Современные подходы к лабораторной диагностике микросфероцитарных анемий

Т. Т. Асатрян, аспирантка кафедры биологической и общей химии¹

М. Н. Зенина, врач клинической лабораторной диагностики²

Л. Б. Гайковская, д.м.н., проф., зав. кафедры биологической и общей химии¹

¹ФГБОУ ВО «Северо-Западный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

²ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии» ФМБА России, г. Санкт-Петербург

Modern approaches to laboratory diagnostic of microspherocytic anemia

T. T. Asatryan, M. N. Zenina, L. B. Gaikovaya

North-Western State Medical University n.a. I.I. Mechnikov, Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology; Saint-Petersburg, Russia

Резюме

Диагностика наследственного сфероцитоза, как наиболее распространенной формы мембранопатий, улучшается благодаря успехам в области биотехнологии и наличию большого количества современных автоматических анализаторов. Все это приводит к сокращению количества пациентов с недиагностированным наследственным сфероцитозом и снижению случаев развития осложнений. Однако, несмотря на совершенствование различных методов оценки эритроцитов, определенные трудности в диагностике наследственного сфероцитоза сохраняются. В настоящем исследовании представлен разработанный авторами алгоритм лабораторной диагностики микросфероцитарных анемий, что позволит проводить пациентам с высокой вероятностью наследственного сфероцитоза дифференциальную диагностику с другими видами гемолитических анемий.

Ключевые слова: микросфероцитоз, гемолитическая анемия, наследственный сфероцитоз, алгоритм

Summary

Diagnosis of hereditary spherocytosis, as the most common form of membranopathy, is improved, thanks to advances in biotechnology and the presence of a large number of modern automatic analyzers. All this leads to a reduction in the number of patients with undiagnosed hereditary spherocytosis and a decrease in the incidence of complications. However, despite the improvement of various methods of evaluation of red blood cells, some difficulties in the diagnosis of hereditary spherocytosis remain. In this study, the authors developed an algorithm for the laboratory diagnosis of anemias microperimetry that will allow patients with high probability of hereditary spherocytosis differential diagnosis with other types of hemolytic anemia.

Key words: microspherocytosis, hemolytic anemia, hereditary spherocytosis, algorithm

Наследственный сфероцитоз (НС, по МКБ 10: D 58.0) представляет собой наследственное заболевание, связанное с дефектом мембраны эритроцита, сопровождающееся развитием гемолитической анемии (ГА) различной степени тяжести. В северной части Европы НС является самой распространенной причиной наследственной гемолитической анемии. Распространенность среди других национальностей недостаточно изучена [1].

Ни один из существующих лабораторных методов не обладает достаточной чувствительностью и специфичностью для надежной диагностики микросфероцитарных анемий. Для постановки диагноза требуется комбинация различных тестов, которые

дополняют друг друга. По этой причине одним из перспективных направлений в диагностике НС является разработка новых методов оценки дефектов мембраны эритроцитов и создание алгоритма лабораторных исследований НС[2].

Цель исследования

Разработать и обосновать алгоритм лабораторной диагностики наследственного сфероцитоза с использованием современных методов исследования.

Материалы и методы

В исследование были включены 41 пациент (17 мужчин, 24 женщины) в возрасте от 23 лет до 61 года (медиана 26 лет), находившихся на обследо-

вании и лечении в ФГБУ «Российский НИИ гематологии и трансфузиологии» ФМБА России в период с сентября 2015-го по апрель 2018 года.

По результатам проведенного обследования в основную группу были включены 18 пациентов с НС. Контрольную группу составили 23 пациента с доказанным отсутствием гематологических заболеваний (табл. 1).

Всем пациентам однократно проводили гематологические и биохимические исследования: клинический анализ крови (КАК), включающий основные эритроцитарные параметры: концентрация гемоглобина (Hb), количество эритроцитов (RBC), средний объем эритроцита (MCV), среднее содержание гемоглобина в отдельном эритроците (MCH), ширина распределения эритроцитов по объему (RDW), а также интегральные эритроцитарные параметры (Hb/MCHC, Hb/RDW, MCHC/RDW), обязательную микроскопию мазка периферической крови с описанием формы эритроцитов и расчетом морфометри-

Таблица 1
Характеристика групп больных по полу и возрасту

Группы	Пол		Возраст, годы		
	Мужской	Женский	Min-max	Me	
Основная группа (n = 18)	9	9	6	61	24
Контрольная группа (n = 23)	8	15	8	42	27

ческих параметров эритроцитов; определение скорости лизиса эритроцитов с использованием подкисленного глицеринового реактива, тест на определение интенсивности свечения красителя эозин-5-малеимида (ЭМА-тест).

Венозную кровь забирали в пробирки, содержащие в качестве антикоагулянта K_3 ЭДТА (Vacuette, GreinerBio-One, Австрия) для клинического анализа крови и ЭМА-теста; для определения скорости лизиса эритроцитов — в пробирки с Li-гепарином (Vacuette, GreinerBio-One, Австрия).

КАК выполняли не позднее 6 часов от момента забора крови на гематологическом анализаторе Sysmex KX-21N (Sysmex, Япония). На основании полученных данных оценивали основные эритроцитарные параметры и рассчитывали соотношения Hb/MCHC, Hb/RDW и MCHC/RDW.

Окраску мазков проводили по методу Паппенгеймера.

Для определения морфометрических параметров эритроцитов анализировали изображения окрашенных мазков с помощью аппаратно-программного комплекса (АПК) «ВидеоТест-Морфология», который в автоматическом режиме выделяет, измеряет и распределяет эритроциты на классы по заложенным расчетным эритроцитарным параметрам [3]. Процесс обработки с возможностью коррекции изображения визуально контролировался оператором (врачом клинической лабораторной диагностики) на экране монитора.

Лизис эритроцитов оценивали с помощью *глицеринового теста*. Регистрацию скорости разрушения эритроцитов проводили на автоматическом анализаторе Sapphire 400 (США). Изменение оптической плотности регистрировали в течение 10 мин. при 37 °С (длина волны 625 нм). Скорость лизиса эритроцитов оценивали визуально по форме графика снижения ОП во времени.

Тест на связывание красителя эозин-5-малеимида (ЭМА-тест) основан на определении интенсивности свечения красителя эозин-5-малеимида, который связывается с лизином-430 первой внеклеточной петли белка полосы 3 мембран эритроцитов. ЭМА-тест включает в себя трехкратную отмывку эритроцитов в физиологиче-

ском растворе (центрифугирование при 1 500 об./мин.), инкубацию отмытых эритроцитов с красителем эозин-5-малеимидом в течение 60 мин., двухкратную отмывку от несвязавшегося красителя физиологическим раствором. После проявления окраски с использованием PBS с pH = 7,0 проводили определение средней интенсивности флюоресценции (СИФ) на проточном цитометре FC 500 (Beckman Coulter, США) с использованием программы CXAnalysis по данным 50 000 эритроцитов, гейтированных по параметрам светорассеяния.

В каждой аналитической серии СИФ пациента с подозрением на наличие НС сопоставляли с СИФ трех пациентов с отсутствием гематологических заболеваний при условии, что забор крови всех пациентов производился в один день, пробы хранились в одинаковых условиях, анализ выполнялся одномоментно.

В связи с нестабильностью красителя эозин-5-малеимид в разведенном состоянии и отсутствием контрольных материалов, результат представляли как отношение СИФ пациента к сумме СИФ здоровых лиц в одной аналитической группе, выраженный в процентах:

$$\text{СИФ \%} = \frac{\text{СИФ}_{\text{пациента}}}{\sum \text{СИФ}_{\text{доноров}}} \times 100\%.$$

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программы Statistica for Windows 6.0 с использованием параметрических и непараметрических критериев. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

При сравнении эритроцитарных показателей у пациентов основной и контрольной групп достоверных различий между основными эритроцитарными параметрами не выявили, за исключением параметра RDW, который указывает на гетерогенность размеров эритроцитов (степень анизоцитоза), но не является специфическим признаком НС (табл. 3).

В последнее время ряд исследователей предлагают использовать расчетные параметры Hb/MCHC, Hb/RDW и MCHC/RDW для лабораторной диагностики микросфероцитарных анемий [4]. При расчете этих отношений в контрольной и основной группе были получены следующие значения (табл. 4).

У пациентов с врожденной микросфероцитарной анемией значения отношений Hb/MCHC, Hb/RDW

Таблица 3
Эритроцитарные показатели у больных с врожденной микросфероцитарной анемией, полученные с использованием анализатора Sysmex KX-21N

Параметр	Контрольная группа	Основная группа (НС)	Значения p
Hb, г/л	137,6 ± 9,3	118,8 ± 32,8	0,07
Hct, л/л	0,40 ± 0,02	0,4 ± 0,1	0,06
RBC, ×10 ¹² /л	4,7 ± 0,2	4,3 ± 0,9	0,09
MCH, пг	28,6 ± 1,3	27,6 ± 2,2	0,05
MCHC, г/л	34,7 ± 0,9	36,7 ± 1,0	0,62
MCV, фл	83,1 ± 1,7	81,7 ± 14,6	0,71
RDW, %	13,6 ± 0,5	17,6 ± 3,9	0,0001

Таблица 4
Отношения $Hb/MCHC$, Hb/RDW и $MCHC/RDW$ у больных с врожденной микросфероцитарной анемией

Параметр	Контрольная группа	Основная группа (НС)	Значения р
$Hb/MCHC$	0,377 (0,359; 0,399)	0,374 (0,319; 0,408)	0,050
Hb/RDW	10,328 (9,500; 10,855)	7,837 (7,073; 9,658)	0,001
$MCHC/RDW$	27,407 (25,603; 28,046)	22,546 (18,431; 26,357)	0,001

Таблица 5
Значения эритроцитарных показателей, полученных с помощью аппаратно-программного комплекса «ВидеоТест-Морфология»

Исследуемые параметры	Контрольная группа	Основная группа (НС)	Значения р
Толщина эритроцитов микроцитов ($T_{мэр}$), мкм	$2,3 \pm 0,2$	$2,9 \pm 0,2$	0,001
Толщина эритроцитов ($T_{эр}$)	$2,1 \pm 0,2$	$2,6 \pm 0,3$	0,005
Индекс сферичности эритроцитов микроцитов ($R_{мэр}$)	$2,8 \pm 0,2$	$2,2 \pm 0,2$	0,003
Индекс сферичности эритроцитов ($R_{эр}$)	$3,7 \pm 0,3$	$2,3 \pm 0,1$	0,005
Средний диаметр эритроцитов ($D_{эр}$)	$7,5 \pm 0,2$	$6,6 \pm 0,2$	0,005
Содержание микроцитов (% микр.)	$12,6 \pm 6,7$	$68,7 \pm 16,9$	0,005
Содержание нормоцитов (% норм.)	$72,9 \pm 7,3$	$30,4 \pm 16,5$	0,005
Содержание макроцитов (% макр.)	$14,5 \pm 11,8$	$1,9 \pm 1,2$	0,005

Рисунок 1. Графическое представление скорости лизиса эритроцитов в группах: а — контрольная (здоровые лица); б — основная (с диагнозом «наследственный сфероцитоз»).

Рисунок 2. Гистограмма интенсивности флуоресценции эозин-5-малеимида эритроцитов в группах: а — контрольная; б — основная.

и $MCHC/RDW$ были достоверно ниже, чем в контрольной группе, что свидетельствует о возможности использования этих параметров для подозрения на наличие микросфероцитоза и направления пациента для более детального обследования.

При анализе изображений мазков крови с применением АПК были установлены морфометрические параметры эритроцитов при НС (табл. 5).

Как следует из представленных в табл. 5 данных, использование эритроцитарных показателей, полу-

ченных с помощью АПК, позволило выявить достоверные различия в группах по всем изученным параметрам. Среди них наиболее значимыми для дифференциальной диагностики микросфероцитарной анемии были толщина эритроцитов ($T_{эр}$), индекс сферичности эритроцитов ($R_{эр}$) и средний диаметр эритроцитов ($D_{эр}$).

При проведении глицеринового теста в контрольной группе и у пациентов с НС графики регистрации скорости лизиса эритроцитов контрольной группы (рис. 1 а) имели линейный вид (ОП равномерно уменьшалась со временем), в основной группе (рис. 1 б) — в виде кривой, отражающей замедляющееся неравномерное снижение ОП.

Изучение кинетики гемолиза эритроцитов у пациентов основной группы показало наличие двух фаз: начальный период у всех пациентов составлял от 50 до 100 с, снижение ОП происходило быстрее, чем во второй фазе. У пациентов основной группы лизис эритроцитов протекает быстрее по сравнению с контрольной группой, что, возможно, обусловлено наличием популяции микросфероцитов.

При исследовании интенсивности экспрессии эозин-5-малеимида результаты были представлены в виде гистограмм (рис. 2 а, б), которые отображают среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ) (табл. 6).

У пациентов основной группы установлено достоверное снижение средней интенсивности флуоресценции по сравнению с контрольной группой.

Обоснование диагностического алгоритма. Полученные данные легли в основу лабораторного алгоритма диагностики различных форм гемолитических анемий, который предполагает три этапа (рис. 4).

Первый этап: клинический анализ крови, в результате которого на основании основных эритроцитарных и двух расчетных индексов ($Hb/MCHC$ и Hb/RDW), а также наличия микросфероцитов в окрашенных мазках крови можно выделить группу пациентов, требующих дальнейшее проведение дифференциального диагноза.

На втором этапе проводятся морфометрия эритроцитов в окрашенных мазках периферической крови с ис-

пользованием АПК и глицериновый тест на определение скорости лизиса эритроцитов.

Третий этап — это подтверждение наследственного сфероцитоза с помощью теста на связывание красителя эозин-5-малеимида.

Таким образом, предложенная схема позволит выявить латентные формы НС и провести дифференциальный диагноз гемолитических анемий, протекающих с появлением микросфероцитов в крови.

По нашему мнению, предложенный лабораторный алгоритм выявления пациентов с НС может быть встроен в сложившуюся систему оказания лабораторных услуг в крупных межрайонных централизованных клиничко-диагностических лабораториях (МЦКДЛ). Он не требует больших дополнительных финансовых вложений, поскольку эритроцитарные параметры и рассчитываемые на их основе индексы (Hb/MCHC и Hb/RDW) основываются на результатах рутинного клинического анализа крови, проводимого на современных гематологических анализаторах. При этом алгоритм позволит провести как скрининг наиболее распространенного типа гемолитической анемии, так и подтверждение диагноза наследственного сфероцитоза при наличии проточного цитометра для теста на связывание красителя эозин-5-малеимида. Внедрение данного алгоритма в лабораторную практику медицинских организаций позволит проводить направленный поиск носителей НС и обеспечить создание реестра таких пациентов. Своевременная диагностика НС позволит снизить риск ошибок при дифференциальной диагностике различных видов гемолитических анемий и необоснованной лекарственной терапии. Кроме того, своевременная постановка диагноза НС освободит пациента и медицинскую организацию от ненужных дополнительных обследований.

Таким образом, разработанный лабораторный алгоритм диагностики позволит с высокой вероятностью наследственного сфероцитоза провести дифференциальную диагностику у пациентов с другими видами

Таблица 6
Значения средней интенсивности флуоресценции в контрольной и основной группах

	Контрольная группа	Основная группа (НС)	Значение p
СИФ, %	100 (97,326; 102,907)	74,675 (65,262; 83,116)	0,017

Рисунок 3. Лабораторный алгоритм диагностики наследственного сфероцитоза.

гемолитических анемий и установить наличие наследственного сфероцитоза, своевременно назначить соответствующую терапию, тем самым решить важную социально-значимую задачу по улучшению качества медицинской помощи данной категории пациентов.

Список литературы

1. Barcellini, Wilma & Bianchi, Paola & Fermo, Elisa & G Imperiali, Francesca & P Marcella, Anna & Vercellati, Cristina & Zaninoni, Anna

- & Zanella, Alberto (2011). Hereditary red cell membrane defects: Diagnostic and clinical aspects. *Blood transfusion — Trasfusione del sangue*. 9. 274–7. 10.2450/2011.0086–10.
2. Perrotta SI, Gallagher PG, Mohandas N. Hereditary spherocytosis. *Lancet*. 2008 Oct 18; 372 (9647): 1411–26. DOI: 10.1016/S0140-6736 (08) 61588–3.
3. Зенина М.Н., Бессмельцев С.С., Козлов А.В., Черныш Н.Ю. Морфометрические показатели эритроцитов // medline.ru. — 2015. — Т. 16.
4. Rocha S, Costa E, Rocha-Pereira P, et al. Complementary markers for the clinical severity classification of hereditary spherocytosis in unsplenectomized patients. *Blood Cells Mol Dis*. 2011; 46: 166–70. DOI: 10.1016/j.bcmd.2010.11.001.

Для цитирования. Асатрян Т.Т., Зенина М.Н., Гайковская Л.Б. Современные подходы к лабораторной диагностике микросфероцитарных анемий // Медицинский алфавит. Серия «Современная лаборатория». — 2019 — Т. 3. — 22(397). — С. 22–25.