

ISSN 2311-4495
ISSN 2410-5155 (Online)
УДК 616.15

ЗНАЧИМОСТЬ ГЛИЦЕРИНОВОГО ТЕСТА С ГРАФИЧЕСКИМ ОПРЕДЕЛЕНИЕМ СКОРОСТИ ЛИЗИСА ЭРИТРОЦИТОВ ДЛЯ СКРИНИНГА НАСЛЕДСТВЕННОГО СФЕРОЦИТОЗА

Асатрян Т. Т., Гайковая Л. Б., Слепышева В. В.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И. И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Асатрян Татевик Тиграновна,
ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И. И. Мечникова
Минздрава России,
ул. Кирочная, д. 41, Санкт-Петербург,
Россия, 191015.
E-mail: tatevik.asatryan@szgmu.ru

Статья поступила в редакцию 19.07.2019
и принята к печати 11.10.2019.

Резюме

Наследственный сфероцитоз (НС) является самой распространенной причиной развития гемолитической анемии различной степени тяжести, может приводить к осложнениям: желчнокаменная болезнь, сепсис и т. д. Трудности в диагностике представляют бессимптомные и атипично протекающие случаи НС. Актуальным является поиск методов надежной диагностики микросфероцитарных анемий.

В статье описана методика выполнения глицеринового теста по определению скорости лизиса эритроцитов, полученные результаты и аналитические характеристики метода. Представленный усовершенствованный глицериновый тест (ГТ) с инкубированной кровью, выполняемый на автоматическом биохимическом анализаторе с графической регистрацией лизиса эритроцитов является чувствительным, быстро выполнимым и надежным способом идентификации НС для широкого применения в клинико-диагностических лабораториях.

Ключевые слова: микросфероцитоз, глицериновый тест, гемолиз, анемия.

Для цитирования: Асатрян Т.Т., Гайковая Л.Б., Слепышева В.В. Значимость глицеринового теста с графическим определением скорости лизиса эритроцитов для скрининга наследственного сфероцитоза. Трансляционная медицина. 2019;6(6):51–59.

THE VALUE OF THE ACIDIFIED GLYCEROL LYSIS TEST WITH A GRAPHICAL DETERMINATION FOR SCREENING OF HEREDITARY SPHEROCYTOSIS

Asatryan T. T., Gaikovaya L. B., Slepisheva V. V.

North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov,
Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Asatryan Tatevik T.,
North-Western State Medical University
named after I. I. Mechnikov,
Kirochnaya str. 41, Saint Petersburg, Russia,
191015.
E-mail: tatevik.asatryan@szgmu.ru

Received 19 July 2019; accepted 11 October 2019.

Abstract

Hereditary spherocytosis (HS) is the most common cause of hemolytic anemia of varying severity can lead to complications such as cholelithiasis, sepsis, etc. Difficulties in diagnosis are asymptomatic and atypical cases HS. It is important to search methods that can detect microspherocytic anemia.

The article describes the technique of acidified glycerol lysis test (AGLT), the results and analytical characteristics of the method. Presents a refined acidified glycerol lysis test (AGLT) with incubated blood performed on the automatic biochemical analyzer with a graphical check of the lysis of erythrocytes is a sensitive, fast and reliable method of identification of HS and can be used in clinical diagnostic laboratories.

Key words: spherocytosis, glycerol test, hemolysis, anemia.

For citation: Asatryan TT, Gaikovaya LB, Slepisheva VV. The value of the acidified glycerol lysis test with a graphical determination for screening of hereditary spherocytosis. Translyatsionnaya meditsina=Translational Medicine. 2019;6(6):51–59. (In Russ.)

Список сокращений: ГА — гемолитическая анемия, ГТ — глицериновый тест, НС — наследственный сфероцитоз, ОП — оптическая плотность, ФСБ — фосфатно-солевой буфер.

Наследственный сфероцитоз (НС, по МКБ 10: D58.0) представляет собой наследственное заболевание, связанное с дефектом мембраны эритроцита, сопровождающееся развитием гемолитической анемии (ГА) различной степени тяжести [1]. В северной части Европы НС является самой распространенной причиной наследственной гемолитической анемии. Распространенность среди других национальностей недостаточно изучена [2].

При анализе крови пациентов с НС обнаруживаются морфологически измененные эритроциты — микросфероциты [3]. В перечень рекомендуемых исследований для подтверждения диагноза наслед-

ственного сфероцитоза включен метод определения осмотической резистентности эритроцитов [4]. Однако вследствие трудоемкости и недостаточной чувствительности он мало приспособлен для скрининга и дифференциальной диагностики НС от других гемолитических анемий, что особенно актуально для легких или атипично протекающих случаев [5]. При латентном течении возникают трудности в диагностике, поскольку существующие лабораторные методы не обладают необходимой чувствительностью и специфичностью.

В 1974 году E. L. Gottfried и N. A. Robertson [6, 7] предложили количественный метод оценки скорости лизиса эритроцитов. Для этого цельную кровь (антикоагулянт Na₂EDTA) инкубировали в глицериновом буфере (pH = 7,40) и определяли изменение оптической плотности (ОП). По скорости снижения ОП оценивали скорость лизиса эри-

троцитов в течение 1800 с. Регистрацию кинетики разрушения эритроцитов проводили ручным методом на спектрофотометре. Результат определяли, как время, необходимое для снижения ОП в 2 раза от исходной ОП (GLT50). Однако чувствительность данного метода составляла лишь 14 %.

В 1980 году A. Zanella [8] модифицировал тест, при этом он изменил условия инкубации эритроцитов путем снижения pH фосфатно-солевого буфера (ФСБ) до 6,85, а также добавления в реакционную смесь глицерина в концентрации 300 ммоль/л. Для этого к 20 мкл цельной крови (антикоагулянт Na₂EDTA) добавляли 5,0 мл ФСБ (pH 6,85). Суспензию тщательно и аккуратно перемешивали, 1,0 мл переносили в чистую пробирку, добавляли 2,0 мл глицерина (300 ммоль/л), перемешивали. Далее незамедлительно начинали ручную регистрацию изменения ОП при помощи спектрофотометра в течение 1800 с. Результат определяли, как время, необходимое для снижения ОП в 2 раза от исходного значения ОП (AGLT50). Тест проводили с образцом крови сразу после взятия и повторяли его после 24-часовой инкубации при температуре 37 °C в термостате. По мнению авторов, данная модификация теста позволяет выявлять скрытые формы НС и имеет большую чувствительность (73 %) по сравнению с методом, предложенным E. L. Gottfried и N. A. Robertson (1974) [7]. Однако он может быть ложноположительным при различных физиологических и патологических состояниях организма, таких как беременность, онкологические заболевания и т. д.

Ранее предложенные методы оценки осмотической резистентности эритроцитов не стандартизированы, трудоемки, поэтому актуален поиск новых современных методов или совершенствование имеющихся, особенно в связи с развитием современных лабораторных технологий и оснащением клиничко-диагностических лабораторий автоматическими биохимическими анализаторами.

В связи с этим, целью нашей работы было усовершенствовать глицериновый тест (ГТ) путем автоматизации его выполнения, регистрации кинетики

лизиса эритроцитов на биохимическом анализаторе и оценить его значимость для скрининга НС.

Материалы и методы

В основную группу были включены 18 пациентов с диагнозом «наследственный сфероцитоз». В связи с тяжелым течением заболевания 5 пациентам ранее была проведена спленэктомия. Группа сравнения (ГА, 32 пациента) включала пациентов с различными типами несфероцитарных гемолитических анемий. Контрольную группу («здоровые» лица) составили 25 человек с отсутствием гематологических заболеваний.

Характеристика групп больных по полу и возрасту представлена в таблице 1. Приведены медиана (Me), нижний (25) и верхний (75) квартили. Все пациенты на момент обследования проживали в Санкт-Петербурге.

Материалом для исследования явилась венозная кровь. Забор крови производили в пробирки с антикоагулянтом Li-гепарин (Vacuette, GreinerBio-One, Австрия), натошак.

В ходе наших исследований и в связи с недостатками известных методов и техническими возможностями современных клиничко-диагностических лабораторий методика проведения ГТ нами была модифицирована и полностью автоматизирована. Усовершенствование теста заключалось в изменении условий проведения теста: использование одного глицеринового реактива, который позволяет начать измерение ОП без предварительного разведения пробы, автоматизация всего процесса с использованием биохимического анализатора и сокращение времени проведения ГТ до 600 с. Автоматизация процесса состояла в непрерывной регистрации снижения ОП в течение 600 с и расчете разности значений начальной ОП и конечной ОП. В дальнейшем для удобства представления результатов лизиса эритроцитов использовали коэффициент 1000 и визуальную оценку графиков зависимости снижения ОП во времени.

Для проведения усовершенствованного ГТ необходим биохимический анализатор открытого типа.

Таблица 1. Характеристика групп больных по полу и возрасту

Группы	Возраст, годы				Пол	
	min-max	Me	M		Мужской	Женский
Основная группа (НС, n = 18)	6	61	25,5	27,8	9	9
Группа сравнения (ГА, n = 32)	8	56	27,0	29,8	16	16
Контрольная группа («Здоровые» лица, n = 25)	2	61	20,0	21,5	13	12

Для приготовления глицеринового реактива 11 мл (13,81 г) глицерина растворяли в 400 мл фосфатно-солевом буфере (ФСБ, PBS) с pH = 6,85 и доводили объем до 1 л дистиллированной водой. Готовый реактив хранили при температуре 2–8 °С, а перед использованием доводили до комнатной температуры.

Для выполнения ГТ в биохимическом анализаторе (ГТ-0: сразу после взятия крови; ГТ-инк: после 24-часовой инкубации) необходимо установить следующие параметры: объем дозируемой жидкости (297 мкл реактива и 3 мкл цельной крови), тип реакции (кинетика), время исследования (600 с), температура исследования (37 °С). Таким образом, в автоматическом биохимическом анализаторе после дозирования реактива в измерительную кювету, реактив нагревался до 37 °С, затем в кювету дозировались 3 мкл цельной крови. После перемешивания незамедлительно начиналось измерение снижения ОП. Измерение ОП проводили с интервалом 1 с в течение 600 с. Результат выражали в условных единицах в виде разницы между начальной и конечной ОП. Для удобства предоставления данных ввели фактор 1000.

В нашем исследовании регистрацию скорости разрушения эритроцитов проводили на автоматическом анализаторе Sapphire-400 (Hirose Electronic System Co., Япония), который дает возможность оценки результатов как в виде разницы между начальной и конечной ОП, так и в виде графиков кинетики разрушения эритроцитов.

Для повышения надежности диагностики микросфероцитарных анемий тест проводили с кровью сразу после взятия и после 24-часовой инкубации с глицериновым реактивом при комнатной температуре.

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с использованием методов непараметрической статистики. Методы описательной статистики включали в себя оценку медианы (Me), нижнего (25 %) и верхнего (75 %) квартилей. Для оценки межгрупповых различий значений признаков, имеющих непрерывное распределение, применяли ранговый U-критерий Вилкоксона–Манна–

Уитни. Диагностическую значимость исследуемых маркеров оценивали с помощью ROC-анализа, включающего показатели чувствительности (доля истинно положительных случаев) и специфичности (доля истинно отрицательных случаев). Точки наиболее оптимального расположения пересечения на ROC-кривой положительных и отрицательных примеров определяются как пороговые значения, или Cut-off. Для получения численного значения клинической значимости теста, а также для сравнения двух тестов, использовали показатель AUC (Area Under Curve), или значение площади под характеристической ROC-кривой. Статистическую обработку материала выполняли с использованием программ прикладного статистического анализа (Statistica for Windows, v. 6.0 и MedCalc).

Результаты и их обсуждение

Результаты глицеринового теста по определению скорости лизиса эритроцитов с кровью сразу после взятия в основной группе (НС) и контрольной группе («здоровые» лица) представлены в таблице 2. Приведены медиана (Me), нижний (25) и верхний (75) квартили.

У пациентов основной группы разность начальной и конечной ОП достоверно ($p < 0,001$) выше при сравнении с пациентами контрольной группы.

При сравнении результатов глицеринового теста у пациентов основной группы (НС) и группы сравнения (ГА) (таблица 3) не было установлено достоверных различий по разности начальной и конечной ОП. Приведены медиана (Me), нижний (25) и верхний (75) квартили.

Сравнение результатов глицеринового теста по скорости лизиса эритроцитов с кровью сразу после взятия в группе сравнения (ГА) и контрольной группе («здоровые» лица) отражено в таблице 4 и показало достоверные различия между группами ($p < 0,001$). Приведены медиана (Me), нижний (25) и верхний (75) квартили.

Был проведен анализ диагностической ценности исследуемого параметра, проводимого сразу после взятия крови. Аналитические характеристики глицеринового теста, проводимого с кровью

Таблица 2. Разность начальной и конечной ОП при проведении глицеринового теста с кровью сразу после взятия в основной и контрольной группах

Показатель Основная		Группа		p
		Контрольная		
ГТ-0, усл. ед.	Квартили	894; 1256	517; 732	< 0,001
	Me	949	573	

Таблица 3. Разность начальной и конечной ОП при проведении глицеринового теста с кровью сразу после взятия в основной группе и группе сравнения

Показатель Основная		Группы		p
		Сравнения		
ГТ-0, усл. ед.	Квартили	894; 1256	888; 987	0,4983
	Me	949	952	

Таблица 4. Разность начальной и конечной ОП при проведении глицеринового теста с кровью сразу после взятия в группе сравнения и контрольной группе

Показатель Сравнения		Группа		p
		Контрольная		
ГТ-0, усл. ед.	Квартили	888; 987	517; 732	< 0,001
	Me	952	573	

Таблица 5. Аналитические характеристики глицеринового теста, проводимого с инкубированной кровью для основной группы

Исследуемый параметр	Результат
AUC	0,902
Чувствительность	77
Специфичность	96
Индекс Youden	0,7378
Cut-off	>864

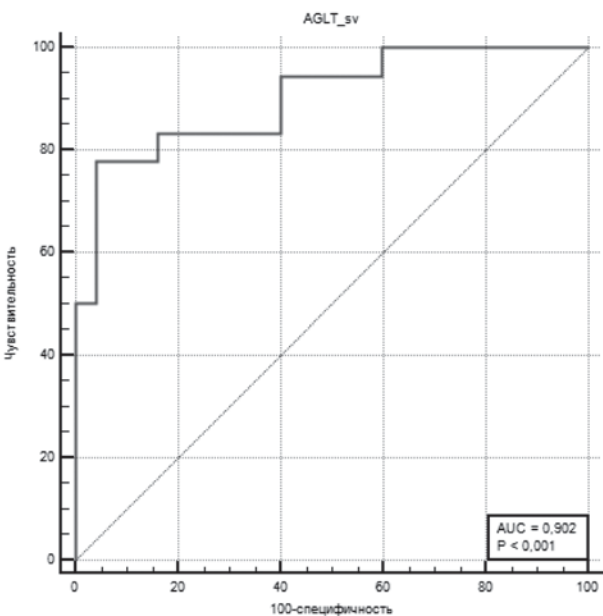


Рис. 1. ROC-кривая глицеринового теста, проводимого с кровью сразу после взятия для выявления пациентов с НС

сразу после взятия, представлены в таблице 5 и на рисунке 1.

Чувствительность и специфичность теста составили 77 и 96 % соответственно. Следовательно, ГТ, проводимый с кровью сразу после взятия, обладает достаточной чувствительностью, но не надежен для диагностики НС. В связи с этим тест повторили с кровью после 24-часовой инкубации при комнатной температуре.

Результаты глицеринового теста по определению скорости лизиса эритроцитов, теста с инкубированной кровью в основной группе (НС) и контрольной группе («здоровые» лица) представлены в таблице 6. Приведены медиана (Me), нижний (25) и верхний (75) квартили.

Как видно из таблицы 6, установлены достоверные различия ($p < 0,001$) в разности начальной и конечной ОП у пациентов с наследственным сфероцитозом и лиц, не имеющих гематологических заболеваний, аналогично, как и при глицериновом тесте, сразу после взятия крови.

При сравнении результатов глицеринового теста по определению скорости лизиса эритроцитов с инкубированной кровью в основной группе (НС) и группе сравнения (ГА) (табл. 7) выявлено достоверное изменение ($p < 0,001$) показателя ГТ-инк в отличие от теста, проведенного сразу после взятия крови. Приведены медиана (Me), нижний (25) и верхний (75) квартили.

Показатели глицеринового теста с инкубированной кровью (ГТ-инк) в группе сравнения (ГА) и контрольной группе («здоровые» лица) представленные в таблице 8, также достоверно отличаются в группах, как и сразу после взятия крови. Приведены медиана (Me), нижний (25) и верхний (75) квартили.

Для показателя ГТ, проводимого после инкубации, также проводился расчет чувствительности и специфичности. Аналитические характеристики глицеринового теста, проводимого с инкубированной кровью, для основной группы с использованием ROC-анализа представлены в таблице 9 и на рисунке 2.

Таблица 6. Разность начальной и конечной ОП при проведении глицеринового теста с инкубированной кровью в основной и контрольной группе

Показатель Основная		Группа		p
		Контрольная		
ГТ-инк, усл. ед.	Квартили	1094; 1957	530; 745	< 0,001
	Me	1843	586	

Таблица 7. Разность начальной и конечной ОП при проведении глицеринового теста с инкубированной кровью в основной группе и группе сравнения

Показатель Основная		Группы		p
		Сравнения		
ГТ-инк, усл. ед.	Квартили	1094; 1957	901; 1000	< 0,001
	Me	1843	965	

Таблица 8. Разность начальной и конечной ОП при проведении глицеринового теста с инкубированной кровью в группе сравнения и контрольной группе

Показатель Сравнения		Группы		p
		Контрольная		
ГТ-инк, усл. ед.	Квартили	901; 1000	530; 745	< 0,001
	Me	965	586	

Таблица 9. Аналитические характеристики глицеринового теста, проводимого с инкубированной кровью для основной группы

Исследуемый параметр	Результат
AUC	0,987
Чувствительность	94,44
Специфичность	99
Индекс Youden	0,94
Cut-off	> 968

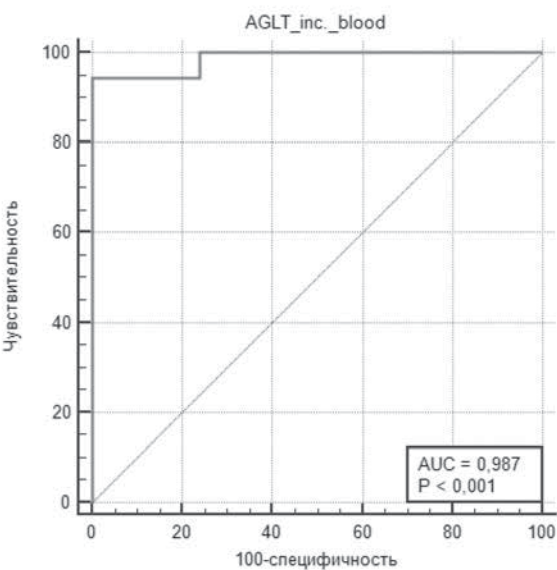


Рис. 2. ROC-кривая для глицеринового теста, проводимого с инкубированной кровью для основной группы (НС)

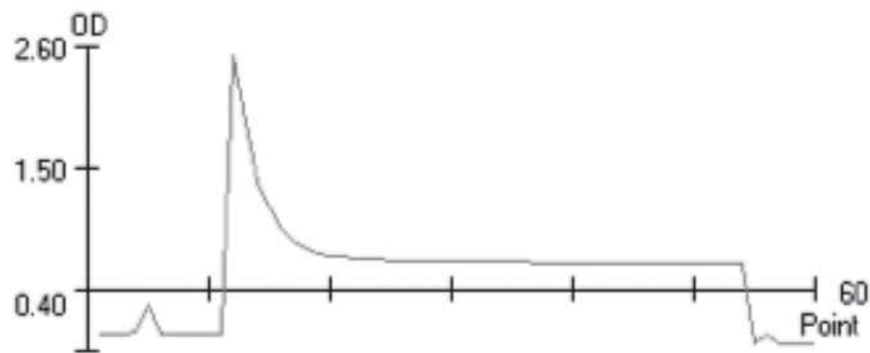


Рис. 3. Графическое представление скорости лизиса эритроцитов у пациента основной группы (НС)

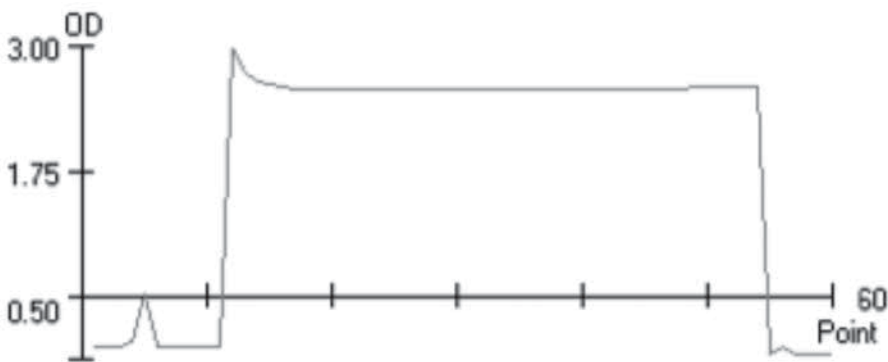


Рис. 4. Графическое представление скорости лизиса эритроцитов у пациента из группы сравнения (ГА) с β -талассемией

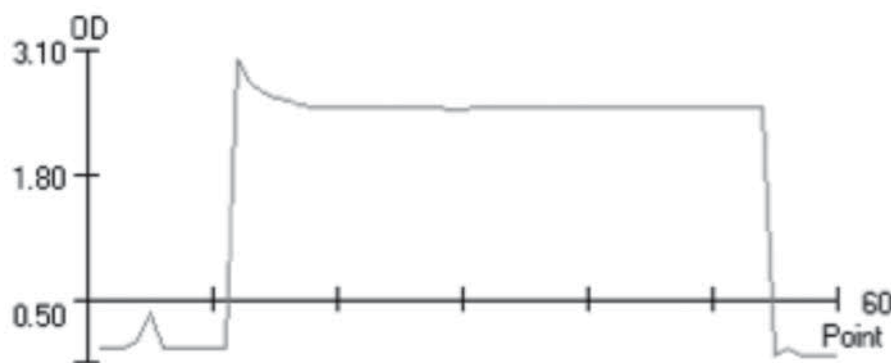


Рис. 5. Графическое представление скорости лизиса эритроцитов у пациента контрольной группы («здоровые» лица)

Из представленных данных видно, что 24-часовая инкубация крови с глицериновым реактивом при комнатной температуре позволила увеличить диагностическую значимость теста (94 % чувствительность и 99 % специфичность).

Для быстрой визуальной оценки глицеринового теста использовались графики. На рисунках 3–5 представлены примеры графиков скорости лизиса эритроцитов у пациентов различных групп.

Изучение кинетики гемолиза эритроцитов у пациентов основной группы (НС) отчетливо показало наличие двух фаз: в начальный период, который у всех пациентов в среднем составлял от 50 до 100 с, снижение оптической плотности происходило быстрее, чем во второй. Это может указывать, что в данной группе лизис эритроцитов протекает быстрее по сравнению с контрольной группой и группой сравнения за счет наличия большого количества микросфероцитов, которые, как известно, обладают сниженной резистентностью.

Таким образом, полученные нами результаты позволяют сделать ряд выводов:

1. Проведение глицеринового теста по определению скорости лизиса эритроцитов может использоваться для подтверждения наличия у пациента НС.
2. Достоинством глицеринового теста является простота, доступность его выполнения, возможность выполнения на биохимическом анализаторе.
3. Выполнение глицеринового теста с инкубированной 24 часа кровью позволяет увеличить диагностическую ценность теста.
4. Графическое представление скорости лизиса эритроцитов дает возможность быстро оценивать функцию мембран эритроцитов.

Заключение

Представленный усовершенствованный ГТ с инкубированной кровью, выполняемый на авто-

матическом биохимическом анализаторе с графической регистрацией лизиса эритроцитов, позволяет с высокой степенью надежности установить диагноз наследственный сфероцитоз, и может быть рекомендован для внедрения в клинико-диагностических лабораториях.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциально-го конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

1. World Health Organization. International statistical classification of diseases and related health problems 10th revision. 2016;5(3):47.
2. Pediatrics: national guidelines. For ed. Baranov AA. M.: GEOTAR-Media, 2009; Vol. 1. P. 1024. In Russian. [Педиатрия: национальное руководство. Под ред. А.А. Баранова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. Т. 1. С. 1024].
3. Papayan AV, Zhukova LYu. Anemia in children. SPb.: Piter, 2001. P. 384. In Russian. [Папаян, А.В., Жукова Л.Ю. Анемии у детей: руководство для врачей. СПб.: Питер, 2001. с. 384].
4. Kuvshinnikov VA, Zakharevich VI. Diagnostics and modern approaches to the treatment of hereditary spherocytosis in children. Medicinskij zhurnal=Medical Journal. 2013; 17–21. In Russian [Кувшинников В.А., Захаревич В.И. Диагностика и современные подходы к лечению наследственной сфероцитарной гемолитической анемии Минковского–Шоффара у детей. Медицинский журнал. 2013;4(46):17–21].
5. Smetanina NS, Kuzminova ZA, Maschan AA, Lugovskaya SA. Federal clinical guidelines for the diagnosis and treatment of hereditary spherocytosis. M.: Media Medica. 2013. In Russian [Сметанина Н.С., Кузминова Ж.А., Масчан А.А., Луговская С.А. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению наследственного сфероцитоза. М.: Медиа Медика, 2013].
6. Gottfried EL, Robertson NA. Glycerol lysis time as a screening test for erythrocyte disorders. J Lab Clin Med. 1974;83(2):323–333.

7. Gottfried EL, Robertson NA. Glycerol lysis time of incubated erythrocytes in the diagnosis of hereditary spherocytosis. *J Lab Clin Med.* 1974;84(5):746–751.

8. Zanella A, Izzo C, Rebulli P, et al. The first stable variant of erythrocyte glucose-phosphate isomerase associated with severe hemolytic anemia. *Am J Hematol.* 1980;9(1):1–11.

Информация об авторах:

Асатрян Татевик Тиграновна, аспирант кафедры биологической и общей химии ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И. И. Мечникова Минздрава России;

Гайковая Лариса Борисовна, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой биологической и общей химии ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И. И. Мечникова Минздрава России;

Слепышева Виктория Валерьевна, к.м.н., доцент, ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И. И. Мечникова Минздрава России.

Author information:

Asatryan Tatevik T., Postgraduate Student of the Department of Biological and General Chemistry, North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov;

Gaikovaya Lyudmila B., Dr. Sc., Professor, Head of the Department of Biological and General Chemistry, North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov;

Slepisheva Viktoriya V., PhD, North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov.