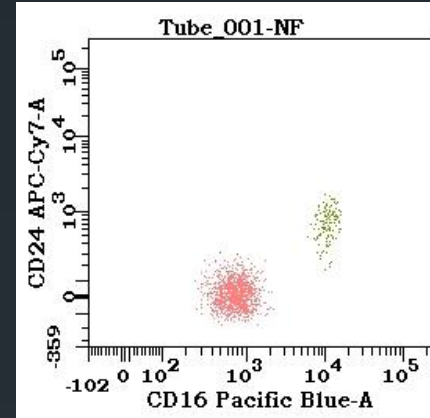
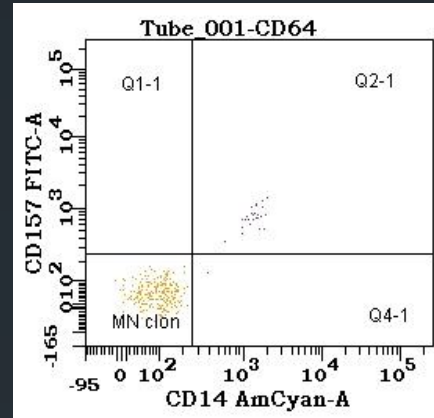
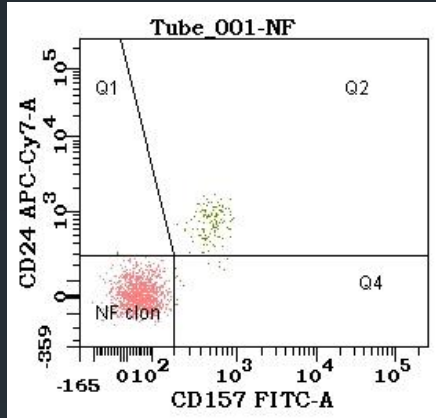
# Гейтирование моноцитов и гранулоцитов. Нормальная кровь



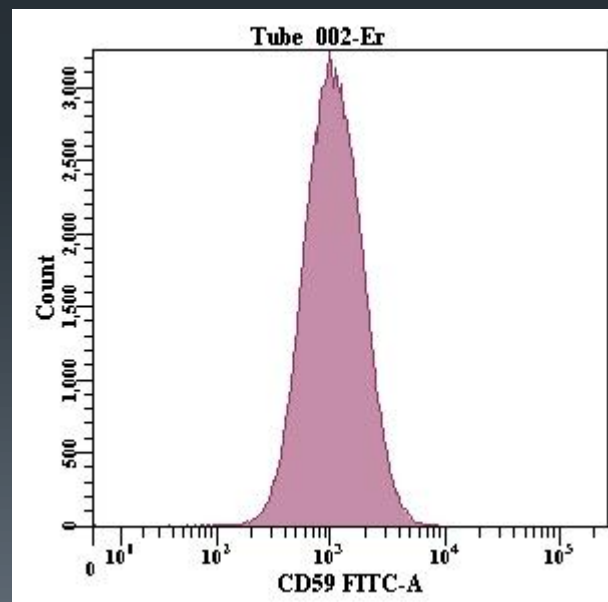
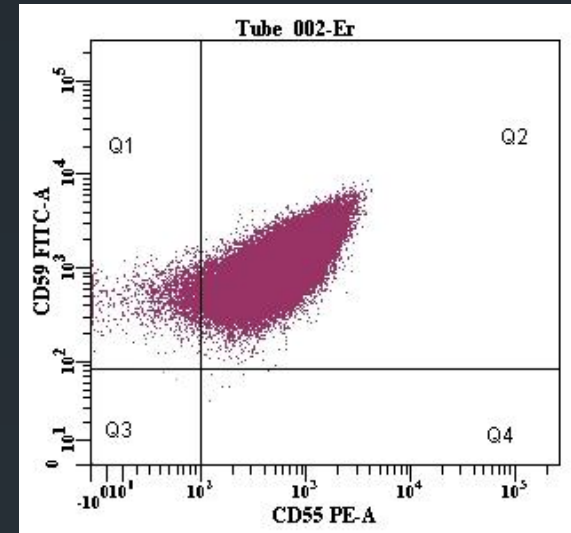
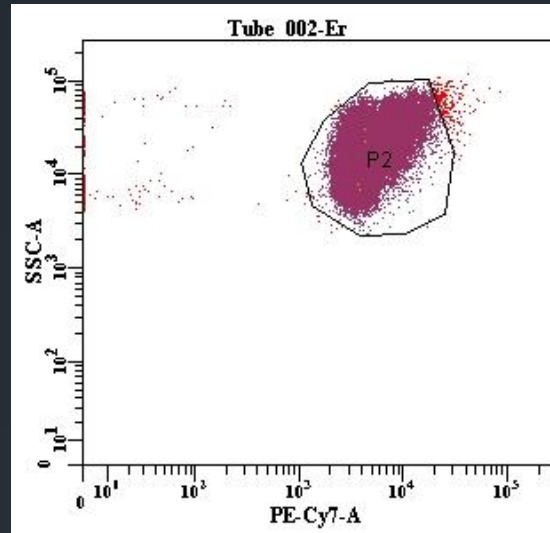
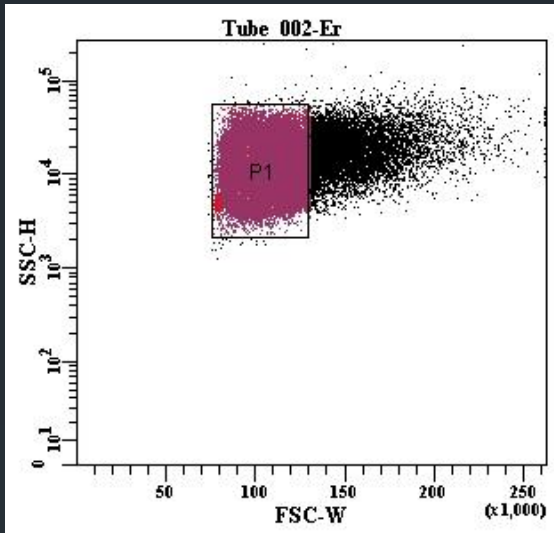
# Гейтирование гранулоцитов и моноцитов. ПНГ



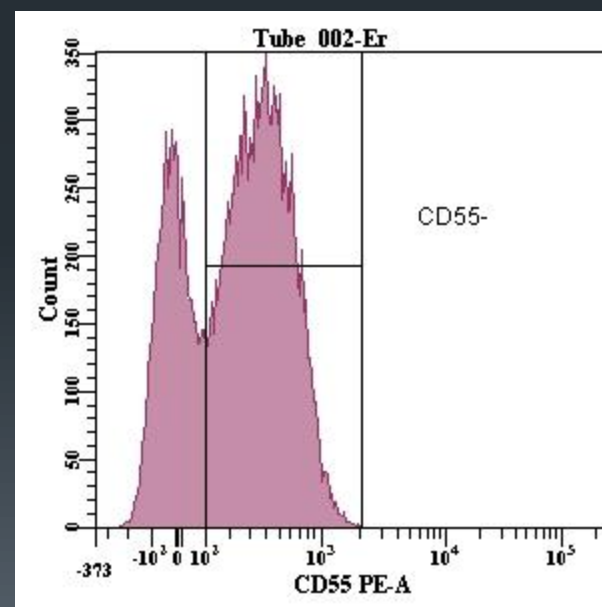
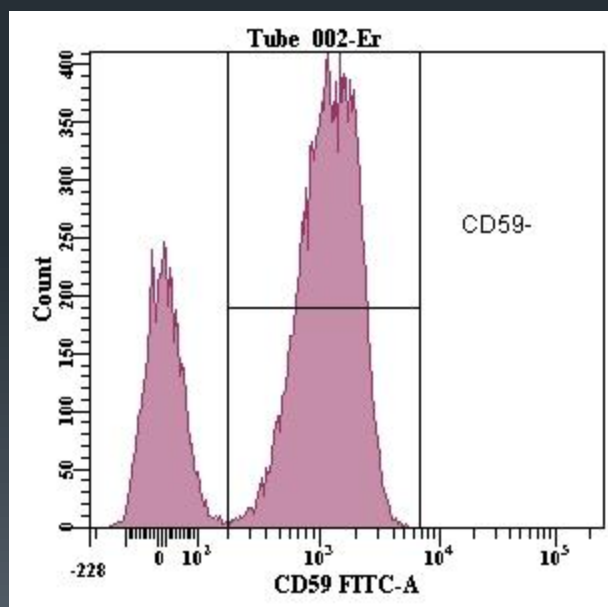
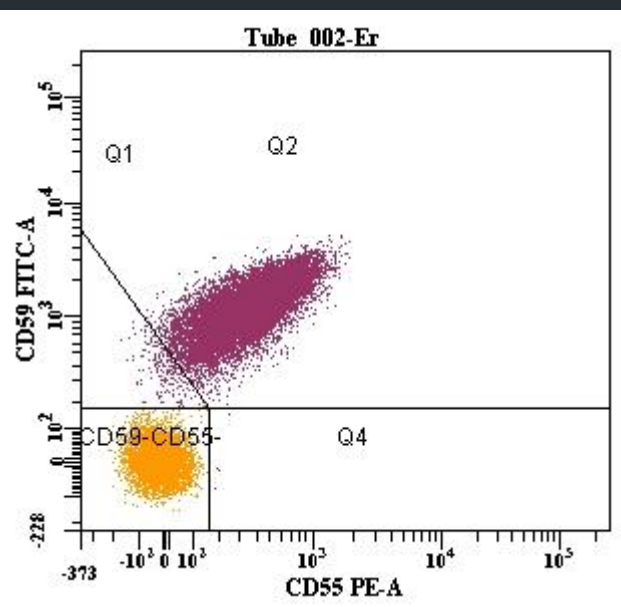
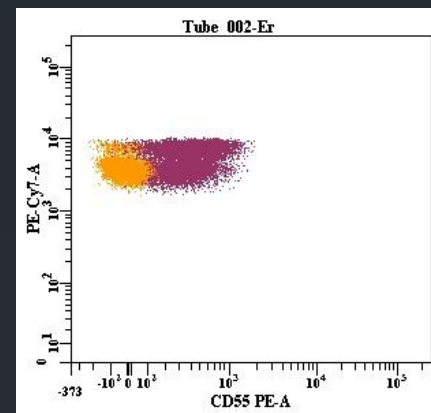
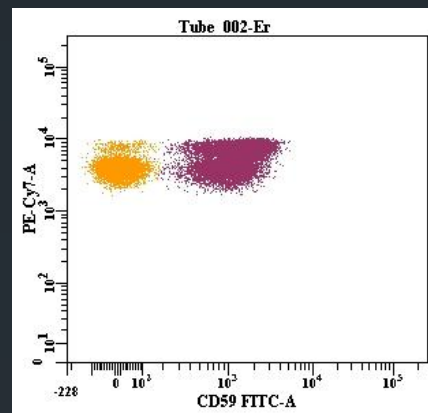
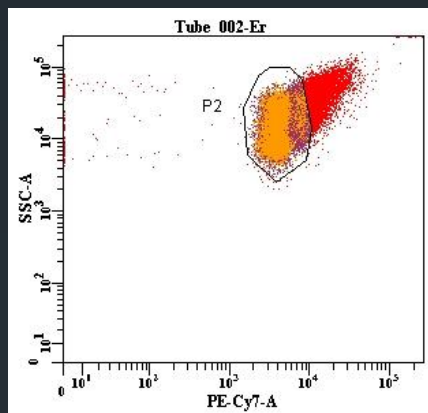
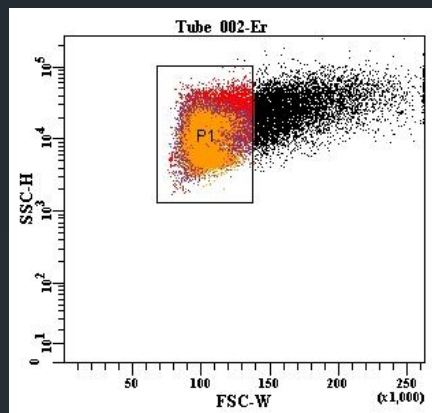
# Клон ПНГ



# Исследование эритроцитов. Норма



# Исследование эритроцитов при ПНГ



# RBC assay-recommended panel for BC and BD platforms

- CD 59-PE (GPI-linked for RBC)
- CD 235a-FITC (gating on RBC)
- CD 55 PE – not recommended



# Возможная панель



FITC	PE	PerCP-CY5.5	PE-Cy7	APC	APC-Cy7	Pacific Blue	AmCyan
CD157	CD15	CD45	CD64	CD19	CD24	CD16	CD14

# Стандартизированная терминология

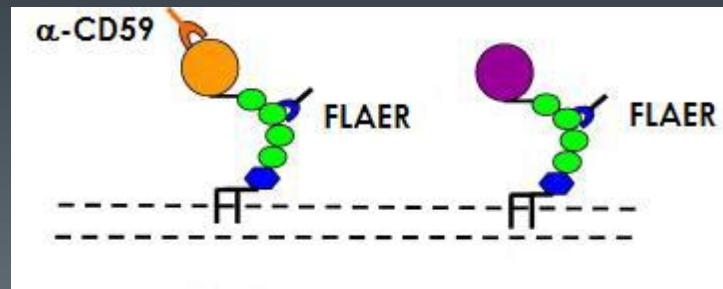


ПНГ популяция	Тип
$> 1\%$	ПНГ клон
$0.1 - 1\%$	Минорная популяция ПНГ-клеток
$\leq 0.1\%$	Единичные клетки с GPI-недостаточностью

**Важно!** Методом проточной цитометрии определяется только наличие клона ПНГ, но не ставится диагноз!!!

# Fluorescent AERolysin (FLAER)

- FLAER – это неактивный бактериальный токсин (Aerolysin) от *Aeromonas hydrophila*
- Связывается непосредственно с GPI-якорем на мембране клеток
- Наиболее чувствительный метод определения размера ПНГ-клона
- Используется в сочетании с одним из линейных антигенов:
  - для нейтрофилов **CD24 + FLAER**
  - для моноцитов **CD14 + FLAER**
  - для нейтрофилов и моноцитов **CD157 + FLAER**



# Recommended Antibody Panel for PNH

## WBC Testing: BC platform

4-color Granulocytes: **FLAER** **CD24-PE** **CD15-PC5** **CD45-PC7**  
 4-Color Monocytes (Reflex): **FLAER** **CD14-PE** **CD64-PC5** **CD45-PC7**  
 5-Color Grans and Monos: **FLAER** **CD157-PE** **CD64-ECD** **CD15-PC5** **CD45-PC7**

Target cells	Antibodies and Conjugates	Purpose	Clone (Vendor)
<b>WBC</b>	<b>FLAER-Alexa488</b>	<b>GPI-linked (Grans and Monos)</b>	<b>NA (Cedarlane)</b>
	<b>CD24-PE</b>	<b>GPI-linked (Grans)</b>	<b>SN3 (eBio), ALB9 (BC)</b>
	<b>CD14-PE</b>	<b>GPI-linked (Monos)</b>	<b>61D3 (eBio), RMO52 (BC) TUK4 (Invitrogen)</b>
	<b>CD157-PE</b>	<b>GPI-linked (Grans and Monos)</b>	<b>SY11B5 (eBio)</b>
	<b>CD64-PC5</b> <b>CD64-ECD for 5C</b>	<b>Gating on Monocytes</b> <b>Gating on Monocytes</b>	<b>22 (BC)</b> <b>22 (BC)</b>
	<b>CD15-PC5</b>	<b>Gating on Granulocytes</b>	<b>80H5 (BC)</b>
	<b>CD45-PC7</b>	<b>Debris exclusion and pattern recognition</b>	<b>J33 (BC)</b>

# Recommended Antibody Panel for PNH WBC Testing: BD platform

4-color Granulocytes:	FLAER	CD24-PE	CD45-PerCP	CD15-APC	
4-Color Monocytes (Reflex):	FLAER	CD14-PE	CD45-PerCP	CD64-APC	
5-Color Grans and Monos <sup>1</sup> :	FLAER	CD157-PE	CD45-PerCP	CD64-APC	CD15-eF450
5-Color Grans and Monos <sup>2</sup> :	FLAER	CD157-PE	CD45-APC-H7	CD64-APC	CD15-PerCP-eF710

Target cells	Antibodies and Conjugates	Purpose	Clone (Vendor)
<b>WBC</b>	FLAER-Alexa488	GPI-linked	NA (Cedarlane)
	CD24-PE	GPI-linked (Grans)	SN3 (eBio), ML5 (BD)
	CD14-PE	GPI-linked (Monos)	61D3 (eBio), MOP9 (BD) TUK4 (Invitrogen)
	CD157-PE	GPI-linked (Grans and Monos)	SY11B5 (eBio)
	CD45-PerCP	Debris exclusion and pattern recognition	2D1 (BD)
	CD15-APC	Gating for Granulocytes	HI98 (BD)
	CD64-APC	Gating for Monocytes 10.1	10.1 (BD, eBio)
	CD15-eFluor 450 (5C) CD15-v450 (5C) CD15-PerCP-eFluor710	Gating for Granulocytes	MMA (eBio) MMA (BD)

Slide courtesy A Illingworth and DR Sutherland

1. For 3-laser Canto II

2. For 2-laser Canto

Спасибо за внимание!

