



# Diagnosis dan Tatalaksana *Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria*

**Cecile**

Rumah Sakit Karitas, Kota Tambolaka, Sumba Barat Daya, Indonesia

## ABSTRAK

*Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria* (PNH) merupakan kelainan sel hematopoiesis didapat yang menyebabkan hemolisis intravaskular dan berisiko tinggi trombosis. PNH terdiri dari PNH klasik, PNH terkait kegagalan sumsum tulang, dan PNH subklinis. Diagnosis PNH dengan *flow cytometry* (FCM). Terapi PNH saat ini menggunakan *eculizumab*, *ravulizumab*, dan transplantasi sel punca alogenik.

**Kata kunci:** *Eculizumab*, hemolisis intravaskular, *paroxysmal nocturnal hemoglobinuria* (PNH), *ravulizumab*

## ABSTRACT

Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is an acquired disorder of hematopoietic stem cell causing intravascular hemolysis and high risk of thrombosis. It can be differentiated into: classical PNH, PNH associated with bone marrow failure, and subclinical PNH. Diagnosis is made by flow cytometry. PNH is treated with *eculizumab*, *ravulizumab*, and allogenic stem cell transplantation. **Cecile. Diagnosis and Management of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria**

**Keywords:** *Eculizumab*, intravascular hemolysis, *paroxysmal nocturnal hemoglobinuria*, *ravulizumab*

## PENDAHULUAN

*Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria* (PNH) merupakan kelainan sel hematopoiesis yang langka dan didapat akibat mutasi somatik pada gen *phosphatidylinositol glycan class A* (PIG-A).<sup>1</sup> Penyakit ini memengaruhi eritrosit, leukosit, trombosit, dan sel endotelial. Insidens PNH diperkirakan 0,1 – 0,2/100.000 orang setiap tahun.<sup>2</sup> Gen PIG-A dibutuhkan untuk sintesis *glycosyl phosphatidylinositol* (GPI) untuk melekatkan beberapa protein ke membran sel. Kekurangan sintesis GPI membuat kurangnya ekspresi berbagai variasi protein pada sel hematopoiesis dan semua jenis sel yang berkaitan.<sup>3</sup>

Defisiensi membran protein GPI yang dikenal dengan nama CD55 dan CD 59 berperan penting dalam sensitivitas komplemen terhadap sel darah merah pada penyakit PNH. CD55 merupakan faktor akselerasi kerusakan, yang mencegah formasi dan memperbesar instabilitas konverter C3 dalam kaskade komplemen. CD59 merupakan membran *inhibitor* lisis reaktif, yang berfungsi mencegah pertemuan antara membran dan kompleks komplemen. Defisiensi CD55 dan CD59

menyebabkan episode hemolisis intravaskular yang khas untuk penyakit PNH.<sup>3,4</sup>

Konsentrasi hemoglobin bebas dalam plasma meningkat akibat proses hemolisis dan hal ini berdampak pada pengambilan oksida nitrat. Penurunan konsentrasi oksida nitrat menyebabkan beberapa gejala seperti disfagia dan nyeri abdomen karena distonia otot polos, disfungsi ereksi, gagal ginjal, hipertensi arteri, dan hipertensi pulmonal yang disebabkan konstiksi arteri serta risiko tinggi trombosis arteri dan vena.<sup>1,5</sup>

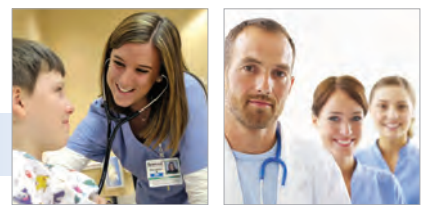
## DIAGNOSIS

Diagnosis PNH dahulu dibuat dengan cara aktivasi komplemen *in vitro* dengan asam (tes Ham's) dan tes sukrosa hemolisis.<sup>6</sup> Kedua tes ini telah ditinggalkan karena tidak spesifik, dan digantikan dengan *flow cytometry* (FCM).<sup>3</sup> FCM dapat mengevaluasi populasi sel darah yang berbeda, menghitung kuantitas ukuran klon PNH dan karakteristiknya secara tepat serta mempunyai sensitivitas tinggi untuk mendeteksi populasi klon PNH yang kecil (sampai dengan < 0,01%).<sup>7</sup>

FCM pada awalnya menggunakan antibodi poliklonal tidak terkonjugasi atau antibodi monoklonal anti-CD55 dan teknik fluoresensi tidak langsung untuk deteksi populasi PNH dalam eritrosit, leukosit, dan trombosit. Setelah itu, FCM menggunakan antibodi monoklonal dan reagen khusus bernama FLAER yang spesifik berikatan pada GPI dan antibodi monoklonal yang terkonjugasi fluorokrom. FCM saat ini dipakai secara luas sebagai standar baku emas untuk diagnosis PNH. FCM dapat digunakan untuk mengidentifikasi populasi PNH di dalam eritrosit, neutrofil, monosit, trombosit, retikulosit, eosinofil, dan limfosit.<sup>7</sup>

PNH mempunyai karakteristik berupa fenotip mozaik sel darah perifer, yang dibedakan berdasarkan perbedaan kuantitatif ekspresi CD55 dan CD59. Sel PNH tipe I mempunyai sensitivitas yang normal terhadap komplemen dan mengekspresikan protein GPI dengan densitas normal. Sel PNH tipe II 2-4 kali lebih sensitif terhadap komplemen dibandingkan dengan yang normal (defisiensi sebagian protein CD55 dan CD59) dan sel PNH tipe III 15-25 kali lebih sensitif terhadap komplemen

**Alamat Korespondensi** email: [cecile.siauww@gmail.com](mailto:cecile.siauww@gmail.com)



(defisiensi CD55 dan CD59 secara komplrit). FCM dapat membedakan ketiga populasi ini secara akurat.<sup>6,8</sup>

Skринing PNH direkomendasikan menggunakan FCM jika pasien mempunyai satu dari empat kriteria berikut: (i) usia di bawah 50 tahun, (ii) mempunyai trombotosis di tempat yang tidak biasa (vena intra-abdomen, vena serebral, vena kulit, dan sebagainya), (iii) mempunyai bukti hemolisis atau (iv) mempunyai sitopenia.<sup>9</sup>

Skринing PNH menggunakan FCM mempunyai beberapa keterbatasan antara lain tidak semua laboratorium dapat menyediakan tes ini, terdapat perbedaan metode pemilihan antibodi pendeteksi antar laboratorium, dan angka positif palsu serta negatif palsu yang cukup tinggi.<sup>10</sup> Usaha-usaha dikembangkan untuk membuat prosedur ini menjadi lebih sensitif dan terstandarisasi. Pada tahun 2010, *International Clinical Cytometry Society* (ICCS) mempublikasikan pedoman pertama untuk mendiagnosis dan memantau PNH. Sutherland, *et al*, melengkapi pedoman tersebut dengan menawarkan pemilihan antibodi monoklonal yang optimal untuk meningkatkan sensitivitas. Selain itu, terdapat protokol praktis dan strategi analisis detail untuk mendeteksi eritrosit dan leukosit (granulosit dan monosit) PNH. Dengan pedoman ini, performa laboratorium menjadi sangat baik.<sup>11</sup>

Pendekatan diagnosis PNH juga membutuhkan tes lain seperti hitung darah lengkap, hitung retikulosit, laktat dehidrogenase (LDH), bilirubin, haptoglobin, kadar hemosiderinuria, evaluasi cadangan besi, aspirasi sumsum tulang, biopsi, dan sitogenetika.<sup>3</sup> Tes tersebut penting untuk menentukan jenis anemia, sitopenia, dan untuk mengetahui adanya hemolisis intravaskular.<sup>7</sup>

### KLINIS

PNH digolongkan menjadi tiga jenis, yaitu PNH klasik, PNH terkait kegagalan sumsum tulang, dan PNH subklinis.<sup>3</sup>

#### PNH Klasik

PNH klasik banyak ditemukan pada usia muda berupa anemia hemolitik intravaskular yang disebabkan oleh aktivasi komplemen terus-menerus. Aktivasi komplemen dicetuskan oleh infeksi, aktivitas berat, prosedur pembedahan,

dan konsumsi alkohol.<sup>12</sup> Gejala PNH klasik adalah anemia (kadar hemoglobin <12 g/dL), hemoglobinuria (kebanyakan terlihat pada pagi hari karena kadar pH dan perubahan osmolaritas), *jaundice*, dan gejala umum seperti malaise dan kelelahan. Tidak terdapat bukti adanya kegagalan sumsum tulang (neutrofil >1500/ $\mu$ L, trombosit >120.000/ $\mu$ L).<sup>2</sup> Selain itu, dapat ditemukan peningkatan LDH, penurunan haptoglobin, hiperbilirubinemia tak terkonjugasi, dan peningkatan retikulosit karena respons kompensasi dari sumsum tulang.<sup>7</sup> Komplikasi yang dapat terjadi adalah trombotosis, gagal ginjal, infeksi rekuren, serta risiko sindrom mielodisplastik (5,0%) dan leukemia mieloid akut (2,5%).<sup>2,6</sup> Pemeriksaan FCM menunjukkan populasi klon yang besar (>50%).<sup>8</sup>

#### PNH Terkait Kegagalan Sumsum Tulang (Anemia Aplastik dan Sindrom Mielodisplastik)

Mayoritas pasien PNH terkait anemia aplastik mengekspresikan klon PNH dalam jumlah kecil (<10%). Pemeriksaan laboratorium (dengan atau tanpa hemolisis) menunjukkan dua atau tiga jenis sitopenia (hemoglobin <10 d/dL, neutrofil <1.000/ $\mu$ L, trombosit <80.000/ $\mu$ L).<sup>6</sup> Penelitian melaporkan pemeriksaan klon PNH mencapai 60% pada semua anemia aplastik dan mencapai 20% pada semua sindrom mielodisplastik risiko rendah dengan menggunakan FCM. *British Society for Standards in Haematology* merekomendasikan skrining PNH pada semua pasien anemia aplastik menggunakan FCM dan pasien harus dipantau secara berkala.<sup>8,13,14</sup>

#### PNH Subklinis

Diagnosis PNH subklinis ditegakkan jika jumlah klon PNH <1% tanpa hemolisis atau trombotosis.<sup>2</sup> Pasien PNH subklinis tidak mempunyai gejala klinis.<sup>7</sup>

#### Trombotosis pada PNH

Trombotosis terjadi pada 40% pasien PNH dan menjadi penyebab kematian utama penyakit ini. Kejadian trombotosis meningkatkan risiko kematian sebanyak 5 hingga 10 kali lipat. Pengobatan trombotosis masih menjadi tantangan utama pada PNH.<sup>15</sup>

Kejadian trombotosis vena terjadi pada 85% kasus PNH, trombotosis arteri juga cukup sering, yaitu sekitar 15% kasus. Trombotosis dapat terjadi di lokasi biasa seperti trombotosis

vena dalam, emboli paru, infark miokard atau sistem saraf sentral, dan juga dapat terjadi di dalam vena hepatis (sindroma Budd-Chiari), sinus kavernosus, vena mesenterika, atau vena kulit.<sup>16</sup>

Peningkatan risiko trombotosis dilaporkan pada orang Afrika Amerika atau Amerika latin.<sup>17</sup> Risiko lebih rendah pada pasien PNH yang berasal dari Jepang dan Cina.<sup>15</sup>

### TERAPI

Terapi PNH bervariasi dan tergantung jenis PNH. Pada PNH subklinis, pasien tidak mempunyai gejala dan tidak perlu terapi, tetapi membutuhkan pemantauan setiap 6 -12 bulan karena penyakit dapat berkembang menjadi PNH klasik.<sup>3</sup> Pemantauan dilakukan untuk kemungkinan adanya kegagalan sumsum tulang yang mendasari.<sup>8</sup>

Terapi PNH terkait kegagalan sumsum tulang didasarkan pada terapi sindrom kegagalan sumsum tulang yang mendasarinya, adalah terapi immunosupresif atau transplantasi sumsum tulang alogenik.<sup>3</sup> Namun, pada PNH yang mempunyai klon besar, terapi immunosupresif dapat bermasalah; supresi sel T dapat membuat ekspansi klon bertambah dan membuat hemolisis dan trombotosis makin parah.<sup>18</sup>

Terapi PNH klasik saat ini telah berkembang dengan penemuan obat *eculizumab* dan *ravulizumab*. PNH terkait kegagalan sumsum tulang yang mempunyai klon besar juga dapat diterapi dengan *eculizumab*.<sup>3,7,19</sup>

#### *Eculizumab*

*Eculizumab* merupakan antibodi monoklonal yang dapat menghambat aktivasi komplemen terminal C5 dan mencegah formasi C5a dan C5b-9 serta mencegah hemolisis.<sup>3,20</sup> *Eculizumab* diadministrasikan melalui infus intravena selama 25 – 45 menit. Dosis induksi adalah 600 mg, diberikan setiap 7 hari sebanyak 4 dosis, dilanjutkan dengan dosis 900 mg 7 hari berikutnya, kemudian dilanjutkan terapi pemeliharaan dengan dosis 900 mg selama 14 hari berikutnya.<sup>2</sup>

Efek *eculizumab* pada PNH dijelaskan di dalam studi TRIUMPH, yang merupakan studi fase 3 acak plasebo-kontrol. Pada pasien PNH tergantung transfusi dengan cadangan sumsum tulang baik, *eculizumab*



dapat mengurangi hemolisis dan kebutuhan transfusi, kejadian anemia, kelelahan, serta meningkatkan kualitas hidup.<sup>21</sup> Studi kedua bernama SHEPHERD, sebuah studi terbuka fase 3, meneliti keamanan dan keberhasilan *eculizumab* jangka panjang. Delapan puluh lima dari 97 pasien yang mendapat terapi berespons cepat dan dapat mempertahankan inhibisi hemolisis secara komplit. Efek samping yang umum adalah nyeri kepala, nasofaringitis, dan infeksi saluran pernapasan atas. Peneliti menyimpulkan bahwa *eculizumab* dapat ditoleransi dengan baik. *Eculizumab* juga aman dan efektif digunakan pada wanita hamil dan anak-anak.<sup>19,22</sup> Inhibisi komplemen yang efektif dapat terganggu dengan adanya infeksi, yang dapat memicu hemolisis berulang, sehingga antibiotik juga dibutuhkan sebagai salah satu terapi.<sup>23</sup> Penelitian menunjukkan kejadian tromboemboli pada pasien dengan *eculizumab* (4%) lebih rendah dibandingkan dengan kohort historis (27%).

*Eculizumab* diteliti sebagai obat yang efisien dalam mengurangi insidens kumulatif tromboemboli, namun tidak dapat mengeliminasi tromboemboli secara komplit.<sup>20</sup>

Pasien PNH yang menerima *eculizumab* mempunyai peningkatan risiko terhadap sepsis *Neisseria*. Serotipe B merupakan serotipe infeksi *Neisseria meningitidis* yang paling sering terjadi di Belgia, saat ini belum ada vaksin untuk serotipe B. Vaksinasi dengan serotipe A, C, W, dan Y sangat direkomendasikan, setidaknya 14 hari sebelum menerima dosis pertama *eculizumab* dan diulang setiap 3 – 5 tahun. Beberapa peneliti menyarankan pemberian antibiotik profilaksis pada semua pasien PNH yang menerima *eculizumab* (penicillin V 500 mg dua kali sehari atau eritromisin 500 mg dua kali sehari).<sup>24</sup> Kelemahan lain *eculizumab* adalah harganya yang mahal, ditambah dengan kebutuhan konsumsi obat ini seumur hidup untuk mempertahankan inhibisi komplemen terminal.<sup>2</sup> Biaya pengobatan *eculizumab* di Amerika Serikat mencapai US\$600.000 per tahun.<sup>7</sup>

Beberapa pasien mengalami hemolisis intravaskular berulang (peningkatan LDH dan gejala klinis) di akhir siklus terapi. Untuk mencegah kejadian tersebut durasi pengobatan setiap siklus diperpendek menjadi 12 atau 13 hari atau dengan

meningkatkan dosis *eculizumab*. Beberapa pasien dilaporkan tidak mengalami perbaikan atau sedikit perbaikan dalam hal anemia dan gejala konstitusional; hal ini disebabkan karena peningkatan hemolisis ekstrasvaskular selama terapi. Untuk hemolisis ekstrasvaskular selama terapi, tidak ada terapi tambahan selama tidak ada gejala anemia atau gejala konstitusional. Beberapa peneliti menyarankan kortikosteroid atau splenektomi pada hemolisis ekstrasvaskular simptomatik karena dapat menghilangkan fungsi sel fagosit.<sup>3,8,23</sup>

#### **Ravulizumab**

Pada tahun 2018 telah dikembangkan obat lain bernama *ravulizumab* yang didesain untuk melengkapi kekurangan *eculizumab*, terutama dalam hal dosis, jadwal pemberian, dan waktu paruh. *Ravulizumab* telah menjalani studi klinis fase I, II, dan III.<sup>19</sup> Efek samping *ravulizumab* adalah nyeri kepala ringan. *Ravulizumab* terbukti tidak lebih inferior dibandingkan *eculizumab* dalam terapi jangka pendek. Kedua obat tersebut mempunyai profil keamanan dan efek samping yang sama.<sup>19</sup>

*Ravulizumab* lebih unggul dalam hal frekuensi pemberian dibandingkan *eculizumab*. *Ravulizumab* diberikan setiap 8 minggu dan tentunya lebih meringankan biaya. *Ravulizumab* mempunyai waktu paruh 32 hari (3-4 kali lipat lebih lama dari *eculizumab*). Total biaya *ravulizumab* dalam setahun adalah sebesar US\$458.000, sekitar 10% lebih rendah daripada biaya *eculizumab*. *Ravulizumab* juga mempunyai hubungan dengan laju penurunan hemolisis berulang. *Ravulizumab* secara resmi telah diterima sebagai obat pilihan kedua untuk pasien dewasa dengan PNH oleh *Food and Drug Administration* Amerika Serikat.<sup>19</sup> Saat ini, efektivitas dan keamanan penggunaan *ravulizumab* untuk terapi jangka panjang masih diteliti. Belum ada data yang menyatakan bahwa *ravulizumab* aman untuk wanita hamil dan anak-anak.<sup>19</sup>

#### **Transplantasi Sel Punca Alogenik**

Opsi kuratif lain adalah transplantasi sel punca alogenik.<sup>2,12</sup> Sayangnya, prosedur ini terbatas karena kurangnya donor yang cocok dan tingginya tingkat morbiditas dan mortalitas terkait terapi. Probabilitas kelangsungan hidup 2 tahun dengan metode ini adalah sebesar 56%.<sup>2</sup> Saat ini, transplantasi sel punca alogenik hanya direkomendasikan pada pasien PNH yang tidak mendapat akses terapi

*eculizumab*. Transplantasi sel punca alogenik tidak direkomendasikan pada pasien PNH yang mempunyai trombosis.<sup>25</sup>

#### **Terapi Antikoagulan pada PNH dengan Trombosis**

Komplikasi tromboemboli menjadi penyebab morbiditas dan mortalitas utama pada PNH, untuk itu diperlukan profilaksis. Obat antikoagulan seperti heparin disarankan diberikan pada kejadian trombosis akut, dengan tetap memperhatikan kontraindikasi absolut obat tersebut (contoh: *stroke* hemoragik). Terapi trombolitik juga dapat diberikan langsung pada tempat trombosis, dan disarankan penggunaannya pada sindrom Budd-Chiari akut. Coumadin, suatu obat antagonis vitamin K dapat diberikan pada pasien PNH yang memerlukan terapi antikoagulan jangka panjang.

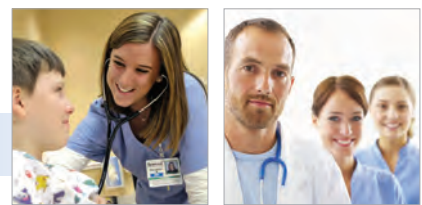
Salah satu kontraindikasi absolut pemberian antikoagulan adalah trombositopenia yang terkadang menjadi salah satu komplikasi PNH. Solusi trombositopenia adalah transfusi untuk mempertahankan jumlah trombosit dalam jumlah normal, dibandingkan dengan opsi menahan terapi antikoagulan.<sup>8</sup>

Terapi suportif untuk PNH klasik adalah transfusi sel darah merah. Transfusi umumnya efisien karena dapat mengurangi hemolisis dengan mensupresi eritropoesis. Eritropoietin diketahui dapat meningkatkan gejala hemolisis pada PNH; tetap boleh digunakan pada pasien anemia yang menetap dan tergantung pada transfusi dan mempunyai kadar eritropoietin rendah.<sup>3</sup>

Penggunaan kortikosteroid jangka panjang sebaiknya dihindari karena mempunyai efek toksisitas yang signifikan; dapat digunakan jangka pendek sebagai terapi hemolisis akut. Beberapa pasien penderita PNH klasik dengan anemia hemolitik autoimun yang refrakter merespons pemberian danazol.<sup>3,6</sup>

#### **PROGNOSIS**

PNH merupakan penyakit hematologi unik dengan prognosis yang masih sulit diprediksi. PNH dapat mempengaruhi kualitas hidup pasien secara dramatis dan menyebabkan kelelahan. Beberapa pasien PNH dilaporkan mengalami remisi spontan tanpa terapi dan nilai LDH kembali normal. Namun, penyebab remisi spontan sampai saat ini belum diketahui.<sup>26</sup>



PNH mempunyai risiko rendah untuk berkembang menjadi kegagalan sumsum tulang seperti anemia aplastik dan sindrom mielodisplastik. Identifikasi faktor risiko berkembangnya PNH menjadi kegagalan sumsum tulang dapat membantu deteksi dini serta intervensi terapeutik dalam waktu yang tepat.<sup>8,25</sup>

Setelah penemuan obat *eculizumab*, pasien PNH mempunyai keluaran dan harapan hidup yang lebih baik. Dalam 10 tahun terakhir, studi

register skala lokal, nasional dan internasional menyebutkan bahwa anemia dan tromboemboli merupakan komplikasi yang sering pada PNH, dan keduanya membaik setelah diterapi dengan *eculizumab*.<sup>26</sup> Pasien PNH dengan gagal ginjal kronik memiliki fungsi ginjal yang stabil dan dapat kembali normal setelah terapi *eculizumab*.<sup>20,26</sup>

### SIMPULAN

PNH merupakan kelainan sel hematopoiesis

yang langka dan didapat akibat mutasi somatik gen PIG-A. PNH terbagi menjadi tiga jenis, yaitu PNH klasik, PNH terkait kegagalan sumsum tulang, dan PNH subklinis. Ketiga jenis PNH dapat dibedakan dan didiagnosis dengan *flow cytometry*. PNH klasik dapat diterapi dengan *eculizumab*, *ravulizumab*, dan transplantasi sel punca alogenik. Prognosis PNH sulit diprediksi, namun pasien PNH saat ini mempunyai hasil luaran dan harapan hidup yang baik sejak penemuan obat *eculizumab*.

### DAFTAR PUSTAKA

1. Père NM, Lenaerts T, Pacheco JM, Dingli D. Evolutionary dynamics of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *PLOS Computational Biology* 2018;14(6): e1006133. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006133>
2. Devalet B, Mullier F, Chatelain B, Dogne JM, Chatelain C. Pathophysiology, diagnosis, and treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: A review. *Eur J Haematol* 2015;95(3):190-8.
3. Parker CJ. Management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in the era of complement inhibitory therapy. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program* 2011;2011(1):21-9.
4. Borowitz MJ, Craig FE, DiGiuseppe JA, Illingworth AJ, Rosse W, Sutherland DR, et al. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. *Clin Cytometry* 2010;78B(4).
5. Weitz IC. Thrombosis in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Semin Thromb Hemost*. 2011;37(3):315-21.
6. de Latour RP, Mary JY, Salanoubat C, Terriou L, Etienne G, Mohty M, et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Natural history of disease subcategories. *Blood* 2008;112(8):3099-106.
7. Parker CJ. Update on the diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2016;2016(1):208-16.
8. Lima M. Laboratory studies for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, with emphasis on flow cytometry. *Pract Lab Med*. 2020;20:e00158.
9. Hill A, Kelly RJ, Hillmen P. Thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2013;121(25):4985-96.
10. Richards SJ, Whitby L, Cullen MJ, Dickinson AJ, Granger V, Reilly JT, et al. Development and evaluation of a stabilized whole-blood preparation as a process control material for screening of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*. 2009;76B(1):47-55.
11. Sutherland DR, Keeney M, Illingworth A. Practical guidelines for the high-sensitivity detection and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*. 2012;82B(4):195-208.
12. Pu JJ, Brodsky RA. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria from bench to bedside. *Clin Transl Sci*. 2011;4(3):219-24.
13. Wang H, Chuhjo T, Yasue S, Omine M, Nakao S. Clinical significance of a minor population of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-type cells in bone marrow failure syndrome. *Blood* 2002;100(12):3897-902.
14. Sugimori C, Chuhjo T, Feng X, Yamazaki H, Takami A, Teramura M, et al. Minor population of CD55-CD59- blood cells predicts response to immunosuppressive therapy and prognosis in patients with aplastic anemia. *Blood* 2006;107(4):1308-14.
15. Malato A, Saccullo G, Coco LL, Mancuso S, Santoro M, Martino S, et al. Thrombotic complications in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: A literature review. *Blood Transfus*. 2012;10(4):428-35.
16. Ziakas PD, Poulou LS, Rokas GI, Bartzoudis D, Voulgarelis M. Thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Sites, risks, outcome. *J Thromb Haemost*. 2007;5(3):642-5.
17. Araten DJ, Thaler HT, Luzzatto L. High incidence of thrombosis in African-American and Latin-American patients with Paroxysmal Nocturnal Haemoglobinuria. *J Thromb Haemost*. 2005;93(1):88-91.
18. Raghupathy R, Derman O. Response of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clone with aplastic anemia to rituximab. *Case Rep Hematol*. 2012;2012:106182.
19. Stern RM, Connell NT. Ravulizumab: A novel C5 inhibitor for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Ther Adv Hematol*. 2019;10:1-11.
20. Loschi M, Porcher R, Barraco F, Terriou L, Mohty M, Guibert S, et al. Impact of eculizumab treatment on paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: A treatment versus no-treatment study. *Am J Hematol*. 2015;91(4):366-70.
21. Schubert J, Hillmen P, Roth A, Young NS, Elebute MO, Szer J, et al. Eculizumab, a terminal complement inhibitor, improves anaemia in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol*. 2008;142(2):263-72.
22. Brodsky RA, Young NS, Antonioli E, Risitano AM, Schrezenmeier H, Schubert J, et al. Multicenter phase 3 study of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2008;111(4):1840-7.
23. Roth A, Hock C, Konik A, Christoph S, Duhrsen U. Chronic treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria patients with eculizumab: Safety, efficacy, and unexpected laboratory phenomena. *Int J Hematol*. 2011;93:704-14.
24. Kelly RJ, Hill A, Arnold LM, Brooksbank GL, Richards SJ, Cullen M, et al. Long-term treatment with eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Sustained efficacy and improved survival. *Blood* 2011;117(25):6786-92.
25. de Latour RP, Schrezenmeier H, Bacigalupo A, Blaise D, de Souza CA, Vigouroux S, et al. Allogeneic stem cell transplantation in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica* 2012;97(11):1666-73.
26. Füreder W, Sperr WR, Heibl S, Zebisch A, Pfeilstocker M, Stefanzi G, et al. Prognostic factors and follow-up parameters in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH): Experience of the Austrian PNH network. *Ann Hematol* 2020;99: 2303-13.