

15. De Latour R.P., Schrezenmeier H., Mary J.Y. et al. Stem cell transplantation for paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: an ongoing joint study of the AAWP EBMT Group and the French Society of Haematology. In: *35-th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation*. Goteborg, Sweden; 2009: abstract 316.
16. Schrezenmeier H., Shubert J., Luzzatto L. et al. Effects of eculizumab therapy in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH) receiving concurrent immunosuppressive therapy for bone marrow insufficiency. *Blood*. 2009; 114: 3012.
17. Soliris Summary of Product Characteristics. Alexion Europe SAS. 2007.
18. Abdulkadyrov K.M. *Clinical Hematology: Guidebook. [Klinicheskaya gematologiya: Spravochnik]*. St. Petersburg: Piter; 2006. (in Russian)
19. Idel'son L.I., Benisovich V.I., Savina L.S., Radzhivilovskaya E.G. Sucrose test for PNH diagnostics. *Problemy gematologii i perelivaniya krovi*. 1972; 17 (8): 55–7. (in Russian)
20. Rosse W.F. Dr Ham's test revisited. *Blood*. 1991; 78 (3): 547–50.
21. Rosse W.F. Variations in the red cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Br. J. Haematol.* 1973; 24 (3): 327–42.
22. Oelschlaegel U., Besson I., Arnoulet C., Sainty D., Nowak R., Naumann R. et al. A standardized flow cytometric method for screening paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH) measuring CD55 and CD59 expression on erythrocytes and granulocytes. *Clin. Lab. Haematol.* 2001; 23 (2): 81–90.
23. Sutherland D.R., Kuek N., Azcona-Olivera J., Anderson T., Acton E., Barth D. et al. Use of a FLAER-based WBC assay in the primary screening of PNH clones. *Am. J. Clin. Pathol.* 2009; 132: 564–72.
24. Diep D.B., Nelson K.L., Raja S.M., Pleshak E.N., Buckley J.T. Glycosylphosphatidylinositol anchors of membrane glycoproteins are binding determinants for the channel-forming toxin aerolysin. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 2355–60.
25. Hall S.E., Rosse W.F. The use of monoclonal antibodies and flow cytometry in the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 1996; 87: 5332–40.
26. Diep D.B., Nelson K.L., Raja S.M., Pleshak E.N., Buckley J.T. Glycosylphosphatidylinositol anchors of membrane glycoproteins are binding determinants for the channel-forming toxin aerolysin. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 2355–60.
27. Sutherland D.R., Kuek N., Davidson J., Barth D., Chang H., Yeo E. et al. Diagnosing PNH with FLAER and multiparameter flow cytometry. *Cytometry B. Clin. Cytom.* 2007; 72B (3): 167–77.
28. Brodsky R.A., Mukhina G.L., Li S., Nelson K.L., Chiurazzi P.L., Buckley J.T. et al. Improved detection and characterization of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria using fluorescent aerolysin. *Am. J. Clin. Pathol.* 2000; 114: 459–66.
29. Madkaikar M., Gupta M., Jijina F., Ghosh K. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: diagnostic tests, advantages, & limitations. *Eur. J. Haematol.* 2009; 83 (6): 503–11.
30. Marinov I., Kohoutová M., Tkáčová V., Pešek A., Čermák J., Cetkovský P. Clinical relevance of CD157 for rapid and cost-effective simultaneous evaluation of PNH granulocytes and monocytes by flow cytometry. *Int. J. Lab. Hematol.* 2015; 37 (2): 231–7.
31. Sutherland D.R., Acton E., Keeney M., Davis B.H., Illingworth A. Use of CD157 in FLAER-based assays for high-sensitivity PNH granulocyte and PNH monocyte detection. *Cytometry B. Clin. Cytom.* 2014; 86 (1): 44–55.
32. Ware R.E., Rosse W.F., Hall S.E. Immunophenotypic analysis of reticulocytes in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 1995; 86 (4): 1586–9.
33. Tsagarakis N.J., Paterakis G. A simple flow cytometric assay for routine paroxysmal nocturnal hemoglobinuria testing based on immature reticulocytes and granulocytes. *Cytometry B. Clin. Cytom.* 2012; 82 (4): 259–63.

Received 30.11.15

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.155.1-055.5/7-076.5

Кузьмина Ж.А.¹, Плясунова С.А.¹, Жогов В.В.¹, Сметанина Н.С.^{1,2}

ЦИТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД СВЯЗЫВАНИЯ ЭОЗИН-5-МАЛЕИМИДА В ДИАГНОСТИКЕ НАСЛЕДСТВЕННОГО СФЕРОЦИТОЗА

¹Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России, 117997, г. Москва, Российская Федерация; ²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России, 117997, г. Москва, Российская Федерация

Лабораторная диагностика наследственного сфероцитоза (НС) основывается на обнаружении в периферической крови сфероцитов, снижении индекса сферичности (ИС), снижении осмотической резистентности эритроцитов (ОРЭ). Основываясь на молекулярном дефекте, разработан новый тест диагностики НС на основе связывания внеклеточных фрагментов белка полосы 3 с эозин-5-малеимидом (ЭМА-тест). Целью нашей работы было провести сравнительный анализ чувствительности и специфичности методов, используемых для диагностики НС. Было проанализировано 94 пациента с различными формами анемий. Всем пациентам проведено комплексное клинико-лабораторное обследование, включавшее в том числе исследование ОРЭ, эритроцитометрию и ЭМА-тест как специфические методы диагностики НС. Снижение значения ЭМА-теста было выявлено у 51 (54%) из 94 больных, из них 47 с подтвержденным диагнозом НС. Нормальные значения ЭМА-теста обнаружены в 43 (46%) случаях, из них в 12 – с установленным диагнозом НС. Таким образом, чувствительность ЭМА-теста составила 79%, специфичность – 80%. Наиболее чувствительными методами диагностики остаются ОРЭ (91%) и ИС (до 96%). Но самая высокая специфичность у ЭМА-теста (80%). В настоящее время ни один из используемых методов диагностики НС не может быть использован как универсальный. Для корректной диагностики заболевания необходимо проведение комплексного обследования.

Ключевые слова: наследственный сфероцитоз; ЭМА-тест; лабораторная диагностика; чувствительность; специфичность.

Для цитирования: Кузьмина Ж.А., Плясунова С.А., Жогов В.В., Сметанина Н.С. Цитометрический метод связывания эозин-5-малеимида в диагностике наследственного сфероцитоза. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61 (3): 168–172.

DOI 10.18821/0869-2084-2016-61-3-168-172.

Для корреспонденции: Кузьмина Жанна Андреевна, науч. сотр. отд. оптимизации лечения гематологических заболеваний ФГБУ ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева Минздрава России, E-mail: zhanna.kuzminova@fccho-moscow.ru

Kuzminova J.A.¹, Plyasunova S.A.¹, Jogov V.V.¹, Smetanina N.S.^{1,2}

THE CYTOMETRIC TECHNIQUE OF BINDING OF EOSIN-5-MALEIMIDE IN DIAGNOSTIC OF INHERENT SPHEROCYTOSIS

¹The Dmitrii Rogatchev Federal research clinical center of children hematology, oncology and immunology of Minzdrav of Russia, 117997 Moscow, Russia; ²The N.I. Pirogov Russian national research medical university Minzdrav of Russia, 117997 Moscow, Russia

The laboratory diagnostic of inherent spherocytosis is based on detection of spherocytes in peripheral blood, decreasing of index of sphericity, decreasing of osmotic resistance of erythrocytes. The new test of diagnostic of hereditary spherocytosis build on molecular defect was developed on the basis of binding extracellular fragments of protein of band 3 with eosin-5-maleimide (EMA-test). The study was carried out to implement comparative analysis of sensitivity and specificity of techniques applied to diagnose inherent spherocytosis. The sampling of 94 patients with various forms of anemias was analyzed. All patients were applied complex clinical laboratory examination including analysis of osmotic resistance of erythrocytes, erythrocytometry and EMA-test as specific techniques of diagnostic of inherent spherocytosis. In 51 out of 94 patients (54%) decreasing of values of EMA-test was detected and in 47 patients diagnosis of inherent spherocytosis was confirmed. The standard values of EMA-test were established in 43 patients (46%) and 12 patients out of them with established diagnosis of inherent spherocytosis. Therefore, sensitivity of EMA-test made up to 79% and specificity - 80%. The most sensitive techniques of diagnostic remain osmotic resistance of erythrocytes (91%) and index of sphericity (up to 96%). But the highest specificity in this respect has EMA-test (80%). Nowadays, none of implemented techniques of diagnostic of inherent spherocytosis can be applied as a universal one. The implementation of complex examination is needed for proper diagnostic of disease.

Key words: *inherent spherocytosis; EMA-test; laboratory diagnostic; sensitivity; specificity.*

For citation: Kuzminova J.A., Plyasunova S.A., Jogov V.V., Smetanina N.S. The cytometric technique of binding of eosin-5-maleimide in diagnostic of hereditary spherocytosis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2016; 61 (3): 168-172. (in Russ.)

DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-3-168-172.

For correspondence: Kuzminova J.A., research assistant of department of optimization of treatment of hematologic diseases. e-mail: Zhanna.Kuzminova@fcho-moscow.ru

Conflict of interests. *The authors declare absence of conflict of interests.*

Financing. *The study had no sponsor support*

Received 30.11.2015
Accepted 15.12.2015

Наследственный сфероцитоз (НС) является самой распространенной формой наследственной гемолитической анемии в мире. Частота встречаемости НС составляет 2,2 случая на 10 тыс. населения [1].

В патогенезе заболевания лежит аномалия мембраны эритроцита вследствие количественного или качественного дефицита мембранных белков. Молекулярный дефект при данном заболевании высокогетерогенный. По данным литературы, наиболее часто встречается дефицит белка полосы 3 (54% случаев) и спектрина (31%) [2]. Клинические проявления заболевания очень варьируют от бессимптомного носительства до тяжелых, трансфузионно зависимых форм.

Диагностика НС в настоящее время основывается как на лабораторных данных, так и на клиническом обследовании и анамнестических данных (наследственность). В лабораторной диагностике характерным для НС считается наличие анемии различной степени тяжести, повышения средней концентрации гемоглобина в эритроците (МСНС), ретикулоцитоза, гипербилирубинемии за счет непрямой фракции, обнаружение в периферической крови сфероцитов, снижение индекса сферичности (ИС), снижение осмотической резистентности эритроцитов (ОРЭ).

В лабораторной диагностике НС золотым стандартом считается снижение ОРЭ до и после инкубации эритроцитов в течение 24 ч при температуре 37°C. Но данный метод исследования не является специфичным для НС, и показатели могут быть в пределах нормальных значений примерно в 10–20% случаев НС. Результаты исследования ОРЭ также не позволяют дифференцировать НС от других состояний, сопровождающихся появлением сфероцитов в периферической крови, в частности аутоиммунного гемолиза.

В 2000 г. был предложен новый скрининговый тест, который проводится методом проточной цитометрии – тест

связывания поверхностных фрагментов белка полосы 3 мембраны эритроцитов с флуоресцентным красителем эозин-5-малеимид (ЭМА) ЭМА-тест). Суть метода состоит во взаимодействии красителя ЭМА непосредственно с лизинном в 430-м положении внеклеточной петли белка полосы 3. N-концевой цитоплазматический участок белка полосы 3 взаимодействует с анкирином и белком полосы 4.2, который в свою очередь соединяется со спектриновым цитоскелетом, обеспечивая дополнительную стабильность билипидной мембране эритроцита. Отсутствие или снижение экспрессии любого из белков мембраны эритроцита приводит к нарушению стабильности цитоскелета клетки и снижению экспрессии белка полосы 3 на поверхности мембраны эритроцита. В результате снижается связывание ЭМА с белком полосы 3 и соответственно происходит снижение активности флуоресценции. Белок полосы 3 составляет около 25% всех белков на поверхности мембраны эритроцита, что обуславливает доминирующую связь ЭМА с данным белком по сравнению с другими ЭМА-связывающимися белками (Rh-белок, Rh-гликопротеин и CD47).

Представленные в 2000 г. данные М. King и соавт. [3] свидетельствовали о высокой чувствительности (92,7%) и специфичности (99,1%) данного метода, что позволило авторам рекомендовать его в качестве основного метода для диагностики НС.

Цель настоящей работы – провести сравнительный анализ чувствительности и специфичности методов, используемых в РФ для диагностики НС в настоящее время.

Материал и методы. Нами проанализированы результаты обследования 94 пациентов с анемиями различного генеза, проходивших обследование в ФНКЦ «ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России в 2013–2015 гг. (медиана возраста 6 лет, от 2 мес до 17 лет; 54 мальчика и 40 девочек).

Таблица 1

Характеристика пациентов

Нозология	Возраст	Соотношение по количеству мальчики:девочки
НС (n = 59)	медиана 6,5 года (от 5 мес до 17 лет)	27:32 (1:1,2)
НО (n = 3)	медиана 7,6 года (от 3 до 16 лет)	3:0
НСт (n = 1)	2 года	1:0
Бета-талассемия, малая форма (n = 8)	медиана 7 лет (от 2 мес до 17 лет)	7:1
Альфа-талассемия с минимальными изменениями (n = 1)	2 года	1:0
ВДА (n = 2)	1 год	1:1
АИГА (n = 5)	медиана 4 года (от 2 до 10 лет)	3:2 (1,5:1)
ВСА (n = 1)	13 лет	1:0
ЖДА (n = 4)	медиана 12 лет (от 4 до 16 лет)	4:0
Гемолитическая анемия вследствие носительства нестабильного гемоглобина (Hb Köln) (n = 1)	4 года	1:0
Гемолитическая анемия вследствие снижения активности Г-6-ФД (n = 2)	медиана 7 лет (от 3 до 11 лет)	2:0
Неуточненная гемолитическая анемия (n = 7)	медиана 7 лет (от 3 до 14 лет)	3:4 (1:1,3)

Распределение по полу, возрасту и нозологии представлено в табл. 1. В исследование было включено 59 пациентов с НС, 28 пациентов с другими формами анемий (из них 8 пациентов с малой формой бета-талассемии, 1 пациент с альфа-талассемией, 3 пациента с наследственным овалцитозом (НО), 1 пациент с наследственным стоматоцитозом (НСт), 2 пациента с врожденной дизэритропоэтической анемией (ВДА), 2 пациента с гемолитической анемией вследствие недостаточной активности Г-6-ФД (Г6ФД), 1 пациент с гемолитической анемией вследствие нестабильного гемоглобина, 1 пациент с врожденной сидеробластной анемией (ВСА), 5 пациентов с аутоиммунной гемолитической анемией (АИГА), 4 пациента с железодефицитной анемией (ЖДА) и 7 пациентов с неуточненной формой гемолитической анемии.

Всем пациентам было проведено комплексное клинико-лабораторное обследование, включавшее общий анализ крови, выполненный на автоматическом гематологическом анализаторе (ХТ-4000i, ХЕ-2100, Sysmex, Япония), биохимический анализ крови с обязательным определением фракций билирубина, активности ЛДГ, обмена железа (ARCHITECT с4000, Abbott, США; Cobas C311, Roche, Швейцария), ОРЭ до и после инкубации по унифицированному методу в модификации Идельсона и эритроцитометрия с расчетом среднего диаметра эритроцитов, индекса сферичности (ИС) (нормальные значения 3,4–3,9) и индекса овалцитоза (ИО) [4]. В случае подозрения на гемоглобинопатию проводилось исследование фракций гемоглобина методом капиллярного электрофореза (Capillarys-2 Flex Piercing, Sebia, Франция) и последующим молекулярно-биологическим исследованием глибиновых генов (выделение из лейкоцитов периферической крови или отдельных колоний гемопоэтических клеток с использованием коммерческого набора «АмплиПрайм ДНК-

сорб-В» согласно инструкции производителя, определение первичной нуклеотидной последовательности гена *HBB* выполнено методом прямого секвенирования с использованием капиллярного секвенатора ABI 3130XL Genetic Analyser, Applied Biosystems, поиск наиболее частых делеций с вовлечением генов альфа-глобинов выполнялся методом ПЦР с анализом продуктов после электрофореза в агарозном геле). При необходимости выполнялось исследование активности (Г6ФД) эритроцитов спектрофотометрическим методом с использованием набора реактивов RANDOX (Великобритания), прямая проба Кумбса – общепринятым методом с использованием моноклональных сывороток.

Для проведения ЭМА-теста взятие периферической крови проводилось в вакуумные пробирки с этилендиаминтетрауксусной кислотой (K₂ЭДТА). Подготовка образцов крови к исследованию включала отмывку эритроцитов в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) при pH 7,0 при 1000 об/мин, инкубирование с красителем ЭМА при комнатной температуре в течение 60 мин и отмывка от несвязавшегося красителя в ФСБ. При проведении теста определяется среднее значение флуоресценции эритроцитов по каналу FL1 (488 нм) у 5 доноров, вычисляется среднее значение из этих 5 и затем сопоставляется со средним значением флуоресценции исследуемых образцов. Коэффициент равен значению флуоресценции исследуемого образца, разделенному на среднее значение флуоресценции 5 доноров, нормальные значения составляют от 0,8 до 1. Исследование проводилось на проточном цитометре Navios (Beckman Coulter, США). Анализ полученных данных проведен с использованием программы Kaluza analysis.

Результаты и обсуждение. Результаты исследования показателей, используемых в стандартной диагностике НС для всех групп пациентов представлены в табл. 2 и 3. Значимых различий в средних показателях среднего объема эритроцитов (MCV), коэффициента распределения эритроцитов по объему (RDW) и количества ретикулоцитов у пациентов с НС и другими гемолитическими анемиями не выявлено. Однако стоит отметить, что у пациентов с ЖДА и талассемией MCV статистически достоверно ниже, чем у пациентов с НС и другими анемиями. Среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH) и MCHC оказались выше у пациентов с НС, чем при других анемиях. В группе пациентов с другими анемиями MCH достоверно ниже оказался при ЖДА и талассемии.

По данным эритроцитометрии, средний диаметр эритроцита и ИС у пациентов с НС оказался значимо ниже (6,28±0,041 и 2,47±0,05 мкм соответственно, $p = 0,000$ и $p = 0,000$), чем у пациентов с другими формами анемий. Результаты расчета ИС в различных группах пациентов представлены на рис. 1. В группе больных НС 54 (91,5%) человека

Таблица 2

Результаты исследования

Показатель	НС	Другие анемии	p
MCV, фл	78,56±0,8372	74,91±3,054	0,161
MCH, пг	28,46±0,2898	25,33±1,055	0,000
MCHC, г/л	362,5±2,41	337,6±4,662	0,000
RDW, %	19,03±0,4853	17,63±0,8277	0,122
ИС	2,469±0,05259	3,64±0,1102	0,000
Средний диаметр эритроцита, мкм	6,275±0,04135	6,937±0,05502	0,000
Ретикулоциты, %	5,953±0,4455	4,493±1,118	0,162

Таблица 3

Значения эритроцитарных индексов в зависимости от нозологии

Нозология	MCV, фл	MCH, пг	MCHC, г/л	RDW, %
НС	78,56±0,83	28,46±0,28	362,5±2,41	19,03±0,48
НО	78,97±6,92	27,3±2,63	343,7±16,83	20,6±5,27
НСт	93	31,1	334	12,2
АИГА	96,04±22,42	31,3±2,28	330±11,48	18,1±2,28
Талассе- мия	56,51±4,83	19,14±0,8	343,7±5,49	18,6±0,98
Г-6-ФД	97±0,84	32,25±0,65	332,5±9,5	11,9±0,2
ЖДА	61,15±7,2	19,35±1,96	314±14,32	19,65±0,86
ВСА	50,3	13	258	31,8
ВДА	81,35±2,61	28,05±0,72	345±7	17,2±0,29
Нб Köln	86,5	26,1	301	16,1
Неуточ- ненная	80,7±5,72	29,26±0,86	362,7±5,76	14,33±0,93

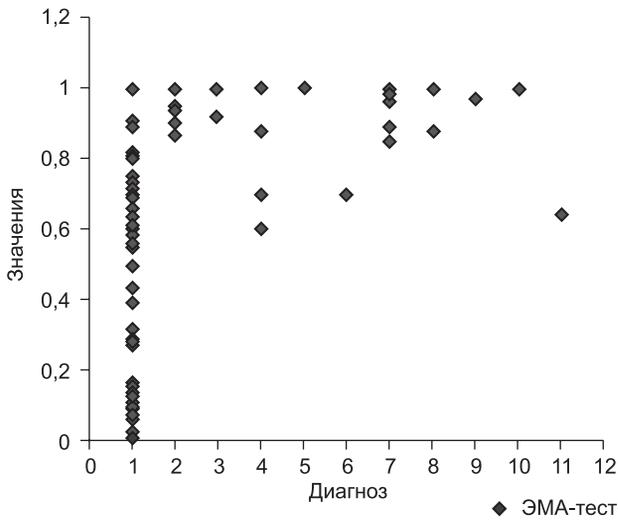


Рис. 1. Результаты расчета ИС у пациентов с различными анемиями.

1 – НС; 2 – талассемия; 3 – ЖДА; 4 – АИГА; 5 – НО; 6 – НСт; 7 – анемия неуточненная; 8 – ВДА; 9 – ВСА; 10 – Г-6-ФД; 11 – Нб Köln. Диапазон нормальных значений 3,4–3,9.

имели значение ИС менее 3 (от 0,9 до 2,9). 3 (5,1%) больных продемонстрировали ИС в диапазоне 3–3,4, в так называемой серой зоне, и 2 (3,4%) пациента – более 3,4. Следует отметить, что низкое значение ИС (< 3) было обнаружено и у 3 из 5 пациентов с АИГА (60%), в оставшихся двух случаях ИС составил 3 и 3,5. В случае ЖДА, ВСА и талассемии ИС всегда был выше 3,4. Если рассматривать группу пациентов с неуточненной гемолитической анемией, то оказалось что значения ИС в четырех случаях из семи (57% больных) были выше 3,4, а в оставшихся трех случаях (43% больных) – в диапазоне 3,0–3,4. Интересно отметить, что пациенты с Г-6-ФД, ВДА, НО, НСт и гемолитической анемией вследствие

нестабильного гемоглобина продемонстрировали ИС в диапазоне «серой зоны».

Проанализировано также возможное сочетание показателей ИС, находящихся в «серой зоне», со значениями ЭМА-теста. Всего пациентов, имеющих значение ИС в «серой зоне», 14, из них 85,7% (12 пациентов) имели нормальные показатели ЭМА-теста и у 14,3% (2 пациента) ЭМА-тест оказался сниженным (1 пациент с носительством нестабильного гемоглобина, 1 пациент с НСт) (рис. 2).

Обнаружение сфероцитов в мазке периферической крови показало значительную разницу между пациентами с НС и другими формами анемий (табл. 4). Сфероциты были обнаружены у 64 пациентов, из них у 55 (93,22%) пациентов с НС и у 8 (28,57%) пациентов с другими анемиями.

Снижение ОРЭ до и после инкубации обнаружено у 54 пациентов с НС, что составляет 91,5% от всех пациентов с НС. Интересно, что у 2 пациентов с легким течением НС ОРЭ до инкубации была нормальной, а после инкубации – сниженной. И у 2 пациентов также с легким течением НС, наоборот, до инкубации были сниженные показатели, а после инкубации – в норме.

Снижение ОРЭ было выявлено и у 14 (40%) пациентов с другими анемиями, при этом у 14 пациентов снижение вы-

Таблица 4

Среднее содержание сфероцитов в мазке периферической крови в зависимости от нозологии

Нозология	Сфероциты, %	Погрешность
НС (n = 59)	14,87	±13,5
НО (n = 3)	0,43	±0,66
НСт (n = 1)	0,1	
АИГА (n = 5)	0,98	±0,99
Талассемия (n = 9)	3,733	±9,53
Г-6-ФД (n = 2)	0,2	±0,14
ЖДА (n = 4)	0,05	±0,057
ВСА (n = 1)	8,8	
ВДА (n = 2)	0,95	±0,21
Нб Köln (n = 1)	1	
Неуточненная анемия (n = 7)	0,68	±0,9

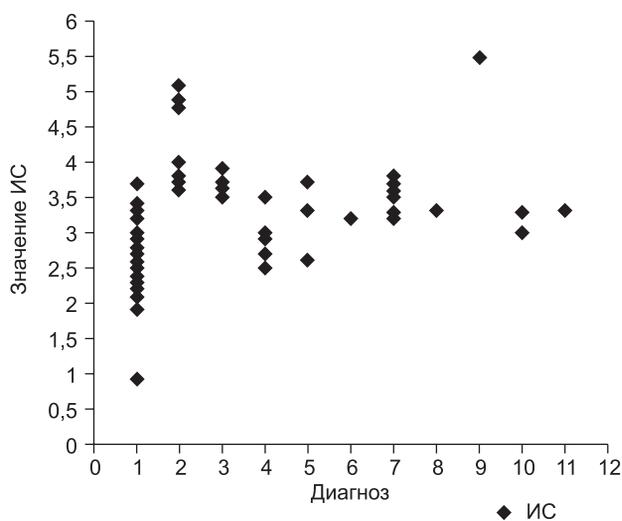


Рис. 2. Результаты ЭМА-теста у пациентов с различными анемиями.

1 – НС; 2 – талассемия; 3 – ЖДА; 4 – АИГА; 5 – НО; 6 – НСт; 7 – анемия неуточненная; 8 – ВДА; 9 – ВСА; 10 – Г-6-ФД; 11 – Нб Köln. Диапазон нормальных значений 0,8–1,0.

Таблица 5

Чувствительность и специфичность диагностических методов в группе больных НС

Показатель	Общее количество пациентов/количество пациентов, имеющих положительный результат	Чувствительность, %	Специфичность, %
ЭМА-тест	59/47	79	80
ОРЭ до инкубации	59/54	91	60
ОРЭ после инкубации	59/54	91	71
Средний диаметр эритроцита	59/53	89	71
ИС	59/57	96	57
Сфероциты в мазке	59/55	93	74

явлено до инкубации и только у 10 (28,5%) из них после инкубации.

Снижение значения ЭМА-теста было выявлено в 51 случае (54% больных), из них 47 – с подтвержденным диагнозом НС, 1 – с НСт, 2 – с АИГА, 1 – с гемолитической анемией вследствие носительства нестабильного гемоглобина (Hb Köln).

Нормальные значения ЭМА-теста обнаружены в 43 (46%) случаях, из них в 12 с установленным диагнозом НС.

Полученные результаты специфичности и чувствительности анализируемых методов диагностики представлены в табл. 5. ЭМА-тест, несмотря на заявленные характеристики, показал не самые высокие показатели чувствительности (79%) и специфичности (80%). Наши данные оказались значительно ниже описанных в работах М. King и соавт. [3].

Наиболее чувствительными методами, по нашим данным, остаются ОРЭ (чувствительность 91%) и эритроцитометрия (чувствительность до 96%). Но хотелось бы отметить, что полученные нами данные свидетельствуют о самой высокой специфичности все-таки у ЭМА-теста (80%) в отличие от других методов диагностики. Специфичность ОРЭ составила 60% (до инкубации) и 71% (после инкубации). В зависимости от показателей (обнаружение сфероцитов, диаметр эритроцита, ИС) эритроцитометрия показала результаты специфичности от 54 до 74%.

Среди ложноположительных результатов снижение ЭМА-теста в части случаев АИГА с тепловыми агглютининами (2 пациента в нашем исследовании) можно объяснить за счет присоединения антител класса IgG к внеклеточным фрагментам белка полосы 3 с последующим их удалением макрофагами [5], что сопровождалось и обнаружением сфероцитов в периферической крови больных и низкими значениями ИС и измененной ОРЭ.

Следует отметить, что ни у одного пациента с ЖДА или талассемией не было выявлено снижения ЭМА-теста.

Заключение. Полученные результаты согласуются с ранее опубликованными данными, демонстрирующими отсутствие 100% чувствительности и специфичности для всех используемых в настоящее время методов лабораторной диагностики НС.

Целесообразно использовать комплекс клинико-лабораторных исследований для корректной диагностики различных форм гемолитической анемии.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2–3, 5–6, 8–9, 11 см. REFERENCES)

1. Кувшинников В.А., Захаревич В.И. Диагностика и современные подходы к лечению наследственной сфероцитарной анемии Миньковского–Шоффара у детей. *Медицинский журнал*. 2013; (4): 17–21.
4. Байдун Л.В., Сметанина Н.С., Соколинский Б.З., Плясунова С.А., Кашпор С.А., Парпара А.А. и др. Автоматическая эритроцитометрия в роботизированном микроскопе Мекос-Ц1. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2003; (6): 39–42.
7. Зенина М.Н., Козлов А.В., Бессмельцев С.С., Котова Т.Н. Морфометрический анализ в диагностике врожденных микросфероцитозов. *Medline.ru*. 2011; 12: 448–57. Available at: <http://www.medline.ru/public/art/tom12/art37.html>
10. Прохорова Ю.А., Соколова Н.Е., Зуева Е.Е. Ранняя диагностика наследственного сфероцитоза как профилактика деформации лицевого скелета. *Клинико-лабораторный консилум*. 2012; 41 (1): 40–6.

Поступила 30.11.15

REFERENCES

1. Kuvshinnikov V.A., Zakharevich V.I. Diagnostics and modern approaches to treatment of hereditary spherocytosis Minkowsky-Shauffard disease in children. *Meditsinskiy zhurnal*. 2013; (4): 17–21 (in Russian)
2. Bianchi P. Current diagnostic approach and screening methods for hereditary spherocytosis. *Thalassemia Reports*. 2013; 3 (s1):e32: 78–80.
3. King M.J., Behrens J., Rogers C., Flynn C., Greenwood D., Chambers K. Rapid flow cytometric test for the diagnosis of membrane cytoskeleton-associated hemolytic anaemia. *Br. J. Haematol*. 2000; 111 (3): 924–33.
4. Baydun L.V., Smetanina N.S., Sokolinskiy B.Z., Plyasunova S.A., Kashpor S.A., Parpara A.A. et al. Automatic red blood cell morphology in robotized microscope MECOS-C1. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2003; (6): 39–42. (in Russian)
5. Marcus N., Attias D., Tamarly H. Autoimmune hemolytic anemia: current understanding of pathophysiology. *Hematology Education: the education program for the annual congress of the European Hematology Association*. 2014; 8: 331–8.
6. El Gendy W.M., Hasaab H.M., Ghanem A.M., Lewis I.M., Nawar S.M. The application of eosin maleimide-binding test in the diagnosis of hereditary spherocytosis among undiagnosed cases of chronic hemolytic anemia in children. *Egypt. J. Haematol*. 2014; 39: 109–13.
7. Zenina M.N., Kozlov A.V., Bessmel'tsev S.S., Kotova T.N. Morphometric analysis in the diagnosis of hereditary microspherocytosis. *Medline.ru*. 2011; 12: 448–57. Available at: <http://www.medline.ru/public/art/tom12/art37.html> (in Russian)
8. Bianchi P., Fermo E., Vercellati C., Marcello A.P., Porreti L., Cor-telezzi A. et al. Diagnostic power of laboratory tests for hereditary spherocytosis: a comparison study in 150 patients grouped according to molecular and clinical characteristics. *Haematologica*. 2012; 97 (4): 516–23.
9. Tachavanich K., Tanphaichitr V.S., Utto W., Viprakasit V. Rapid Flow cytometric test using eosin-5-maleimide for diagnosis of red blood cell membrane disorders. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*. 2009; 40 (3): 570–5.
10. Prokhorova Yu.A., Sokolova N.E., Zueva E.E. Early diagnosis of hereditary spherocytosis as the prevention of deformation of the facial skeleton. *Kliniko-laboratornyy konsilium*. 2012; 41 (1): 40–6. (in Russian)
11. King M.J., Telfer P., Mackinnon H., Langabeer L., McMahon C., Darbyshire P. et al. Using the eosin-5-maleimide binding test in the differential diagnosis of hereditary spherocytosis and hereditary pyropoikilocytosis. *Cytometry B Clin. Cytom*. 2008; 74 (4): 244–50.

Received 30.11.15