

# **Paroxysmal nokturn hemoglobinuri (PNH)**

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

**Gäller from 2011-05-01**

Uppdateras senast 2013-05-01

## **Svenska PNH-gruppen**

**Jonas Alsenhed, Jan Astermark, Magnus Björkholm, Martin Höglund, Stefan Jacobsson, Peter Johansson (ordförande) samt Maria Liljeholm**

## **Innehåll**

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?	6
Laboratoriediagnostik	7
Övrig utredning	7
<i>Behandling</i>	
Antikoagulantia	8
Blodtransfusioner	8
Järn/folsyra	9
Allogen stamcellstransplantation	9
Antikroppsbehandling	9
Indikationer för eculizumabbehandling	10
Meningokockvaccination	10
Graviditet	10
Prognos	11
Sjukdomsförlopp och uppföljning	11
Informationsplikt	12
PNH-registret	13
Referenser	13-16
Bilaga 1 Flödescytometrisk undersökning	17

## **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 samt en laboratoriemedicinare med särskilda kunskaper om sjukdomens diagnostik. 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®) där den mycket höga kostnaden för preparatet skärper kravet på genomtänkt indikation. Målet är att förbättra omhändertagande av patienter med PNH, i detta ingår att söka skapa en likartad nationell bedömning vad avser behandling med eculizumab.

Arbetet med dessa riktlinjer har föregåtts av en systematisk genomgång av aktuell litteratur inkluderande nyligen publicerade internationella riktlinjer för PNH-diagnostik och behandling. Gruppen har även haft tillgång till engelska, spanska och australiensiska riktlinjer för behandling av PNH med eculizumab (Borowitz, *et al* 2010, [www.health.gov.au/lscp](http://www.health.gov.au/lscp) 2010, Kelly *et al* Blood online 1 April 2011-02-333997).

Vissa avsnitt såsom uppföljning vid eculizumabbehandling och ställningstagande till antibiotikapofylax har särskilt diskuterats med svensk och utländsk expertis på området. På grund av PNH-sjukdomens sällsynthet är evidensgraden för rekommendationer om behandling ofta låg. Vad avser eculizumab finns idag en randomiserad placebokontrollerad studie den s.k. TRIUMPH-studien (Hillmen, *et al* 2004), medan dokumentation i övrigt härrör sig från prospektiva icke-randomiserade studier, retrospektiva kohortstudier samt fallpresentationer.

Vad gäller avsnittet om behandling med eculizumab har PNH-gruppen även samrått med SKLs grupp för nya läkemedelsterapier (NLT) och därvid enats om att tills vidare tillämpa följande principer för förskrivning av eculizumab: Innan definitivt ställningstagande till insättning av Soliris® ska patienten bedömas av PNH-intresserad hematolog vid regionklinik. Därutöver ska en värdering av indikationen för eculizumab göras av Svenska PNH-gruppen, samt patienten (förutsatt informerat samtycke) registreras i det internationella PNH-registret. Se i övrigt under kapitlet om ”Behandling” respektive ”PNH-registret”.

Vårt riktlinjedokument uppfyller de minimikrav på struktur och process som sammanfattas av SFH:s policydokument, ”Regelverk för diagnosgruppernas arbete med kvalitetetsfrågor inom hematologi” ([www.sfhem.se/filarkiv](http://www.sfhem.se/filarkiv)). Vårt arbete med dessa riktlinjer har bedrivits utan ekonomiskt stöd från läkemedelsindustrin.

Vid förfrågningar/kommentarer om detta dokument liksom vid önskemål om att diskutera komplicerat patientfall - kontakta gärna någon i PNH-gruppen!

### **Svenska PNH-gruppen**

Jonas Alsenhed , Västervik ([jonas.alsenhed@ltkalmar.se](mailto:jonas.alsenhed@ltkalmar.se) )

Jan Astermark , Malmö/Lund ([jan.astermark@med.lu.se](mailto:jan.astermark@med.lu.se))

Magnus Björkholm, Stockholm ([magnus.bjorkholm@karolinska.se](mailto:magnus.bjorkholm@karolinska.se))

Martin Höglund, Uppsala ([martin.hoglund@medsci.uu.se](mailto:martin.hoglund@medsci.uu.se))

Stefan Jacobsson, Göteborg ([stefan.jacobsson@vgregion.se](mailto:stefan.jacobsson@vgregion.se))

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

Maria Liljeholm, Umeå ([maria.liljeholm@vll.se](mailto: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, 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 trombosor men även pga benmargssvikt och njurpåverkan, en ökad mortalitet (Hillmen *et al* 1995, Socie *et al* 1996). Svårare former av PNH ger ensamt 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%.

PNH undergrupperas i tre klasser (Parker, *et al* 2005). Hemolytisk och trombotisk PNH räknas till klassisk PNH. Övriga två undergrupper är dels PNH associerad till annan benmargssjukdom ffa aplastisk anemi (AA) eller myelodysplastiskt syndrom (MDS) dels subklinisk PNH med en mycket liten klon utan tecken till hemolys. Detta dokument fokuserar på klassisk PNH.

## **Patofysiologi**

Komplementinhibitorer på den normala erythrocytens 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-ankar proteiner på alla blodceller. Avsaknad eller brist på GPI-ankar komplementinhibitorerna CD55 och CD59 gör i sin tur PNH-erythrocyter känsliga för komplementmedierad destruktion (Brodsky 2008).

Intravasal lys av erythrocyterna ger fritt hemoglobin i plasma vilket binds irreversibelt till NO (Brodsky 2008). Man har funnit en 15 ggr ökad NO-konsumtion hos PNH-patienter jämfört med friska kontroller. Det låga NO:t 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 trombosor (Brodsky 2008, Moyo, *et al* 2004, Rother, *et al* 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, *et al* 2007)

De vanligaste kliniska manifestationerna vid klassisk PNH är hemolytisk anemi, trombosor och benmargssvikt. I sjukdomsbilden ingår ofta en multiorganpåverkan med buksmärtor, dysfagi, erektil dysfunktion, pulmonell hypertension med högerkammarsvikt och

njurinsufficiens (Rother, *et al* 2005). Patienterna har inte sällan en uttalad kronisk trötthet som endast delvis förklaras av anemin.

#### *Anemi*

Patienterna har oftast en transfusionskrävande anemi pga främst intravasal hemolys. Den mörka urinen beror på hemoglobinurin vilken är sekundär till den intravaskulära hemolysen. Den sistnämnda är kronisk men kan variera i intensitet över tiden (Parker, *et al* 2005). Ibland ses skov i anslutning till infektioner. 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 trombosor (Hall, *et al* 2003, Hillmen, *et al* 1995, Moyo, *et al* 2004, Socie, *et al* 1996). Framför allt ska trombosor med ovanliga lokaliseringer leda till misstanke om PNH. Detta inbegriper även levernära trombosor som vid Budd-Chiaris syndrom, sinustrombosor eller andra atypiska cerebrala lokaliseringer på både ven- och artärsidan. I endast 5-10% av fallen utgör det tromboemboliska insjuknandet debutsymtom på sjukdomen (de Latour, *et al* 2008, Parker, *et al* 2005) men trombos som initialsymtom har ett prognostiskt prediktivt värde och ökar den relativa mortalitetsrisken 5-15 gånger. Risken att insjukna i trombos varierar med klonstorleken. Vid en storlek av granulocytklonen >50% har en kumulativ 10-årsincidens av trombosutveckling på 44% rapporterats jämfört med 5,8% vid mindre klonstorlek (Hall, *et al* 2003). Om även de patienter som stod på någon form av antikoagulantia inkluderades var motsvarande siffror 34,5% respektive 5,3%. I en annan studie kalkylerades en odds ratio på 1,64 per 10%-ig ökning av klonstorleken (Moyo, *et al* 2004). Primärprofylax med warfarin har visat sig markant reducera antalet trombos-insjuknanden, men en betydande risk kvarstår och risken för blödning måste alltid beaktas (Hall, *et al* 2003, Hillmen, *et al* 2007).

Orsaken till trombosbildningen är oklar men ett flertal faktorer har diskuterats. Som tidigare angivits är NO en viktig faktor för trombosutveckling då detta reglerar kärltonus och trombocytaktivering. Defekt fibrinolys har även diskuterats som bidragande orsak och den föreslagna mekanismen i detta fall skulle vara att mängden cellbunden plasminogen aktivator av urokinastyp (uPAR), som är ett GPI-bundet protein, är reducerad i kombination med ökad nivå av löslig urokinas plasminogen aktivator receptor (suPAR) (Sloand, *et al* 2008). En tredje potentiell mekanism är den trombocytdefekt som uppstår vid PNH med associerad fosfolipid-asymmetri och bildandet av negativa membranytor och mikrovesikler. Dessa utgör en plattform för plasmakoagulationen och fibrinbildning. Även mikropartiklar från hemolyserade röda blodkroppar, aktiverade trombocyter och andra apoptotiska celler kan stimulera trombosbildningen på liknande sätt (Cappellini 2007).

Av oklar anledning förefaller även trombosrisken variera mellan etniska grupper med förhållandevis högre risk bland vita och afroamerikaner jämfört med exempelvis asiater (Araten, *et al* 2005).

#### *Njurpåverkan*

Fritt hemoglobin är även nefrotoxiskt. Detta samt njurvenstrombosor och upprepade urinvägsinfektioner bidrar till den njurpåverkan som ses hos många patienter, 64% av patienterna har njurpåverkan och 8-18% avlider pga njurinsufficiens (Hillmen, *et al* 2010, Nishimura, *et al* 2004).

### *Pulmonell hypertension*

Ökad NO- konsumtion kan även leda till pulmonell hypertension och två tredjedelar av patienterna med klassisk PNH rapporterar andfåddhet som oftast är av måttlig eller svår grad. Cirka hälften av patienterna har tecken på ökat högerkammertrycke som vid pulmonell hypertension (Hill, *et al* 2010). Avsaknad av ett tidigare transfusionsbehov utesluter inte pulmonell hypertension.

### *Övriga manifestationer*

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).

Ett vanligt fynd är erektil dysfunktion sekundärt till kärlkonstriktion. Dysfagi och buksmärtor är vanliga symtom hos patienterna. Dessa kan vara orsakade av påverkan på glatt muskulatur och/eller av en övergående ischemi. AA kan föregå PNH. En sammanställning från Frankrike visade att 30% av 220 patienter med nydiagnostiserad PNH hade AA (Socie, *et al* 1996). Vid AA finner man ofta en liten klon av PNH-celler. Omvänt kan PNH i vissa fall utvecklas till en manifest AA, varvid benmargssvikten blir det helt dominerande kliniska problemet (Brodsky 2009).

### **Diagnostik**

Vid diagnostik av PNH ingår 3 huvuddelar. Del ett består av att påvisa laboratoriemässiga markörer för hemolys, såsom ökat laktatdehydrogenas, lågt/omätbart haptoglobin, ökat okonjugerat bilirubin samt retikulocytos. Del två är flödescytometri för diagnostik av PNH-klon och den tredje delen är benmargsundersökning för att utesluta/bekräfta annan benmargssjukdom (Parker, *et al* 2005, Richards and Barnett 2007).

#### **Diagnostik vid PNH**

- **Påvisa hemolys (LD↑, okonjugerat bilirubin↑, retikulocyter↑, haptoglobin↓)**
- **Flödescytometri för diagnostik att påvisa PNH-klon**
- **Benmargsundersökning för att utesluta/bekräfta annan benmargssjukdom**

### **Vilka bör undersökas med flödescytometri avseende PNH?**

#### **Hemolys**

Patienter med oklar DAT-negativ hemolys med eller utan samtidig benmargssvikt ska alltid undersökas med avseende på PNH. Laboratoriemässigt 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 laboratoriemässigt mätbar hemolys. Det finns rapporter om att en subklinisk PNH-klon vid AA kan prediktera ett bättre svar på immunsuppressiv behandling jämfört med om PNH-klon saknas (Parker, *et al* 2005, Sugimori, *et al* 2006, Wang, *et al* 2002). Subklinisk PNH klon kan ses vid MDS, men betydelsen är ännu oklar. Det finns dock inget underlag idag för att undersöka patienter, utan tecken till intravasal hemolys, vid MDS eller annan bakomliggande benmärgsmalignitet.

### ***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. Dock bör undersökning utföras på patienter med trombos på ovanlig lokal, såsom buk- eller sinusven. (Parker *et al* 2005, Borowitz, *et al* 2010).

### ***Laboratoriediagnostik***

Cellpopulationer som saknar GPI-förankrade ytmolekyler, så kallade PNH-kloner, påvisas och storleksbestäms i blod (Borowitz, *et al* 2010). PNH-klonens relativa andel av neutrofila celler, monocyter och erythrocyter anges. Vid screening analyseras 5000 celler av respektive cellslag varvid PNH-kloner  $\geq 1\%$  kan påvisas. Med högkänslig metod analyseras 250 000 celler av respektive cellslag och PNH-kloner  $\geq 0,01\%$  kan då påvisas.

PNH-klonen skall 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 cellerna. 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 och inte längre återfinns i blodet. Eventuella erythrocyttransfusioner bidrar också till att sänka andelen PNH-erythrocyter.

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 senast 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 bör övervägande om övrig utredning göras.

- Rutinmässigt bör bestämning av serumkreatinin samt serum Cystatin göras. Utredning för övrigt för bedömning av njurfunktion sker enligt lokala rutiner.

- Vid misstanke på pulmonell hypertention bör natriuretiskt hormon (BNP eller NT-pro BNP) bestämmas. Förhöjda värden predikerar förekomst av pulmonell hypertention. Ekokardiografi bör utföras vid förhöjda värden och/eller klinisk misstanke med bland annat bestämning av trycket i lungkretsloppet och höger kammarens ejektionsfraktion.
- Det är viktigt att diagnosticera/utesluta en portavens- eller mesenterialvenstrombos.
- En progressiv pancytopeni utreds och behandlas principiellt som aplastisk anemi av annan genes.

### **Behandling**

För patienter med klassisk PNH är endast allogent stamcellstransplantation potentiellt kurativ och komplementinhibering med eculizumab är i övrigt den enda behandling som minskar sjukdomsaktiviteten.

### **Antikoagulantia .**

Patienterna har ofta trombocytopeni som kan försvåra handläggningen och blödningsrisken måste alltid beaktas. Trombocyter  $>50 \times 10^9/L$  bör dock inte i normalfallet innebära några absoluta kontraindikationer mot antikoagulantia då trombosinsjuknanden har beskrivits i patienter med nivåer lägre än detta. Patienterna skall erhålla en hämning av plasmakoagulationen i form av warfarin eller lågmolekylärt heparin. Effekten och betydelsen av de nya antikoagulantia dvs framför allt trombinhämmare och faktor Xa hämmare är ännu oklar.

Kontinuerlig antikoagulantia med i första hand warfarin skall erbjudas alla patienter som insjuknar i tromboembolisk sjukdom oavsett klonstorlek (Brodsky 2009). Därtill skall kontinuerlig primärprofylaktisk behandling övervägas till patienter med en klonstorlek  $>50\%$  (Hall et al 2003). Trombocyt nivåerna och blödningsrisken skall regelbundet utvärderas. Eventuellt kan trombofilimarkörer påverka indikationen vid något mindre kloner, men någon generell rekommendation i detta hänseende kan inte ges utan behöver först ytterligare studeras. Eculizumab reducerar risken för trombos och vid samtidig behandling kan man överväga att sätta ut antikoagulantia som förskrivits i primärprofylaktiskt syfte. Vid situationer som i sig ökar risken för trombos, såsom vid operativa ingrepp, kan förlängd profylax med lågmolekylärt heparin övervägas, men vägledande studier saknas.

Trombolytisk behandling kan vara aktuell och bör övervägas i svåra fall (Kuo, *et al* 2006).

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.

### **Blodtransfusioner**

För att öka hemoglobinkoncentrationen och minska anemisyntom kan erytrocyttransfusion bli aktuellt. Risken att accentuera hemolys anses minimal även om icke tvättade blodkomponenter används (Brecher and Taswell 1989). För att minska risken för HLA-immunisering, transfusionsreaktioner kopplade till överföring av donatorleukocyter samt överföring av CMV rekommenderas dock leukocytfiltrerat blod (Parker et al 2005, Brecher et al 1989).

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, *et al* 2007, Parker, *et al* 2005).

## **Järn/folsyra**

På grund av den ökade konsumtionen av folsyra sekundärt till ökad erytropoes rekommenderas, som vid andra hemolytiska tillstånd, substitution med 5 mg folsyra dagligen. På grund av kontinuerlig järnförlust i urinen kan järnbrist uppkomma och järnsubstitution kan bli nödvändig (Borowitz, *et al* 2010, Parker, *et al* 2005, Wang, *et al* 2002).

## **Allogen stamcellstransplantation**

Det finns ett drygt tiotal publikationer kring allogen stamcellstransplantation vid PNH. De flesta av dessa är av äldre datum, inkluderande ett fåtal patienter med konventionell konditionering. På senare år finns några rapporter om icke-myeloablativ konditionering. En äldre registerstudie på 48 patienter visar 56 % och 14 % två- respektive fem-års överlevnad (Saso, *et al* 1999). En nyligen publicerad retrospektiv studie från Italien visade att efter 10 år förblev 57% sjukdomsfria (Santarone, *et al* 2009). Inga trombosor rapporterades under uppföljningstiden. Nackdelen vara att cirka 50% av patienterna utvecklar ”graft versus host disease”. Allogen stamcellstransplantation är idag den enda möjligheten att bota sjukdomen. Emellertid är denna behandling förenad med en hög mortalitet och morbiditet. Stamcellstransplantation rekommenderas enbart för PNH patienter som utvecklar en livshotande cytopeni trots adekvat immunosuppressiv behandling.

## **Ecilizumab (Soliris®)**

År 2007 registrerades den humaniserade monoklonala IgG-antikroppen ecilizumab för behandling vid PNH (Rother, *et al* 2007). Ecilizumab är en komplement inhibitor på C5 vilken hindrar den terminala komplementaktiveringen (Hillmen, *et al* 2004, Hillmen, *et al* 2006). Registreringen bygger på en fas 2 studie och två fas 3 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 ecilizumabgruppen jämfört med 10 i placebogruppen (Hillmen, *et al* 2006). Vid en retrospektiv genomgång av de två fas3-studierna beräknades incidensen av tromboembolism (Hillmen, *et al* 2007). Trombosincidensen reducerades från 7.37/100 patientår till 1.07/100 patientår dvs en 85% riskreduktion. Ecilizumabbehandling minskar risken för organpåverkan såsom pulmonell hypertension och nedsatt njurfunktion. Vid svår PNH-sjukdom ses även signifikant förbättrad livskvalitet (Hillmen, *et al* 2006). Nyligen publicerade data antyder att ecilizumab kan förlänga överlevanden hos patienter med svår klassisk PNH (Kelly, *et al* Blood online 1 April 2011-02-333997).

En nackdel med inhiberingen av C5 är ett försämrat skydd mot meningokockinfektioner. Av denna anledning ska patienten meningokockvaccineras minst ett par 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.

Ecilizumab 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). Enstaka patienter kan ha tecken till ”genombrottshemolys” dag 12-14. Behandling med ecilizumab är potentiellt livslång, men i enstaka fall med sjunkande andel PNH-klon har man kunnat sätta ut behandlingen (Anita Hill, pers. meddelande).

Indikationstexten i FASS lyder: ”Soliris® (ecilizumab) är indikerat för behandling av patienter med paroxysmal nokturn hemoglobinuri (PNH). Data som visar den kliniska nyttan av Soliris® vid behandling av patienter med PNH är begränsade till patienter som tidigare har genomgått transfusioner”. Baserat på tillgängliga studier och i samklang med andra nationella

guidelines anser PNH-gruppen att även vissa patienter med icke-transfusionskrävande PNH kan komma ifråga för behandling med eculizumab

### **Indikationer för eculizumabbehandling vid PNH**

1. Behov av upprepade erytrocyttransfusioner på grund av hemolys.
2. Tidigare livshotande PNH-relaterad trombos
3. Ev. vid graviditet. Varje sådant fall bör diskuteras ingående med PNH-kunnig expertis varvid de teoretiska fördelarna med eculizumab vid graviditet vägs mot det faktum erfarenheten av preparatet i denna situation är mycket begränsad.

*Enstaka patienter med PNH har uttalade sjukdomsrelaterade symtom, men faller ändå utanför någon av ovan nämnda kategorier. Även dessa patienter kan tänkas ha nytta av eculizumab. I väntan på ytterligare kunskap om kliniska effekter av preparatet, samt mot bakgrund av den mycket höga kostnaden, ska dock behandling av sådana patienter endast ske inom ramen för kliniska studier. Diskussion om sådana studier pågår.*

Innan start av eculizumabbehandling ska patienten remitteras till PNH-intresserad hematolog vid regionklinik för bedömning. Om denna(e) anser att eculizumabbehandling kan vara aktuell ska patienten diskuteras i Svenska PNH-gruppen, som sedan avger en rekommendation till patientansvarig hematolog. Patient som ställs på eculizumab ska, förutsatt informerat samtycke, fortlöpande rapporteras till Internationella PNH-registret (se även nedan).

Ovanstående förfarande är obligat och har tillkommit efter diskussioner och i samråd med SKL/NLT.

### **Meningokockvaccination**

Eculizumab blockerar komplementfaktor C5 vilket medför en ökad risk för meningokockinfektioner. Två veckor innan start av behandling bör patienten därför vaccineras. F.n. rekommenderas Novartis' konjugatvaccin Menveo som är tetravalent (serogrupper A, C, W-135 och Y). Vaccinet finns (mars 2011) inte ute på apoteken utan beställs från droghandeln. Ges intramuskulärt (0,5 ml). Patienten bör revaccineras efter tre år. Observera att vaccinet alltså inte ger skydd mot Neisseria meningitidis serotyp B.

Pga det sistnämnda har PNH-gruppen i Leeds valt att ge pc-profylax till alla patienter som behandlas med eculizumab men detta rekommenderas f.n. ej av flertalet övriga centra. Vår rekommendation, efter utförlig diskussion med nationell infektionsexpertis är att avstå från antibiotikaprofylax. Rekommendationen förutsätter givetvis att patienten erhållit adekvat meningokockvaccination.

### **Graviditet**

Gravida kvinnor med PNH löper en kraftigt ökad risk för komplikationer under såväl graviditet, partus som postpartum (Fieni, *et al* 2006, Ray, *et al* 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, *et al* 2006, Ray, *et al* 2000). Nämnda 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 födselar. 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 sannolikt passerar eculizumab inte placenta (Brodsky 2009, Kelly, *et al*). I en aktuell sammanställning från PNH-gruppen i Leeds redovisas i detalj sju kända fall med graviditet under eculizumabbehandling, varav dock endast två erhöll eculizumab under hela graviditeten (Kelly, *et al*). I inget av dessa fall samt övriga fallrapporter sågs negativa effekter av behandlingen (Danilov, *et al*, Marasca, *et al*). Erfarenheten av preparatet hos gravida är dock mycket begränsad, varför det hänförs därför till kategori B2 i FASS med rekommendation att ”Soliris® endast ska ges till gravida kvinnor när absolut nödvändigt” ([www.fass.se](http://www.fass.se)).

Graviditet var ett exklusionskriterium i de tre studier som föregick registrering av eculizumab (Hill, *et al* 2007).

### *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. Detta gäller även om patienten behandlas med eculizumab.
- Vid nydiagnostiserad graviditet hos PNH-patient med sedan tidigare välfungerande eculizumabbehandling finns goda skäl att behålla denna terapi även under graviditeten. Vid tveksamhet-rådgör med PNH-kunnig expertis.
- Vid PNH är graviditet i sig idag inte en formell indikation för eculizumab. Varje enskilt sådant fall bör dock diskuteras med PNH-kunnig expertis där de teoretiska fördelarna med eculizumab vid graviditet vägs mot faktum att erfarenheten av preparatet i denna situation är mycket begränsad.

### *Prognos*

En femårsmortalitet på 35% och medianöverlevnad på ca 10 år har beskrivits i patientkohorter från en tid innan introduktionen av eculizumab (Hillmen, *et al* 1995, Socie, *et al* 1996). Den ökade mortaliteten betingas främst av ökad risk för allvarliga trombosor. I en nyligen publicerad sammanställning från PNH-gruppen i Leeds sågs ingen skillnad i mortalitet mellan PNH-patienter som behandlats med eculizumab (n=79) jämfört med en köns- 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* Blood online 1 April 2011-02-333997).

### **Sjukdomsförlopp och uppföljning av patienter med PNH**

Hos en liten andel patienter med PNH ses spontana remissioner (Hillmen, *et al* 1995). I ett fåtal fall med en stadigt minskande PNH-klon har man, åtminstone för en tid, kunnat sätta ut behandling med eculizumab (Anita Hill, personligt meddelande). PNH kan i vissa fall utvecklas till AA, varvid benmärgssvikten blir det helt dominerande kliniska problemet

(Brodsky 2009). Vid PNH, liksom vid sickle-cell anemi, kan långvarig intravasal hemolys med hemoglobinemi och NO-konsumtion leda till organskador, främst pulmonell hypertension och nedsatt njurfunktion (Hill, *et al*, Rother, *et al* 2005). Våra kunskaper om vilka patienter som har störst risk att utveckla sådana komplikationer är ofullständiga. PNH-relaterade trombosor kan ge allvarliga sequelae, exempelvis portal hypertension efter portavenstrombos.

Det finns alltså 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, trombosor, klonstorlek), transfusionsbehov, järnförråd, indikation för eculizumab eller annan behandling, tidig upptäckt av organtoxicitet samt tecken till benmärgssvikt. Hos dem som behandlas med eculizumab ska behandlingens effekt (symtom, livskvalitet, genombrottshemolys) samt eventuellt 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**

Obligatorisk rapportering till det internationella PNH-registret enligt schema (enligt nedan)

- Första 3 månaderna med eculizumab-behandling: Hb, retikulocyter och LD var 14:e dag (inför varje infusion).
- Efter 6 veckors behandling med eculizumab: Läkarbesök med anamnes (PNH-relaterade symtom, livskvalitet, ev. trombosor, ev. transfusioner), blodtryck samt blodprov för analys av Hb, reticulocyter, LPK, neutrofiler, TPK. LD, krea, ferritin, 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 6:e månad från start av eculizumab: Som ovan samt ferritin och flödescytometri (granulocyter, erythrocyter) för värdering av klonstorlek. NT-proBNP och njurfunktionsbedömning (utöver s-krea) kan övervägas.

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

Rekommenderas starkt rapportering till det internationella PNH-registret enligt schema (enligt nedan)

- Dessa patienter monitoreras i princip på samma sätt som de som behandlas med eculizumab inklusive rapportering till det nationella PNH-registret. Vissa mildare fall kan dock följas mer sällan, exempelvis var 6:e månad och med flödescytometri för bestämning av PNH-klon endast en gång per år.

### **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](http://www.nmds.org)) respektive aplastisk anemi (under utarbetande)*

### **Informationsplikt**

JA, MB, SJ och PJ har erhållit föreläsararvode samt ML har erhållit forskningsbidrag av Alexion Pharmaceuticals.

## PNH-registret – en register-/observationsstudie

Det internationella PNH-registret skapades efter krav från EMA och FDA vid registrering 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 naturlförloppet vid PNH-sjukdom såväl med som utan eculizumabbehandling. Registret är således öppet för alla patienter med PNH-sjukdom oberoende av terapi.

Till PNH-registret rapporteras demografiska data inkluderande tidigare sjukdomar, aktuell medicinering, laboratoriedata relaterade till PNH-sjukdomen, klonstorlek av PNH. Prospektivt följs var 6:e månad. bl.a. antal blodtransfusioner, hemolysprover, trombosor, livskvalitetsundersökning med Facit-Fatigue och EORTC QLG-C30, mortalitet och morbiditet inkluderande ev. andra maligniteter samt infektioner och graviditet. För patienter behandlade med eculizumab registreras dessutom meningokockvaccinaton-status, förlopp om eculizumab avbryts, infusionsreaktioner och doseringsinformation hos patienter som behandlas utanför 12-16 dagars intervall. Uppföljningstiden är primärt 5 år men antagligen kommer denna förlängas.

Registret stöds ekonomiskt av Alexion Pharmaceuticals, men monitoreras av ICON clinical research. Idag (mars 2011) är drygt 800 patienter inkluderade världen över. Sammanställningar på internationell nivå görs 1-2 ggr/år. Varje rapporterende klinik har rätt att få ut sina egna rapporterade data. Nationell huvudprövare har möjlighet att göra regelbundna sammanställningar och analyser på nationell nivå, vilket också är PNH-gruppens avsikt. Huvudprövare i Sverige är fn Peter Johansson.

Svenska PNH-gruppen är angelägen att alla PNH-patienter oavsett terapi inkluderas i registret. Vad gäller patienter som behandlas med eculizumab är rapportering till registret ett krav, men förutsätter givetvis patientens informerade samtycke. För att inkludera patienter - kontakta i första hand nationell huvudprövare. Viss ersättning utgår, via Alexion Pharmaceuticals, för deltagande i denna register-/observationsstudie. Denna ersättning går till deltagande klinik.

Diskussioner förs för närvarande om att på sikt skapa ett svenskt eller nordiskt företagsoberoende PNH-register.

## Referenser

- Araten, D.J., Thaler, H.T. & Luzzatto, L. (2005) High incidence of thrombosis in African-American and Latin-American patients with Paroxysmal Nocturnal Haemoglobinuria. *Thromb Haemost*, **93**, 88-91.
- Borowitz, M.J., Craig, F.E., Digiuseppe, J.A., Illingworth, A.J., Rosse, W., Sutherland, D.R., Wittwer, C.T. & Richards, S.J. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*, **78**, 211-230.
- Brecher, M.E. & Taswell, H.F. (1989) Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and the transfusion of washed red cells. A myth revisited. *Transfusion*, **29**, 681-685.
- Brodsky, R.A. (2008) Advances in the diagnosis and therapy of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood Rev*, **22**, 65-74.
- Brodsky, R.A. (2009) How I treat paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*, **113**, 6522-6527.
- Brodsky, R.A., Young, N.S., Antonioli, E., Risitano, A.M., Schrezenmeier, H., Schubert, J., Gaya, A., Coyle, L., de Castro, C., Fu, C.L., Maciejewski, J.P., Bessler, M., Kroon, H.A., Rother, R.P. & Hillmen, P. (2008) Multicenter phase 3 study of the complement

- inhibitor eculizumab for the treatment of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*, **111**, 1840-1847.
- Cappellini, M.D. (2007) Coagulation in the pathophysiology of hemolytic anemias. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 74-78.
- Danilov, A.V., Brodsky, R.A., Craigo, S., Smith, H. & Miller, K.B. Managing a pregnant patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in the era of eculizumab. *Leuk Res*, **34**, 566-571.
- de Latour, R.P., Mary, J.Y., Salanoubat, C., Terriou, L., Etienne, G., Mohty, M., Roth, S., de Guibert, S., Maury, S., Cahn, J.Y. & Socie, G. (2008) Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: natural history of disease subcategories. *Blood*, **112**, 3099-3106.
- 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. *Obstet Gynecol Surv*, **61**, 593-601.
- Hall, C., Richards, S. & Hillmen, P. (2003) Primary prophylaxis with warfarin prevents thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Blood*, **102**, 3587-3591.
- Hill, A. (2006) The incidence and prevalence of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and survival of patients in Yorkshire. *Blood*, **108a:Abstract 985**.
- Hill, A., Richards, S.J. & Hillmen, P. (2007) Recent developments in the understanding and management of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol*, **137**, 181-192.
- Hill, A., Rother, R.P., Wang, X., Morris, S.M., Jr., Quinn-Senger, K., Kelly, R., Richards, S.J., Bessler, M., Bell, L., Hillmen, P. & Gladwin, M.T. (2010) Effect of eculizumab on haemolysis-associated nitric oxide depletion, dyspnoea, and measures of pulmonary hypertension in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol*, **149**, 414-425.
- Hillmen, P., Elebute, M., Kelly, R., Urbano-Ispizua, A., Hill, A., Rother, R.P., Khursigara, G., Fu, C.L., Omine, M., Browne, P. & Rosse, W. (2010) Long-term effect of the complement inhibitor eculizumab on kidney function in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Am J Hematol*, **85**, 553-559.
- Hillmen, P., Hall, C., Marsh, J.C., Elebute, M., Bombara, M.P., Petro, B.E., Cullen, M.J., Richards, S.J., Rollins, S.A., Mojcik, C.F. & Rother, R.P. (2004) Effect of eculizumab on hemolysis and transfusion requirements in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med*, **350**, 552-559.
- Hillmen, P., Lewis, S.M., Bessler, M., Luzzatto, L. & Dacie, J.V. (1995) Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med*, **333**, 1253-1258.
- Hillmen, P., Muus, P., Duhrsen, U., Risitano, A.M., Schubert, J., Luzzatto, L., Schrezenmeier, H., Szer, J., Brodsky, R.A., Hill, A., Socie, G., Bessler, M., Rollins, S.A., Bell, L., Rother, R.P. & Young, N.S. (2007) Effect of the complement inhibitor eculizumab on thromboembolism in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*, **110**, 4123-4128.
- Hillmen, P., Young, N.S., Schubert, J., Brodsky, R.A., Socie, G., Muus, P., Roth, A., Szer, J., Elebute, M.O., Nakamura, R., Browne, P., Risitano, A.M., Hill, A., Schrezenmeier, H., Fu, C.L., Maciejewski, J., Rollins, S.A., Mojcik, C.F., Rother, R.P. & Luzzatto, L. (2006) The complement inhibitor eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med*, **355**, 1233-1243.
- Kelly, R., Arnold, L., Richards, S., Hill, A., Bomken, C., Hanley, J., Loughney, A., Beauchamp, J., Khursigara, G., Rother, R.P., Chalmers, E., Fyfe, A., Fitzsimons, E., Nakamura, R., Gaya, A., Risitano, A.M., Schubert, J., Norfolk, D., Simpson, N. & Hillmen, P. The management of pregnancy in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria on long term eculizumab. *Br J Haematol*, **149**, 446-450.

- Kuo, G.P., Brodsky, R.A. & Kim, H.S. (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.
- Marasca, R., Coluccio, V., Santachiara, R., Leonardi, G., Torelli, G., Notaro, R. & Luzzatto, L. (2010) Pregnancy in PNH: another eculizumab baby. *Br J Haematol*, **150**, 707-708.
- Miyata, T., Yamada, N., Iida, Y., Nishimura, J., Takeda, J., Kitani, T. & Kinoshita, T. (1994) Abnormalities of PIG-A transcripts in granulocytes from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med*, **330**, 249-255.
- Moyo, V.M., Mukhina, G.L., Garrett, E.S. & Brodsky, R.A. (2004) Natural history of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria using modern diagnostic assays. *Br J Haematol*, **126**, 133-138.
- Nishimura, J., Kanakura, Y., Ware, R.E., Shichishima, T., Nakakuma, H., Ninomiya, H., Decastro, C.M., Hall, S., Kanamaru, A., Sullivan, K.M., Mizoguchi, H., Omine, M., Kinoshita, T. & Rosse, W.F. (2004) Clinical course and flow cytometric analysis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in the United States and Japan. *Medicine (Baltimore)*, **83**, 193-207.
- Parker, C., Omine, M., Richards, S., Nishimura, J., Bessler, M., Ware, R., Hillmen, P., Luzzatto, L., Young, N., Kinoshita, T., Rosse, W. & Socie, G. (2005) Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*, **106**, 3699-3709.
- Parker, C.J. (2002) Historical aspects of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: 'defining the disease'. *Br J Haematol*, **117**, 3-22.
- Ray, J.G., Burows, R.F., Ginsberg, J.S. & Burrows, E.A. (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.
- Richards, S.J. & Barnett, D. (2007) The role of flow cytometry in the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in the clinical laboratory. *Clin Lab Med*, **27**, 577-590, vii.
- Rother, R.P., Bell, L., Hillmen, P. & Gladwin, M.T. (2005) The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *Jama*, **293**, 1653-1662.
- Rother, R.P., Rollins, S.A., Mojcik, C.F., Brodsky, R.A. & Bell, L. (2007) Discovery and development of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Nat Biotechnol*, **25**, 1256-1264.
- Santarone, S., Bacigalupo, A., Risitano, A.M., Tagliaferri, E., Di Bartolomeo, E., Iori, A.P., Rambaldi, A., Angelucci, E., Spagnoli, A., Papineschi, F., Tamiazzo, S., Di Nicola, M. & Di Bartolomeo, P. (2009) Hematopoietic stem cell transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: long-term results of a retrospective study on behalf of the Gruppo Italiano Trapianto Midollo Osseo (GITMO). *Haematologica*.
- Saso, R., Marsh, J., Cevreska, L., Szer, J., Gale, R.P., Rowlings, P.A., Passweg, J.R., Nugent, M.L., Luzzatto, L., Horowitz, M.M. & Gordon-Smith, E.C. (1999) Bone marrow transplants for paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol*, **104**, 392-396.
- Sloand, E.M., Pfannes, L., Scheinberg, P., More, K., Wu, C.O., Horne, M. & Young, N.S. (2008) Increased soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR) is associated with thrombosis and inhibition of plasmin generation in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) patients. *Exp Hematol*, **36**, 1616-1624.
- Socie, G., Mary, J.Y., de Gramont, A., Rio, B., Leporrier, M., Rose, C., Heudier, P., Rochant, H., Cahn, J.Y. & Gluckman, E. (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., Mizoguchi, H., Omine, M. & Nakao, S. (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.
- [www.health.gov.au/lmdp](http://www.health.gov.au/lmdp) (2010) *Guidelines for the treatment of Paroxysmal Nocturnal Haemoglobinuria (PNH) through the Life Saving Drugs Program*. Australian Government Department of Health and Ageing.

## **Bilaga 1.**

### **Flödescytometrisk undersökning**

Vid leukocytundersökningen lyseras erythrocyterna; alla idag använda lyseringsmetoder kan användas. 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. Vid högkänslig metod måste flerfärgsanalys användas. 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 däremot kan inte FLAER användas.

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 (till exempel blod i K<sub>2</sub>-EDTA), provtagningstid, analysstidpunkt och eventuella avvikelser i provmaterialet (koagel, synlig hemolys). De reagens som använts för respektive cellslag samt använd metod inklusive ”gatingstrategi” skall anges. Antalet analyserade neutrofila celler, monocyter och erythrocyter skall anges. PNH-klonens storlek och typ (II eller III) skall anges för varje cellslag.

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