

Paroxysmal nokturn hemoglobinuri (PNH)

**Nationella rekommendationer för diagnostik,
behandling och uppföljning**

2017-12-01 --- 2019-12-01

Svenska PNH-gruppen

Jonas Alsenhed, Jan Astermark, Christian Kjellander, Martin Höglund, Peter Johansson (ordförande) samt Maria Liljeholm

Innehållsförteckning

Förord	3
Introduktion/Patofysiologi	4
<i>Klinisk bild</i>	
Anemi	5
Trombosbenägenhet	5
Njurpåverkan	5
Pulmonell hypertension	6
Övriga manifestationer	6
<i>Diagnostik</i>	
Vilka bör undersökas med flödescytometri	7
Flödescytometrisk diagnostik	8
Övrig utredning	8
<i>Behandling</i>	
Antikoagulantia	9
Erytrocyttransfusioner	9
Järn/folat	10
Allogen stamcellstransplantation	10
Antikroppsbehandling	10
Indikationer för eculizumabbehandling	11
Meningokockvaccination	11
Graviditet	11
Prognos	12
Uppföljning	13
Referenser	14-17
Bilaga 1 Flödescytometrisk undersökning	18
Bilaga 2 PNH-registret	18

Förord.

Svenska PNH-gruppen bildades juni 2010 efter initiativ och på uppdrag av Svensk Förening för Hematologi (SFH). Gruppen består av en PNH-intresserad hematolog från varje sjukvårdsregion. Vi har även vid behov adjungerad laboratoriemedicinare. Gruppens huvuduppgift är att utarbeta nationella riktlinjer för diagnostik, behandling och uppföljning av patienter med PNH. Därtill har den en rådgivande funktion vid kliniska frågeställningar kring PNH-patienter, speciellt vad gäller ställningstagande till behandling med eculizumab (Soliris®). Målet är att förbättra omhändertagande av patienter med PNH, i detta ingår att sträva efter en likartad nationell bedömning i handläggningen av dessa patienter.

På grund av PNH-sjukdomens sällsynthet är evidensgraden för rekommendationer om behandling ofta låg.

Vårt riktlinjedokument uppfyller de minimikrav på struktur och process som sammanfattas av SFH:s policydokument "Regelverk för diagnosgruppernas arbete med kvalitetsfrågor inom hematologi" (www.sfhem.se/filarkiv).

Nyheter 2017-12-01

Mot bakgrund av eculizumabs fortsatt mycket höga kostnad har PNH-gruppen haft förnyade diskussioner med SKL/NT-rådet avseende indikationer för behandling med eculizumab. I dessa diskussioner har SKL/NT-rådet att förskrivning av eculizumab kräver att det föreligger ett "oundgängligt behov av sådan behandling". PNH-gruppen tolkar "oundgängligt behov" som att utebliven behandling på kort eller lång sikt kan leda till livshotande komplikationer.

Detta innebär i praktiken en ytterligare begränsning av indikationerna för eculizumabbehandling.

Inklusion i det internationella PNH-registret har begränsats vilket innebär att flera mindre och ej aktiva sites har stängts ner och inga fler öppnas. Av detta skäl har vi i nuläget i nuläget en mer begränsad uppföljning av de svenska patienterna.

Nytt är även att denna version har granskats med avseende på användarvänlighet av två PNH-intresserade men från Svenska PNH-gruppen fristående kollegor; överläkare Max Flogegård, hematologisektionen, Medicinkliniken, Falun och överläkare Emma Ölander, hematologisektionen, Medicinkliniken, Sundsvall.

Potentiella bindningar och jävsförhållanden

Vårt arbete med dessa riktlinjer har bedrivits utan ekonomiskt stöd från läkemedelsindustrin. Potentiella bindningar och jävsförhållanden gällande nedanstående för detta riktlinjedokument huvudansvariga personer finns på <http://www.sfhem.se/Verksamhet/Disclosures>

Svenska PNH-gruppen

Jonas Alsenhed, Västerrik (jonas.alsenhed@ltkalmars.se)

Jan Astermark, Malmö/Lund (jan.astermark@med.lu.se)

Christian Kjellander, Stockholm (christian.kjellander@sll.se)

Martin Höglund, Uppsala (martin.hoglund@medsci.uu.se)

Peter Johansson, Uddevalla/Göteborg (peter.l.johansson@vgregion.se), ordförande

Maria Liljeholm, Umeå (maria.liljeholm@vll.se)

Introduktion

Paroxysmal nokturn hemoglobinuri (PNH) är en allvarlig, icke-malign klonal stamcellssjukdom som kännetecknas av kronisk intravasal hemolys, trombosbenägenhet samt i vissa fall benmargssvikt (Brodsky, 2009; Hill, DeZern, Kinoshita & Brodsky, 2017; Parker et al., 2005; Parker, 2002). Diagnosen ställs i alla åldrar med en medianålder på drygt 30 år och sjukdomen drabbar båda könen i lika omfattning (de Latour et al., 2008; Socie et al., 1996). Sjukdomen medför, främst pga allvarliga tromboser men även pga benmargssvikt och njurpåverkan, en ökad mortalitet (Hillmen et al 1995, Socie et al 1996). Svårare former av PNH ger ofta avsevärt sänkt livskvalitet (Hill et al 2005).

Våra kunskaper om sjukdomens prevalens och incidens är begränsade. Hill och medarbetare fann en incidens på 1,3/miljon invånare och år samt en prevalens på 15,9/miljon invånare i Yorkshire (Hill, 2006). Cirka hälften av dessa patienter hade en PNH-klon som var >25%. I en nordisk sammanställning finner man vid undersökning av PNH-kloner (0.1-100%) en incidens av 2,33 per år och miljon invånare. Av dessa hade 17% en klon större än 50% motsvarande ca 0,4 per år och miljon invånare (under publikation).

Hemolytisk och trombotisk PNH räknas till klassisk PNH. Övriga två undergrupper är dels PNH associerad till annan benmargssjukdom ffa aplastisk anemi eller myelodysplastiskt syndrom dels subklinisk PNH med en mycket liten klon utan tecken till hemolys. Detta dokument fokuserar på klassisk PNH. Vi uppskattar prevalensen av klassisk PNH i Sverige till omkring 30-40 patienter.

Patofysiologi

Komplementinhibitorer på den normala erytrocytens yta skyddar cellen mot komplement-attacker. PNH orsakas av en mutation av genen *PIG-A*, som finns på X-kromosomen. *PIG-A* kodar för ett protein (fosfatidylinositolglykan komplementationsklass A), som är ett av stegen för att producera det så kallade GPI-ankaret. Ankarets funktion är att göra det möjligt för ungefär 30 olika proteiner att förankras och fästa till cellernas yta. Mutationen har uppstått i en mycket primitiv blodcell (Miyata et al., 1994). *PIG-A* mutationen resulterar i brist eller total avsaknad av GPI-ankarproteiner på alla blodceller. Avsaknad eller brist på GPI-ankarproteinerna CD55 och CD59 gör i sin tur PNH-erytrocyter känsliga för komplementmedierad destruktion (Brodsky, 2008).

Intravasal lysis av erytrocyterna ger fritt hemoglobin i plasma vilket binds irreversibelt till kväveoxid (NO) (Brodsky, 2008). Man har funnit en 15 ggr ökad NO-konsumtion hos PNH-patienter jämfört med friska kontroller (Hill et al., 2012). Den låga NO-koncentrationen ger ökad tonus i glatt muskulatur med vasokonstriktion vilket leder till sammandragning i tarmen (buksmärtor), pulmonell hypertension, erektil dysfunktion, spasm i esofagus (sväljningssvårigheter) samt även ökad aktivering av trombocyter och nedsatt fibrinolys. Det sistnämnda ökar risken för tromboser (Brodsky, 2008; Moyo, Mukhina, Garrett & Brodsky, 2004; Rother, Bell, Hillmen & Gladwin, 2005).

Cytopenier i en eller flera cellinjer ses hos majoriteten av patienterna. Orsaken till benmargssvikten är oklar.

Klinisk bild

Klassisk PNH är en kronisk sjukdom med i typiska fall över tiden relativt oförändrad storlek av PNH-klonen (mätt i granulocytpopulationen). Symtomens svårighetsgrad korrelerar ofta, men inte alltid, till PNH-klonens storlek. Hos vissa patienter har sjukdomen ett tydligt intermitterent förlopp med svåra skov följt av längre perioder med låg sjukdomsaktivitet. PNH-

skov kan utlösas av infektioner, trauma samt är vanligt under senare delen av graviditet (se separat avsnitt) (Hill, Richards & Hillmen, 2007)

De vanligaste kliniska manifestationerna vid klassisk PNH är hemolytisk anemi, tromboser och benmärgssvikt. I sjukdomsbilden kan ingå multiorganpåverkan med buksmärtor, dysfagi, erektil dysfunktion, pulmonell hypertension med högerkammarsvikt och njurinsufficiens. (Rother, Bell, Hillmen & Gladwin, 2005). Patienterna har inte sällan en uttalad kronisk trötthet som endast delvis förklaras av anemin, men däremot tycks korrelera till graden av intravasal hemolys.

I en publicerad sammanställning från PNH-gruppen i Leeds, sågs ingen skillnad i mortalitet mellan PNH-patienter som behandlats med eculizumab (n=79) jämfört med en kön- och åldersmatchad normalpopulation, och var signifikant bättre än 30 likartade patienter med PNH behandlade under den 7-årsperiod som föregick introduktionen av eculizumab (Kelly, *et al* 2011).

Anemi

Patienterna har oftast en transfusionskrävande anemi pga främst intravasal hemolys. Den mörka urinen beror på hemoglobinurin vilken är sekundär till den intravaskulära hemolysen, vilken är kronisk men kan variera i intensitet över tid (Parker *et al.*, 2005). Ibland ses skov i anslutning till infektioner vilket beror på allmän komplementaktivering. Järnbrist (pga hemoglobinuri), folsyrabrist och benmärgspåverkan kan ibland bidra till anemin. Begreppet ”nokturn” härrör mer från att morgonurinen är koncentrerad och därför blir mer mörkfärgad pga av hemolysen. Även eculizumabbehandlade patienter har oftast en måttlig anemi pga kvarstående extravasal hemolys och/eller benmärgspåverkan.

Trombosbenägenhet

Insjuknandet i trombosjukdom är ett betydande kliniskt problem vid PNH och 30-40% av patienterna har vid långtidsuppföljning drabbats av en eller flera kliniska tromboser (Griffin & Munir, 2017; Hall, Richards & Hillmen, 2003; Hillmen, Lewis, Bessler, Luzzatto & Dacie, 1995; Moyo, Mukhina, Garrett & Brodsky, 2004; Socie *et al.*, 1996). I cirka 10% av fallen utgör det tromboemboliska insjuknandet debutsymtom på sjukdomen (de Latour *et al.*, 2008; Parker *et al.*, 2005) och trombos som initialsymtom har ett prognostiskt prediktivt värde och ökar den relativa mortalitetsrisken 5-15 gånger. Trombosrisken ökar med klonstorleken, men tromboser ses även vid mindre kloner. Venösa tromboser är betydligt vanligare än arteriella. Sannolikt förekommer dock vid sidan av symtomgivande tromboser även subkliniska varianter som på sikt kan ge svåra organskador (Hill *et al.*, 2012). Spontana tromboser med ovanliga lokaliseringer ska leda till misstanke om PNH. Framför allt kännetecknas patienter med PNH av tromboser i intraabdominella och cerebrala kärl och inbegriper bland annat levernära tromboser som vid Budd-Chiaris syndrom, sinus sagittalis och cavernosus tromboser eller andra atypiska lokaliseringer på både ven- och artärsidan som kan ge svårtolkade okarakteristiska symtom.

Orsaken till trombosbildningen är sannolikt multifaktoriell och inkluderar bl a fritt hemoglobin med ökad NO-konsumtion, bildandet av prokoagulant mikropartiklar (Cappellini, 2007) och defekt fibrinolys samt brist på GPI-bundna proteiner (Sloand *et al.*, 2008).

Njurpåverkan

Njurpåverkan är en välkänd om än mindre vanlig komplikation till PNH. Den kliniska bilden spänner mellan den dramatiska akuta njursvikten, som adekvat behandlad oftast är i det

närmaste reversibel (Chow, Lai, Wang, Chan, Tang & Li, 2001), till en mer långsam utveckling av kronisk njursvikt. I 8 till 18 % av PNH-relaterad död har njurinsufficiens rapporterats vara den bidragande orsaken (Nishimura et al 2004). Hillmen et al (2010) observerade en nedsatt njurfunktion/tecken på njurskada hos 65 % av patienter i en stor PNH kohort (n=195) och 21 % hade en mer avancerad njurskada med en glomerulär filtrations hastighet ≤ 60 ml/min/1.73 m². I en nyligen publicerad rapport från det internationella PNH-registret baserat på 1610 patienter och en mediantid på 4.6 års sjukdomsduration hade 14% anamnes på nedsatt njurfunktion (Schrezenmeier et al., 2014).

Mekanismerna bakom njurskadan, som i de flesta fall inte är kliniskt uppenbar, är flera. Fritt hemoglobin i plasma filtreras i njurglomeruli, hemoglobindimerer resorberas i de proximala tubuli och bryts ned. Järnet ansamlas i proximiala tubulis epitel och kan upptäckas som hemosiderin i urinen hos nästan alla PNH patienter. Hemosiderin i njurarna (barken) kan visualiseras med magnetkamera (Mathieu, Rahmouni, Villeneuve, Anglade, Rochant & Vasile, 1995). Vid massiv hemolys (ofta inducerad av infektion) kan hemoglobin koncentrationen i det tubulära filtratet bli så hög att akut njursvikt (tubulointerstitiell inflammation) uppstår. Enstaka patienter kan alltså debutera med akut njursvikt (akut tubulär nekros pga massiv hemoglobinuri). Här är tidig diagnos av central betydelse för att förhindra sjukdomsprogress och irreversibla njurskador. Tillståndet kan liknas vid akut njursvikt pga myoglobinuri orsakad av rhabdomyolys. Andra faktorer som rapporterats bidra till en gradvis försämrad njurfunktion är mikrotrombotisering samt utveckling av en interstitiell fibros. Övriga väl kända komplikationer som bidrar till njurinsufficiens hos dessa patienter är urinvägsinfektioner (inkluderande kroniska pyelonefritter) och njurvenstromboser.

Fram till introduktionen av eculizumab stod endast symptomatisk behandling till buds för behandling av patienter med en kronisk njursvikt. I studien av Hillmen och medarbetare (2010) sågs en tydlig och snabb förbättring av njurfunktionen hos transfusionskrävande PNH patienter efter insättande av eculizumab. Denna effekt kvarstod under minst 18 månaders behandling och var mest uttalad hos patienter med en måttligt försämrad njurfunktion. En förklaring kan vara minskad hemosideros i njurarna efter behandling med eculizumab (Risitano et al., 2012).

Pulmonell hypertension

Pulmonell hypertension med mikrotrombotisering i lungkärlen beskrevs vid PNH för drygt 25 år sedan (Heller, Grinberg, Lencioni, Molina & Roncoroni, 1992). Höga nivåer av fritt hemoglobin leder till en ökad endogen NO-konsumtion. Denna är i sin tur kopplad till en störd reglering av glatt muskulatur och endotel. Vaskulopatin leder till en ökad kärlresistens och potentiellt till pulmonell hypertension (Hill et al., 2010; Rother, Bell, Hillmen & Gladwin, 2005). Patienter med klassisk PNH rapporterar i hög utsträckning andfåddhet (i vissa studier >60%) som oftast är av måttlig eller svår grad (Meyers G & Uranga M, 2007). Sjuttiotre patienter av totalt 87 patienter i den placebo-kontrollerade TRIUMPH studien (Hillmen et al., 2006) undersöktes med avseende på förekomst av pulmonell hypertension (Hill et al., 2010). Man såg en tydlig association mellan graden av intravaskulär hemolys och NO konsumtion. Nära hälften av patienterna hade förhöjt natriuretiskt hormon (NT-pro BNP) talande för pulmonell hypertension/hjärtsvikt. Andelen patienter med dyspné och med förhöjt NTproBNP minskade signifikant redan efter 14 dagars eculizumab behandling.

Övriga manifestationer

Den hemolysinducerade NO-konsumtionen leder till vasokonstriktion, kontraktion av glatt muskulatur och ischemi. Dessa effekter kan orsaka dysfagi och buksmärtor (viktigt att utesluta trombos som genes) som är vanliga symptom hos PNH patienter. Samma mekanism ligger bakom en erektil dysfunktion. En svår icke anemiassocierad trötthet och huvudvärk är

också ofta förekommande. Svåra infektioner har visat sig vara en av de vanligaste komplikationerna vid PNH; infektion som primär dödsorsak hos fler än 20% har rapporterats (de Latour et al., 2008).

Aplastisk anemi (AA) kan föregå PNH (Socie et al., 1996). Vid AA finner man ofta en liten klon av PNH-celler. Omvänt kan PNH i vissa fall utvecklas till en manifesterad AA, varvid benmärgssvikten blir det helt dominerande kliniska problemet (Brodsky, 2009).

Diagnostik

Oklart hemolytiskt tillstånd, framför allt i kombination med järnbrist, ska väcka misstanke om PNH. Patienter med trombosor på ovanliga lokaler, tex extrahepatiska trombosor eller sinustrombosor, ska utredas avseende PNH.

Förhöjt LD, bilirubin, retikulocyter, samt omätbart haptoglobin är typiska laboratoriefynd vid PNH.

För att bekräfta/utesluta PNH utförs flödescytometri på perifert blod varvid eventuell brist på CD55 och CD59 undersöks.

Därtill omfattas utredningen även av benmärgsbiopsi, i syfte att utesluta underliggande benmärgssjukdom såsom aplastisk anemi, myelodysplastiskt syndrom eller myelofibros. (Parker et al., 2005; Richards & Barnett, 2007).

Vilka bör undersökas med flödescytometri avseende PNH?

Hemolys

Patienter med oklar DAT-negativ hemolys med eller utan samtidig benmärgssvikt ska alltid undersökas med avseende på PNH. Laborariemässigt innebär förhöjt LD ett stöd för intravasal hemolys. Järnbrist är ofta förekommande på grund av den kontinuerliga förlusten av järn i urinen. Haptoglobin är, som vid hemolys generellt, ofta omätbart. Hemoglobinuri är inte obligat vid PNH men tillståndet är i sig så ovanligt att det alltid, även som enda fynd, bör föranleda flödescytometrisk kontroll avseende PNH. Anamnestiska tecken på intravasal hemolys kan vara diffus buk- och ryggsmärta samt mörk urin. (Borowitz et al., 2010; Parker et al., 2005)

Benmärgssvikt utan tecken till hemolys

Vid förekomst av subklinisk PNH-klon föreligger varken anamnes på eller laborariemässigt mätbar hemolys. Subkliniska PNH-kloner påvisas hos cirka 20% av fall med aplastisk anemi och 1-2% av patienter med MDS, men kan även ses vid andra "bone marrow failure syndromes" (Raza et al., 2013). Subklinisk PNH-klon vid aplastisk anemi kan prediktera bättre svar på immunsuppressiv terapi jämfört med om PNH-klon saknas (Kulagin et al., 2014; Parker et al., 2005; Sugimori et al., 2006; Wang, Chuhjo, Yasue, Omine & Nakao, 2002).

Trombos

Tromboemboliska komplikationer är vanligt vid PNH, men med tanke på den låga prevalensen av sjukdomen är det inte motiverat att undersöka alla patienter med trombos avseende eventuella PNH-kloner. I fall med spontana trombosor på ovanlig lokal skall dock möjligheten av underliggande PNH-sjukdom beaktas och indikationen för PNH diagnostik stärks om patienten är ung och/eller har tecken på hemolys och cytopeni. Ett normalt LD talar emot men utesluter inte en underliggande PNH-sjukdom (Parker et al 2005, Borowitz et al

2010). Utredning av ärftliga och förvärvade trombofilmarkörer är inte rutinmässigt indicerat i de fall bakomliggande PNH-sjukdom påvisas men även möjligheten av antifosfolipidantikroppar ska beaktas (Dragoni et al., 2010).

Flödescytometrisk diagnostik

Med flödescytometrisk immunofenotypning kan cellpopulationer som saknar GPI-förankrade ytmolekyler, så kallade PNH-kloner, påvisas och storleksbestämmas. Detta görs på blod där PNH-klonens relativa andel av neutrofila celler, monocyter och erythrocyter anges. (Borowitz et al., 2010) Beroende på hur många celler som analyseras kan PNH-kloner på 0,01-1% påvisas. PNH-klonen kan dessutom specificeras som: total avsaknad (så kallad typ III), intermediärt uttryck (typ II) och normalt uttryck (typ I) av GPI-förankrade ytmolekyler. Typ II-celler påvisas bäst bland erythrocyterna. Bäst mått på PNH-klonens storlek hos patienten utgör andelen PNH-celler bland de neutrofila granulocyterna. PNH-fraktionen bland monocyterna används som en verifiering av fyndet bland de neutrofila cellerna. Andelen PNH-celler bland erythrocyterna är utan undantag lägre än bland de övriga cellerna. Detta beror huvudsakligen på att PNH-erythrocyterna till stor del lyserat in vivo och därför inte längre återfinns i blodprovet. Eventuella erythrocyttransfusioner bidrar också till att sänka andelen PNH-erythrocyter och bör omnämnas till laboratoriet.

3 mL blod räcker i de flesta fall för analys. Blodet antikoaguleras med EDTA, heparin eller citrat. Provet kan förvaras i rumstemperatur de första 24 timmarna men bör därefter förvaras vid 4°C. Provet skall analyseras inom 48 timmar. För mer utförlig beskrivning av flödescytometrisk diagnostik se Bilaga 1.

Om inga PNH-celler påvisas bör det explicit anges att neutrofila celler, monocyter och erythrocyter uppvisar normalt uttryck av GPI-förankrade antigen och att ingen PNH-klon således påvisas. Kvantifieringsgränsen för påvisande av PNH-klon ("detektionsgräns") skall anges för varje cellslag; $\geq 1\%$ eller $\geq 0,01\%$. Om en liten PNH-klon påvisas, $<10\%$, skall det klart framgå att detta inte är liktydigt med att hemolytisk PNH diagnostiserats. Om undersökningen är en i raden där PNH-klon påvisats hos en patient bör tidigare klonstorlekar anges i aktuell rapport.

Övrig utredning

Efter det att PNH konfirmerats rekommenderas provtagning och undersökningar enligt nedan för att värdera hemolysintensitet, organfunktion och trombosförekomst.

- Ferritin, TIBC, Retikulocyter, Kobalamin, Folat, Haptoglobin, DAT, LD, Bilirubin, Kreatinin, Hb, LPK, Neutrofila.
- Bedömning av njurfunktion sker enligt lokala rutiner.
- Ekokardiografi och BNP/NT-pro BNP. Vänsterkammarsvikt efter kronisk anemi? Posttromboembolisk pulmonell hypertention med högt PA-tryck och sviktande högerkammare?
- Datortomografi av thorax och buk för att utesluta/bekräfta trombos/emboli.
- En progressiv pancytopeni utreds enligt gängse rutiner för benmärgssvikt

Behandling

För patienter med klassisk PNH är allogena stamcellstransplantation den enda potentiellt kurativa terapin. Komplementinhibering med eculizumab är i övrigt den enda behandling som minskar sjukdomsaktiviteten.

Antikoagulantia

Primärprofylax med warfarin har visat sig markant reducera antalet trombosinsjuknanden men en betydande trombosrisk kvarstår trots adekvat och terapeutisk nivå (Griffin & Munir, 2017; Hall, Richards & Hillmen, 2003; Hillmen et al., 2007). Även vid klonstorlekar <50% kan primärprofylax övervägas då risken för trombos är högre än i en kontrollpopulation och risken inte till fullo följer övriga PNH-symtom. Risken för blödning måste dock alltid beaktas eftersom patienterna ofta har trombocytopeni. Trombocyter $>50 \times 10^9/L$ innebär i normalfallet ingen kontraindikation för antikoagulantia och tromboser har beskrivits hos patienter med nivåer lägre än detta. Eculizumab reducerar dock trombosrisken och i normalfallet kan man vid en effektiv och välfungerande behandling sätta ut antikoagulantia som förskrivits i primärprofylaktiskt syfte.

Kontinuerlig antikoagulantia skall erbjudas alla patienter som insjuknar i tromboembolisk sjukdom oavsett klonstorlek (Brodsky, 2009). Eculizumab minskar risken även här för ny trombosepisod, men man bör vara försiktig med att sätta ut antikoagulantia – framför allt hos patienter med tidigare svåra trombosperioder - även om det finns rapporter där detta gjorts utan att re-tromboser inträffat (Emadi & Brodsky, 2009). Erfarenheten är relativt begränsad och vissa potentiellt underliggande trombosmekanismer motverkas inte av komplementhämningen. Vid situationer som i sig ökar risken för trombos, såsom vid operativa ingrepp, kan förlängd profylax med lågmolekylärt heparin övervägas, men vägledande studier saknas.

I första hand skall warfarin eller lågmolekylärt heparin användas i terapeutiska nivåer. De nya antikoagulantia (NOAK), dvs direkta trombin- och faktor Xa-hämmare kan vara ett alternativ, men erfarenheten av dessa vid PNH är fortfarande mycket begränsad och det är i nuläget rekommendabelt att använda dessa med försiktighet bland annat med tanke på svårigheterna att reversera effekten vid eventuell blödningskomplikation.

Trombolytisk behandling kan övervägas i svåra fall men blödningsrisken måste beaktas (Kuo, Brodsky & Kim, 2006).

Vid graviditet skall även patienter med förhållandevis små kloner ha trombosprofylax med lågmolekylärt heparin under hela graviditeten och under minst 2 månader post partum. Vid tidigare trombosanamnes ges terapeutiska doser, men i frånvaro av tidigare episoder och i kombination med eculizumab kan högdosprofylax övervägas.

Erytrocyttransfusioner

För att öka hemoglobinkoncentrationen och minska anemisymtom kan erytrocyttransfusion bli aktuellt. Risken att accentuera hemolys anses minimal även om icke tvättade blodkomponenter används (Brecher & Taswell, 1989), vilket numera utgör standard inom svensk transfusionsmedicin. För att minska risken för HLA-immunisering, transfusionsreaktioner kopplade till överföring av donatorleukocyter samt överföring av CMV rekommenderas leukocytbefriade blodkomponenter (Brecher & Taswell, 1989; Parker et al., 2005) vilket utgör standard inom svensk transfusionsmedicin.

Utvecklingen av sekundär hemokromatos kan fördröjas hos patienter med kraftig intravasal hemolys på grund av den kontinuerliga förlusten av järn i urinen. Denna förlust kan vara så stor att järnbrist uppkommer trots kontinuerliga transfusioner. Risken för sekundär hemokromatos kvarstår dock, framför allt hos patienter vars transfusionsbehov beror på sviktande benmärgsfunktion och inte på en massiv hemolytisk komponent (Brodsky, 2009; Hill, Richards & Hillmen, 2007; Parker et al., 2005).

Järn/folat

På grund av den ökade konsumtionen av folat sekundärt till ökad erytropoes rekommenderas, som vid andra hemolytiska tillstånd, substitution med 1-5 mg folsyra.

På grund av kontinuerlig järnförlust i urinen kan järnbrist uppkomma och järnsubstitution kan bli nödvändig (Borowitz et al., 2010; Parker et al., 2005; Wang, Chuhjo, Yasue, Omine & Nakao, 2002).

Allogen stamcellstransplantation

Allogen stamcellstransplantation (allo-SCT) är förenad med en icke obetydlig morbiditet och mortalitet. Innan eculizumab introducerades var indikationerna för transplantation vid PNH benmärgssvikt, livshotande trombosor och okontrollerbar hemolys. De senare två indikationerna kan delvis nära undanröjas med eculizumabterapi. Därtill har det visat sig att patienter under eculizumabterapi har en nära normal förväntad livslängd (Kelly et al., 2011). Då patienter med svår klassisk PNH är relativt sällsynta saknas prospektiva studier. Det finns ett 15-tal publikationer kring allo-SCT vid PNH. De flesta av dessa är av äldre datum, retrospektiva, inkluderande ett fåtal patienter med konventionell konditionering. Den hittills största studien av allo-HCT vid PNH publicerades 2012 med data från EBMT och det franska PNH-registret (Peffault de Latour et al., 2012). Man jämförde 211 patienter som genomgått allo-SCT 1978-2007 med 402 franska icke allo-SCT patienter diagnostiserade med PNH mellan 1950 och 2005. Femårsöverlevnaden var 68 % i alloSCT-gruppen (54% vid tidigare tromboembolism, 69% vid aplastisk anemi utan tromboembolism och 86% vid hemolys men utan tromboembolism/aplastisk anemi). Vid matchning och jämförelse med den icke transplanterade gruppen framkom att patienter med svår tromboembolism hade en sämre överlevnad. Vid indikationen aplastisk anemi gick det inte sämre för allo-SCT gruppen. Man konkluderade att allo-SCT vid PNH troligen inte är lämpligt vid svår tromboembolism. På senare år har mindre studier och fallrapporter med reducerad konditionering publicerats med lägre transplantationsrelaterad morbiditet och mortalitet.

Trots de medicinska riskerna bör framhållas att stamcellstransplantation ännu är den enda kurativa behandlingen vid PNH.

Allo-SCT kan vara indicerat vid klassisk PNH med komplikationer som inte svarar på eculizumab, i länder där eculizumab inte är tillgängligt eller där annan allvarlig benmärgssjukdom utvecklas. Beslut bör alltid föregås av diskussion i svenska PNH-gruppen.

Eculizumab (Soliris®)

År 2007 registrerades den humaniserade monoklonala IgG-antikroppen eculizumab för behandling vid PNH (Rother, Rollins, Mojcik, Brodsky & Bell, 2007). Eculizumab är en komplementinhibitor av C5 vilket förhindrar den terminala komplementaktiveringen (Hillmen et al., 2004; Hillmen et al., 2006). Registreringen bygger på en fas2-studie och två fas3-studier (Brodsky et al., 2008; Hillmen et al., 2006). I den randomiserade placebo-kontrollerade fas3-studien TRIUMPH sågs att antal blodtransfusioner var median 0 i eculizumabgruppen jämfört med 10 i placebogruppen (Hillmen et al., 2006). Vid en retrospektiv genomgång av de två fas3-studierna analyserades incidensen av tromboembolism

(Hillmen et al., 2007). Hos gruppen patienter som behandlats med eculizumab reducerades incidensen trombos från 7.37/100 till 1.07/100 patientår dvs en 85% riskreduktion. Eculizumabbehandling minskar även risken för organpåverkan såsom pulmonell hypertension och nedsatt njurfunktion. Vid svår PNH-sjukdom ses även signifikant förbättrad livskvalitet (Hillmen et al., 2006).

En nackdel med inhiberingen av C5 är ett försämrat skydd mot meningokockinfektioner. Av denna anledning ska patienten meningokockvaccineras minst två veckor innan start av behandling (se även nedan). I övrig har få allvarliga biverkningar rapporterats. Övergående huvudvärk i anslutning till de första behandlingarna är relativt vanligt.

Eculizumab ges som intravenös infusion (25-45 min). Vanligen ges 600 mg en gång i veckan i fyra veckor, från och med femte veckan 900 mg var 14:e dag. Med denna dosering ses en fullständig inhibering av komplementmedierad hemolys under hela 14-dagarsperioden hos >90% av patienterna (Hillmen *et al*, 2004). Vissa patienter kan ha tecken till ”genombrotts-hemolys” dag 12-14. Detta kan motivera att ge eculizumab tätare än var 14:e dag eller hellre höja dosen vid behandling var 14:e dag. Behandling med eculizumab är potentiellt livslång, men i enstaka fall med sjunkande andel PNH-klon har man kunnat sätta ut behandlingen (Anita Hill, pers. meddelande).

Efter upprepade diskussioner med SKL/NT-rådet under 2017 kommer indikationen för eculizumabbehandling vid PNH bygga på oundgänglighetsprincipen. Detta innebär att PNH-sjukdomen utan specifik behandling (idag eculizumab eller benmärgstransplantation) med största säkerhet leder till allvarlig och irreversibel försämring inom ett år. För varje patient som kan vara kandidat för eculizumabbehandling är det ett krav från SKL/NT-rådet att patienten diskuteras i Svenska PNH-gruppen som sedan avger en rekommendation till patientansvarig hematolog.

Meningokockvaccination

Eculizumab blockerar komplementfaktor C5 vilket medför en ökad risk för meningokockinfektioner. Senast två veckor innan start av behandling bör patienten därför vaccineras. För bred täckning rekommenderas tetravalent konjugatvaccin (serogrupper A, C, W-135 och Y). För närvarande finns två preparat på marknaden, (FASS ATC: J07AH08). Patienten bör revaccineras efter tre år. Vaccinet ger inte skydd mot *Neisseria meningitidis* serotyp B, vilken utgör cirka 25 % av meningokockfallen i Sverige. Sedan 2014 finns ett preparat tillgängligt i Sverige som skyddar mot serotyp B (FASS ATC J07H09). Vaccinet är ett konjugatvaccin och ger en god världsomspännande täckning mot florerande stammar av serotyp B (O’Ryan, Stoddard, Toneatto, Wassil & Dull, 2014). Vetenskapligt underlag saknas ännu för en allmän rekommendation i Sverige men möjligheten bör övervägas till patienter med ökad risk för smitta. (Folkhälsomyndigheten). Profylax med antibiotika kan övervägas i samband med resa till områden med kraftig ökad infektionsrisk. Rådgör gärna med infektionskollega avseende såväl vaccination som antibiotikaprofylax.

Graviditet

Gravida kvinnor med PNH löper en kraftigt ökad risk för komplikationer under såväl graviditet, partus som postpartum (Fieni, Bonfanti, Gramellini, Benassi & Delsignore, 2006; Gessoni et al., 2015; Ray, Burrows, Ginsberg & Burrows, 2000). Riskökningen beror i huvudsak på tromboemboliska komplikationer (Kelly et al., 2010). Samstämmiga observationer talar för att aktiviteten i PNH-sjukdomen ökar under graviditetens senare del. I äldre översiktartiklar anges en maternell mortalitet på 12-21% med åtföljande rekommendation om att avråda kvinnor med PNH från graviditet (Fieni, Bonfanti, Gramellini,

Benassi & Delsignore, 2006; Ray, Burrows, Ginsberg & Burrows, 2000). Nämda siffror bygger dock på begränsade patientmaterial (30-40 patienter), där en betydande andel inte erhållit primärprofylax med antikoagulantia.

Även risken för fostret är ökad, främst pga ökad andel prematura födslar. I ovan nämnda äldre sammanställningar anges att den perinatale mortalitet för foster till kvinnor med PNH är 7-9%.

Starka teoretiska skäl talar för att risken för PNH-relaterade graviditetskomplikationer minskar vid behandling med eculizumab genom att man uppnår bättre sjukdomskontroll. Det finns inte några hållpunkter för fosterskadande effekt, och med all sannolikhet passerar eculizumab inte placentan (Brodsky, 2009; Hallstensen et al., 2014; Kelly et al., 2010). I en aktuell studie av Kelly et al, analyserades utfallet av 75 graviditeter hos 61 kvinnor med PNH där samtliga behandlades med eculizumab under graviditeten (Kelly et al., 2015). Inga maternella dödsfall sågs. Två trombotiska episoder noterades, båda postpartum. Fosterdödligheten var 4% , andelen missfall 8% (samtliga i första trimestern) och prematura födslar 22%. Konklusionen var att kvinnor med PNH har klar nytta av erhålla behandling med eculizumab under graviditet.

Vid påvisad graviditet skall trombosprofylax med lågmolekylärt heparin alltid ges under hela graviditeten och minst 6 veckor postpartum för att skydda både moder och foster. Optimal dosering är oklar och kan påverkas av samtidig eculizumabbehandling, men i rapporterade fall har i första hand terapeutiska doser givits och denna regim skall ges vid tidigare trombosanamnes. I övriga fall kan lägre doser motsvarande högdosprofylax övervägas.

Rekommendationer

- Kvinnor med PNH bör informeras om att sjukdomen ökar risken för komplikationer vid graviditet. Gravida kvinnor med PNH ska betraktas som ”högriskgraviditeter” och följas noggrant av obstetriker (specialmödravård) och PNH-intresserad hematolog i nära samarbete.
- Oavsett förekomst av tidigare tromboemboliska händelser ska gravida PNH-patienter erhålla antikoagulantiprofylax med lågmolekylärt heparin under hela graviditeten samt sex veckor postpartum (doser – se sid. 10). Detta gäller även om patienten behandlas med eculizumab.
- Vid nydiagnostiserad graviditet hos PNH-patient som inte står på eculizumab finns starka skäl att ge sådan behandling under själva graviditeten inklusive två månader postpartum. Varje enskilt sådant fall bör diskuteras med PNH-kunnig expertis där de starka fördelarna med eculizumab vid graviditet vägs mot faktum att erfarenheten av preparatet i denna situation är begränsad

Prognos

En femårsmortalitet på 35% och medianöverlevnad på ca 10 år har beskrivits i patientkohorter från tiden innan introduktion av eculizumab (Hillmen, Lewis, Bessler, Luzzatto & Dacie, 1995; Socie et al., 1996). Den ökade mortaliteten betingas främst av ökad risk för allvarliga trombosor. I en publicerad sammanställning från PNH-gruppen i Leeds, sågs ingen skillnad i mortalitet mellan PNH-patienter som behandlats med eculizumab (n=79) jämfört med en kön- och åldersmatchad normalpopulation, och var signifikant bättre än 30 likartade patienter med PNH behandlade under den 7-årsperiod som föregick introduktionen av eculizumab (Kelly et al., 2011)

Uppföljning av patienter med PNH

Det finns flera starka skäl till varför patienter med PNH, oavsett eventuell behandling med eculizumab, bör följas regelbundet. Uppföljningen syftar till värdering av sjukdomsaktivitet (symtom, hemolys- och anemigrad, tromboser, klonstorlek), transfusionsbehov, järnförråd, indikation för eculizumab eller annan behandling, tidig upptäckt av organotoxicitet samt tecken till benmärgssvikt). Hos dem som behandlas med eculizumab ska behandlingens effekt (symtom, livskvalitet, ev. genombrottshemolys) samt ev. oväntade bieffekter kontinuerligt dokumenteras. Uppföljning av PNH bör ske hos hematolog och är i princip livslång.

Uppföljning av patienter med PNH som behandlas med eculizumab

Första 3 månaderna med eculizumab-behandling: Blodstatus, reticulocyter och LD var 14:e dag (inför varje infusion).

- Efter cirka 6 veckors behandling med eculizumab: Anamnes (PNH-relaterade symtom, livskvalitet, ev. tromboser, ev. transfusioner), blodtryck samt blodprov för analys av blodstatus, reticulocyter, LPK, neutrofiler, TPK. LD, krea, ferritin/TIBC, CRP, ALAT och bilirubin.
- Var 3:e månad från start av eculizumab: Läkarbesök med anamnes, blodtryck och blodprovtagning enligt 6 veckorsk kontroll (se ovan!).
- Var 12:e månad från start av eculizumab: Som ovan samt s-Ferritin/TIBC, CRP och flödescytometri på perifert blod (granulocyter, erythrocyter) för värdering av klonstorlek. Om stabil klon efter ett par års behandling endast ny flödescytometri vid ändring av blodstatus. NT-proBNP och njurfunktionsbedömning (utöver s-krea) kan övervägas.

Rekommendationer gällande patienter med PNH som *inte* behandlas med eculizumab

- Vid aktiv PNH-sjukdom monitoreras patienterna i princip på samma sätt som om de behandlas med eculizumab. Vissa mildare fall kan dock följas mer sällan, exempelvis var 6:e månad och med flödescytometri för bestämning av PNH-klon en gång per år initialt men därefter endast vid förändring av status.
-

Rekommendationer gällande PNH under graviditet – se separat avsnitt!

Vad gäller patienter med PNH-klon som del i AA eller MDS hänvisas till vårdprogrammen för MDS (www.nmds.org) respektive aplastisk anemi (www.sfhem.se/riktlinjer)

PNH-registret –register/observationsstudie se Bilaga 2

Referenser

- Borowitz MJ, Craig FE, Digiuseppe JA, Illingworth AJ, Rosse W, Sutherland DR, *et al.* (2010). Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. *Cytometry* 78: 211-230.
- Brecher ME, & Taswell HF (1989). Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and the transfusion of washed red cells. A myth revisited. *Transfusion* 29: 681-685.
- Brodsky RA (2008). Advances in the diagnosis and therapy of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood reviews* 22: 65-74.
- Brodsky RA (2009). How I treat paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 113: 6522-6527.
- Brodsky RA, Young NS, Antonioli E, Risitano AM, Schrezenmeier H, Schubert J, *et al.* (2008). Multicenter phase 3 study of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 111: 1840-1847.
- Cappellini MD (2007). Coagulation in the pathophysiology of hemolytic anemias. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology*: 74-78.
- Chow KM, Lai FM, Wang AY, Chan YL, Tang NL, & Li PK (2001). Reversible renal failure in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Am J Kidney Dis* 37: E17.
- de Latour RP, Mary JY, Salanoubat C, Terriou L, Etienne G, Mohty M, *et al.* (2008). Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: natural history of disease subcategories. *Blood* 112: 3099-3106.
- Dragoni F, Iori AP, Pignoloni P, Minotti C, Chiarotti F, Mazzucconi MG, *et al.* (2010). Thrombophilic screening in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: a pilot study. *British journal of haematology* 150: 492-494.
- Emadi A, & Brodsky RA (2009). Successful discontinuation of anticoagulation following eculizumab administration in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *American journal of hematology* 84: 699-701.
- Fieni S, Bonfanti L, Gramellini D, Benassi L, & Delsignore R (2006). Clinical management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in pregnancy: a case report and updated review. *Obstetrical & gynecological survey* 61: 593-601.
- Gessoni G, Canistro R, Bergamini L, Valverde S, Gessoni F, Nani G, *et al.* (2015). Postpartum thrombotic complication in a patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood Coagul Fibrinolysis*.
- Griffin M, & Munir T (2017). Management of thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a clinician's guide. *Ther Adv Hematol* 8: 119-126.

Hall C, Richards S, & Hillmen P (2003). Primary prophylaxis with warfarin prevents thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Blood* 102: 3587-3591.

Hallstensen RF, Bergseth G, Foss S, Jaeger S, Gedde-Dahl T, Holt J, *et al.* (2014). Eculizumab treatment during pregnancy does not affect the complement system activity of the newborn. *Immunobiology* 220: 452-459.

Heller PG, Grinberg AR, Lencioni M, Molina MM, & Roncoroni AJ (1992). Pulmonary hypertension in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Chest* 102: 642-643.

Hill A (2006). The incidence and prevalence of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and survival of patients in Yorkshire. *Blood* 108a:Abstract 985.

Hill A, DeZern AE, Kinoshita T, & Brodsky RA (2017). Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Nat Rev Dis Primers* 3: 17028.

Hill A, Richards SJ, & Hillmen P (2007). Recent developments in the understanding and management of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *British journal of haematology* 137: 181-192.

Hill A, Rother RP, Wang X, Morris SM, Jr., Quinn-Senger K, Kelly R, *et al.* (2010). Effect of eculizumab on haemolysis-associated nitric oxide depletion, dyspnoea, and measures of pulmonary hypertension in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *British journal of haematology* 149: 414-425.

Hill A, Sapsford RJ, Scally A, Kelly R, Richards SJ, Khurisgara G, *et al.* (2012). Under-recognized complications in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: raised pulmonary pressure and reduced right ventricular function. *British journal of haematology* 158: 409-414.

Hillmen P, Hall C, Marsh JC, Elebute M, Bombara MP, Petro BE, *et al.* (2004). Effect of eculizumab on hemolysis and transfusion requirements in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *The New England journal of medicine* 350: 552-559.

Hillmen P, Lewis SM, Bessler M, Luzzatto L, & Dacie JV (1995). Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *The New England journal of medicine* 333: 1253-1258.

Hillmen P, Muus P, Duhrsen U, Risitano AM, Schubert J, Luzzatto L, *et al.* (2007). Effect of the complement inhibitor eculizumab on thromboembolism in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 110: 4123-4128.

Hillmen P, Young NS, Schubert J, Brodsky RA, Socie G, Muus P, *et al.* (2006). The complement inhibitor eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *The New England journal of medicine* 355: 1233-1243.

Kelly R, Arnold L, Richards S, Hill A, Bomken C, Hanley J, *et al.* (2010). The management of pregnancy in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria on long term eculizumab. *British journal of haematology* 149: 446-450.

Kelly RJ, Hill A, Arnold LM, Brooksbank GL, Richards SJ, Cullen M, *et al.* (2011). Long-term treatment with eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: sustained efficacy and improved survival. *Blood* 117: 6786-6792.

Kelly RJ, Hochsmann B, Szer J, Kulasekararaj A, de Guibert S, Roth A, *et al.* (2015). Eculizumab in Pregnant Patients with Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *The New England journal of medicine* 373: 1032-1039.

Kulagin A, Lisukov I, Ivanova M, Golubovskaya I, Kruchkova I, Bondarenko S, *et al.* (2014). Prognostic value of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria clone presence in aplastic anaemia patients treated with combined immunosuppression: results of two-centre prospective study. *British journal of haematology* 164: 546-554.

Kuo GP, Brodsky RA, & Kim HS (2006). Catheter-directed thrombolysis and thrombectomy for the Budd-Chiari syndrome in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in three patients. *J Vasc Interv Radiol* 17: 383-387.

Mathieu D, Rahmouni A, Villeneuve P, Anglade MC, Rochant H, & Vasile N (1995). Impact of magnetic resonance imaging on the diagnosis of abdominal complications of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 85: 3283-3288.

Meyers G W, Lamy T, Cahn J-Y, Kroon H-A, Severino B, , & Uranga M AM, Vela J, Hill A (2007). Disease-Related Symptoms Reported across a Broad Population of Patients with Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *Blood*: a.3683.

Miyata T, Yamada N, Iida Y, Nishimura J, Takeda J, Kitani T, *et al.* (1994). Abnormalities of PIG-A transcripts in granulocytes from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *The New England journal of medicine* 330: 249-255.

Moyo VM, Mukhina GL, Garrett ES, & Brodsky RA (2004). Natural history of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria using modern diagnostic assays. *British journal of haematology* 126: 133-138.

O'Ryan M, Stoddard J, Toneatto D, Wassil J, & Dull PM (2014). A multi-component meningococcal serogroup B vaccine (4CMenB): the clinical development program. *Drugs* 74: 15-30.

Parker C, Omine M, Richards S, Nishimura J, Bessler M, Ware R, *et al.* (2005). Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 106: 3699-3709.

Parker CJ (2002). Historical aspects of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: 'defining the disease'. *British journal of haematology* 117: 3-22.

Peffault de Latour R, Schrezenmeier H, Bacigalupo A, Blaise D, de Souza CA, Vigouroux S, *et al.* (2012). Allogeneic stem cell transplantation in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica* 97: 1666-1673.

Ray JG, Burows RF, Ginsberg JS, & Burrows EA (2000). Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and the risk of venous thrombosis: review and recommendations for management of the pregnant and nonpregnant patient. *Haemostasis* 30: 103-117.

Raza A, Ravandi F, Rastogi A, Bubis J, Lim SH, Weitz I, *et al.* (2013). A Prospective Multicenter Study of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Cells in Patients with Bone Marrow Failure. *Cytometry*.

Richards SJ, & Barnett D (2007). The role of flow cytometry in the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in the clinical laboratory. *Clinics in laboratory medicine* 27: 577-590, vii.

Risitano AM, Imbriaco M, Marando L, Seneca E, Soscia E, Malcovati L, *et al.* (2012). From perpetual haemosiderinuria to possible iron overload: iron redistribution in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria patients on eculizumab by magnetic resonance imaging. *British journal of haematology* 158: 415-418.

Rother RP, Bell L, Hillmen P, & Gladwin MT (2005). The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *Jama* 293: 1653-1662.

Rother RP, Rollins SA, Mojcik CF, Brodsky RA, & Bell L (2007). Discovery and development of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Nature biotechnology* 25: 1256-1264.

Schrezenmeier H, Muus P, Socie G, Szer J, Urbano-Ispizua A, Maciejewski JP, *et al.* (2014). Baseline characteristics and disease burden in patients in the International Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Registry. *Haematologica* 99: 922-929.

Sloand EM, Pfannes L, Scheinberg P, More K, Wu CO, Horne M, *et al.* (2008). Increased soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR) is associated with thrombosis and inhibition of plasmin generation in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) patients. *Experimental hematology* 36: 1616-1624.

Socie G, Mary JY, de Gramont A, Rio B, Leporrier M, Rose C, *et al.* (1996). Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: long-term follow-up and prognostic factors. French Society of Haematology. *Lancet* 348: 573-577.

Sugimori C, Chuhjo T, Feng X, Yamazaki H, Takami A, Teramura M, *et al.* (2006). Minor population of CD55-CD59- blood cells predicts response to immunosuppressive therapy and prognosis in patients with aplastic anemia. *Blood* 107: 1308-1314.

Wang H, Chuhjo T, Yasue S, Omine M, & Nakao S (2002). Clinical significance of a minor population of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-type cells in bone marrow failure syndrome. *Blood* 100: 3897-3902.

Bilaga 1.

Vid leukocytundersökningen lyseras erythrocyterna. Vid erythrocytundersökningen används ingen lysering. Neutrofila celler identifieras med hjälp av CD15/SSC eller CD45/CD15/FSC/SSC. Monocyter identifieras med hjälp av CD33/SSC eller CD45/CD33/FSC/SSC. Erythrocyter identifieras med hjälp av CD235a(GPA)/FSC/SSC eller eventuellt enbart FSC/SSC. Andra antikroppskombinationer som visats vara likvärdiga kan användas.

För att påvisa nedsatt uttryck av GPI-ankare på neutrofila används FLAER (fluorescent aerolysin reagent) kombinerat med någon eller några av de monoklonala antikroppar som är riktade mot CD24, CD66b och CD16. Vid motsvarande analys på monocyter används FLAER kombinerat med CD14, CD48, CD55 och eventuellt CD157. Vid analys av erythrocyter används CD55 och CD59 men inte FLAER. Vid preparation av erythrocyter uppstår mycket lätt agglutinat, framför allt då CD235a kombineras med annan antikropp. För att undvika detta fenomen bör välbeprövad antikroppsklon väljas, lägsta noggrant uttitrerade antikroppskoncentrationer användas och kraftig omskakning av provet göras före och eventuellt under analys på flödescytometern.

Svarsrapporten skall innehålla uppgift om det undersökta provmaterialet, provtagningstid, analysstidpunkt och eventuella avvikelser i provmaterialet (koagel, synlig hemolys). De reagens som använts för respektive cellslag skall anges. PNH-klonens storlek ska anges för varje cellslag och för erythrocyter typ (II eller III).

Kvalitetskontroll: Laboratoriet skall framgångsrikt delta i externt kontrollprogram (i dagsläget UK NEQAS) eller i laboratoriejämförelser. Laboratoriet skall ha kontinuerligt samarbete med PNH-kunnig klinisk hematolog.

Bilaga 2

Det Internationella PNH-registret skapades efter krav från EMA och FDA vid registreringen av eculizumab men är öppet för alla PNH-patienter oberoende av terapi. Registret som startade 2007 är basen för en icke-interventionell observationsstudie med syfte att generera epidemiologiska data för naturalförloppet vid PNH-sjukdom såväl med som utan eculizumabbehandling. Under 2017 stängdes ett antal mindre sites ner och inga nya kommer att öppnas. På de sites som är fortsatt öppna kan nya patienter inkluderas

Till PNH-registret rapporteras demografiska data inkluderande tidigare sjukdomar, aktuell medicinering, laboratedata relaterade till PNH-sjukdomen, klonstorlek av PNH. Prospektivt följs var 6:e månad bland annat antal blodtransfusioner, hemolysprover, trombosor, livskvalitetundersökning med Facit-Fatigue och EORTC QLQ-C30, mortalitet och morbiditet inkluderande ev. andra maligniteter samt infektioner och graviditet. För patienter behandlade med eculizumab registreras dessutom meningokockvaccination-status, förlopp om eculizumab avbryts, infusionsreaktioner och doseringsinformation hos patienter som behandlas utanför 12-16 dagars intervall. Uppföljningstiden var primärt 5 år men detta är i nuläget förlängt tills vidare.

Registret stöds ekonomiskt av Alexion Pharmaceuticals men monitoreras av ICON Clinical Research. Idag (27 sep 2017) är 50517 patienter inkluderade från 35 länder och i Sverige 52 patienter.

Huvudprövare i Sverige är Peter Johansson.