Клиническая онкогематология. 2018;11(4):319–25

ОНКО клиническая ГЕМАТОЛОГИЯ

НОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

Использование многоцветной проточной цитофлюориметрии в дифференциальном подсчете лейкоцитов: концепция HematoFlow

С.А. Луговская[1], Ф.А. Дюков[1], Е.В. Наумова[1], И.Ю. Бугров[1], А.И. Костин[2]

[1] ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, ул. Баррикадная, д. 2/1, Москва, Российская Федерация, 125993

[2] ГБУЗ «НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ», Большая Сухаревская пл., д. 3, Москва, Российская Федерация, 129090

РЕФЕРАТ

Цель. Разработать референсные интервалы для субпопуляций лейкоцитов периферической крови с использованием проточного цитометра Cytomics FC500 (Beckman Coulter) и реагента CytoDiff™.

Материалы и методы. Исследования проведены в группе условно здоровых доноров (*n* = 315) на проточном цитометре Cytomics FC500 с использованием реагента CytoDiff™, который представлен 5-цветным набором из 6 антител (CD36-FITC, CD2-PE, CD294-PE, CD19-ECD, CD16-Cy5, CD45-Cy7), позволяющим подсчитать 17 клеточных популяций.

Результаты. Получены референсные значения популяций лейкоцитов периферической крови с использованием многоцветной проточной цитометрии. В процессе работы у 1 первичного донора обнаружено лимфопролиферативное заболевание, которое в дальнейшем было подтверждено иммунофенотипированием; установлен диагноз В-клеточного хронического лимфолейкоза.

Заключение. Многоцветная проточная цитометрия с использованием CytoDiff™ — это новый шаг в оценке лейкоцитарной формулы, направленный во многом на то, чтобы в крупных лабораториях снизить число исследований мазков крови с использованием световой микроскопии, повысить объективность, точность и воспроизводимость результатов. Расширенная лейкоцитарная формула за счет субпопуляций лимфоцитов и моноцитов может представлять современный скрининг донорской крови, способный выявлять изменения в субпопуляционном составе лимфоцитов, что служит основанием для дальнейшего обследования донора.

Ключевые слова: многоцветная проточная цитометрия, референсные интервалы, лейкоцитарная формула.

Получено: 11 марта 2018 г.
Принято в печать: 5 июля 2018 г.

Clinical oncohematology. 2018;11(4):319–25

ONCO clinical HEMATOLOGY

NEW TECHNOLOGIES

The Use of Multicolor Flow Cytofluorometry in White Blood Cell Differential: HematoFlow Conception

SA Lugovskaya[1], FA Dyukov[1], EV Naumova[1], IYu Bugrov[1], AI Kostin[2]

[1] Russian Medical Academy of Postgraduate Education, 2/1 Barrikadnaya str., Moscow, Russian Federation, 125993

[2] NV Sklifosovskii Research Institute of Emergency Medicine, 3 Bol'shaya Sukharevskaya sq. Moscow, Russian Federation, 129090

ABSTRACT

Aim. To develop reference intervals for white blood cell subpopulations in peripheral blood using Cytomics FC500 flow cytometer and CytoDiff™ reagent (Beckman Coulter).

Materials & Methods. The trial included the analysis of blood samples of healthy donors (*n* = 315) using Cytomics FC500 flow cytometer and CytoDiff™ reagent cocktail composed of 6 antibodies in 5 colors (CD36-FITC, CD2-PE, CD294-PE, CD19-ECD, CD16-Cy5, CD45-Cy7) and enabling to count 17 cell populations.

Results. The data obtained by means of multicolor flow cytofluorometry included the reference values of white blood cell populations in peripheral blood. In 1 first-time donor a lymphoproliferative disease was detected. It was subsequently confirmed by immunophenotyping; B-cell chronic lymphocytic leukemia was diagnosed.

Conclusion. Multicolor flow cytofluorometry using CytoDiff™ is considered to be a new step toward an improved WBC differential evaluation aimed mainly at reducing the volume of blood smear analysis using light microscopy at large laboratories, enhancing objectivity, precision and reproducibility of results. WBC differential extended with the count of lymphocyte and monocyte subpopulations can be regarded as modern donor blood screening to detect changes in the pattern of lymphocyte subpopulations as grounds for further examination of donors.

Keywords: multicolor flow cytofluorometry, reference intervals, WBC differential.

Received: March 11, 2018
Accepted: July 5, 2018

© 2018 практическая медицина

Для переписки: Светлана Алексеевна Луговская, д-р мед. наук, профессор, ул. Баррикадная, д. 2/1, Москва, Российская Федерация, 125993; тел.: +7(495)945-82-22; e-mail: slugovskaya@mail.ru

Для цитирования: Луговская С.А., Дюков Ф.А., Наумова Е.В. и др. Использование многоцветной проточной цитофлюориметрии в дифференциальном подсчете лейкоцитов: концепция HematoFlow. Клиническая онкогематология. 2018;11(4):319–25.

DOI: 10.21320/2500-2139-2018-11-4-319-325

For correspondence: Prof. Svetlana Alekseevna Lugovskaya, MD, PhD, 2/1 Barrikadnaya str., Moscow, Russian Federation, 125993; Tel.: +7(495)945-82-22; e-mail: slugovskaya@mail.ru

For citation: Lugovskaya SA, Dyukov FA, Naumova EV, Bugrov IYu, et al. The Use of Multicolor Flow Cytofluorometry in White Blood Cell Differential: HematoFlow Conception. Clinical oncohematology. 2018;11(4):319–25.

DOI: 10.21320/2500-2139-2018-11-4-319-325

ВВЕДЕНИЕ

Автоматизированный общий анализ крови с дифференцировкой лейкоцитов на 5 основных популяций (лейкоцитарной формулой) является важным и наиболее распространенным тестом, который используется в диагностике и мониторировании многих заболеваний (таких как сепсис, инфекции, воспалительные процессы, злокачественные опухоли, лейкозы, лимфомы и др.). Преимуществами современных технологий подсчета и оценки форменных элементов крови являются высокая производительность (до 100–120 проб в час), небольшой объем крови для исследования (12–200 мкл), анализ большого массива (десятки тысяч) клеток, определение с высокой точностью и воспроизводимостью от 30 до более 60 параметров одновременно, графическое представление результатов исследований (гистограммы, скатерограммы). Современные гематологические анализаторы обладают высокой чувствительностью, позволяющей обнаруживать количественные и качественные аномалии, отображающиеся прибором в виде флагов (атипичные лимфоциты, аномальные лимфоциты, бластные клетки, незрелые гранулоциты). Дальнейшее исследование образцов патологической крови для надежной дифференциальной оценки лейкоцитов проводится с использованием световой микроскопии окрашенных мазков крови.

Автоматизация общего анализа крови является ключевым решением для лабораторий с постоянно растущим потоком гематологических исследований, которая позволит повысить пропускную способность, точность и эффективность исследования. В гематологии автоматизация уже охватила преаналитический и аналитический этапы, однако последний этап — микроскопия окрашенных препаратов крови — по-прежнему отнимает много времени, является трудоемким и подчас субъективным исследованием. В соответствии с рекомендациями Clinical and Laboratory Standards Institute (CSLI) [1] необходимо подсчитывать в окрашенном препарате 400 лейкоцитов для статистически более точной их дифференциации на 5 популяций (нейтрофилы, базофилы, эозинофилы, моноциты, лимфоциты). На практике в лабораториях наиболее часто проводится подсчет 100, реже 200 клеток, а при наличии лейкопении — 50 клеток, что снижает диагностическую ценность данного метода. При резко выраженной лейкопении дифференциальный подсчет лейкоцитов затруднен и морфолог проводит только просмотр окрашенных препаратов. Еще одним недостатком ручного подсчета лейкоцитарной формулы является неравномерное распределение клеток крови в окрашенном мазке, что необходимо учитывать при подсчете клеток по определенной траектории. Таким образом, традиционное микроскопическое исследование имеет три источника ошибок: за счет неравномерного распределения клеток в мазке крови, субъективной оценки морфологии и, самое важное, статистической ошибки из-за небольшого числа анализируемых клеток [2].

В российских лабораториях процент подсчета лейкоцитарной формулы в образцах крови широко варьирует (от 10 до 50 %). В некоторых лабораториях принято считать лейкоцитарную формулу у всех пациентов, несмотря на отсутствие патологических «флагов» по результатам дифференциального подсчета лейкоцитов на гематологическом анализаторе. В связи с совершенствованием технологий дифференциального подсчета клеток крови в гематологических анализаторах доля ручной микроскопии снижается. По данным некоторых авторов [3] показано, что в 263 больницах и независимых лабораториях США ручной подсчет лейкоцитарной формулы в среднем выполняется в 26,7 % образцов. В ряде лабораторий клиник Франции менее 5 % проанализированных мазков крови требуют дальнейших исследований (иммунофенотипирования, цитогенетического и молекулярного исследований) [4].

Кроме того, по морфологии лимфоцитов и моноцитов невозможно определить их субпопуляции (Т-, В-лимфоциты, естественные киллеры [NK], провоспалительные моноциты). В сложных случаях (наличие атипичных лимфоцитов, бластных клеток) требуется опыт морфолога в области онкогематологии, а это подразумевает специализированную профессиональную подготовку специалистов, непрерывное совершенствование знаний. Достоинством световой микроскопии является тот факт, что это дешевый метод, который позволяет детально оценить морфологию клеток (особенности структуры хроматина, наличие включений, зернистости в цитоплазме), охарактеризовать морфологию эритроцитов, тромбоцитов, бластных клеток.

Многоцветная проточная цитофлюориметрия (МПЦ) сегодня является привлекательной альтернативой световой микроскопии, предоставляя возможность анализа десятков тысяч лейкоцитов, объективного выделения, благодаря использованию моноклональных антител, субпопуляций лимфоцитов, моноцитов, пяти основных клеточных популяций лейкоцитов, незрелых гранулоцитов, а также

бластных клеток (с предположительной идентификацией клеточной линии). Преимуществами дифференциального подсчета лейкоцитов, основанного на иммунологической классификации клеток методом МПЦ, являются стандартизация, высокая специфичность распознавания клеток без снижения чувствительности, получение большей информации за счет идентификации клеток, находящихся за пределами возможностей морфологических исследований, таких как В-,Т-, NK-клетки. В рутинной гематологической практике в настоящее время МПЦ используется как референсный метод подсчета тромбоцитов и ретикулоцитов. В рамках международного комитета по стандартизации в гематологии (International Committee on Standardization in Hematology, ICSH) ведется проект по разработке нового референсного метода для лейкоцитарной формулы с использованием моноклональных антител и многоцветной проточной цитометрии [5].

Компанией Beckman Coulter (BC, США) разработана концепция HematoFlow, которая представляет собой автоматизированное решение объединения гематологического анализатора (LH755, DxH850, BC, США) с проточным цитометром Cytomics FC500 (BC, США) для подсчета лейкоцитарной формулы. Появление патологических «флагов» при дифференциальном подсчете лейкоцитов на гематологическом анализаторе требует дальнейшего анализа образца крови на проточном цитометре. Для этого используется реагент CytoDiff™, представляющий собой 5-цветный набор из 6 антител (CD36-FITC, CD2-PE, CD294-PE, CD19-ECD, CD16-Cy5, CD45-Cy7), который позволяет подсчитать 17 клеточных популяций (табл. 1).

Помимо стандартных популяций лейкоцитов (таких как нейтрофилы, лимфоциты, моноциты, эозинофилы и базофилы) иммунологический подсчет позволяет определить дополнительные клеточные популяции: В-лимфоциты, Т/NK-лимфоциты, незрелые гранулоциты и бластные клетки. Кроме того, определяется содержание таких иммунных популяций, как CD16-позитивные и негативные моноциты, CD16-позитивные и негативные Т- и NK-лимфоциты. В проточном цитометре Cytomics FC500 (BC, США) используется программа автоматического гейтирования клеточных популяций, что позволяет существенно облегчить обучение этой технологии и привлекать к работе с прибором средний медицинский персонал.

Таким образом, используя всего 100 мкл крови и реагент CytoDiff™, можно подсчитать относительное и абсолютное число всех популяций лейкоцитов (зрелых нейтрофилов, незрелых гранулоцитов, эозинофилов, базофилов, моноцитов, лимфоцитов), а также их субпопуляций (В, Т/NK). В целом CytoDiff™ позволяет исследовать с диагностической целью 9 популяций лейкоцитов, а с исследовательской — 8 (табл. 2).

Установление референсных интервалов (РИ) является первым необходимым шагом для введения нового метода в гематологическую лабораторию. Поэтому первым этапом нашего исследования было получение РИ для субпопуляций лейкоцитов периферической крови с использованием проточного цитометра Cytomics FC500 и CytoDiff™.

Таблица 1. Набор моноклональных антител в реагенте CytoDiff™ (5 цветов/6 маркеров)

Антиген	Экспрессия на клетках
CD45-Cy7	Все лейкоциты
CD36-FITC	Моноциты, эритроциты, тромбоциты
CD2-PE	Т-лимфоциты, NK-клетки, Т-бласты
CD294-PE	Эозинофилы, базофилы, активированные Т-клетки
CD19-ECD	В-лимфоциты, В-бласты
CD16-Cy5	Нейтрофилы, провоспалительные моноциты, цитотоксические Т/NK-клетки

Таблица 2. Определение субпопуляций лимфоцитов, моноцитов и идентификация бластных клеток с использованием CytoDiff™

Регион	Популяция
Xt	Т-бласты
Xb	В-бласты
Xn	Ранние не-В-, не-Т-клетки
Xm	Монобласты
T+	Т/NK-лимфоциты CD16+
T–	Т/NK-лимфоциты CD16–
Mo+	Провоспалительные моноциты
Mo–	Классические моноциты

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено у 315 доноров (237 мужчин и 78 женщин) в возрасте 19–59 лет. Кровь, стабилизированная K_2-EDTA, анализировалась в течение 8 ч с момента взятия с использованием реагентов CytoDiff™. Для прямого окрашивания антителами брали 10 мкл реагента CytoDiff™ и 100 мкл венозной крови. После 15-минутной инкубации в темноте эритроциты лизировали с помощью реагента Versalyse™ (BC, США). Анализ и подсчет относительного и абсолютного числа клеток проводились после регистрации 20 000 лейкоцитов на проточном цитометре Cytomics FC500 (BC, США), позволяющего проводить исследование по 5 цветам с использованием программы автоматического гейтирования CytoDiff CXP. Настройка напряжений и компенсация флюоресценции выполнялись автоматическим методом в соответствии с рекомендациями производителя. Перед каждой серией измерений настройки фотоумножителей прибора проверялись с помощью флюоресцирующих калибровочных частиц (флюоросфер FlowSet, BC). Флюоросферы FlowCheck (BC, США) ежедневно использовались для настройки контроля гидродинамики и оптической шкалы цитометра Cytomics FC500. 95% РИ были рассчитаны с использованием программы MedCalc (MedCalc Statistical Software, version 16.1, bvba, Бельгия). При получении РИ для устранения маскирующего влияния аномальных значений выбросы определяли по методу Тьюки и исключали их из расчетов. РИ (2,5–97,5 ‰) и их 90%-е доверительные интервалы рассчитывали по методу, рекомендованному NCCLS и CLSI C28-A2 и C28-A3. Тип распределения определялся по критерию Д'Агостино—Пирсона. Для оценки различий между значениями параметров у мужчин и женщин использовался *U*-критерий Манна—Уитни в случае ненормального распределения и *t*-критерий в

Таблица 3. Референсные интервалы дифференциального подсчета относительного и абсолютного числа лейкоцитов периферической крови здоровых доноров

	Мужчины					Женщины					*p* (критерий Манна–Уитни для мужчин и женщин)**
Популяции клеток	**Размер выборки (*n* = 237)**	**Нижняя граница**	**Медиана**	**Верхняя граница**	**Тест Д'Агостино—Пирсона***	**Размер выборки (*n* = 78)**	**Нижняя граница**	**Медиана**	**Верхняя граница**	**Тест Д'Агостино—Пирсона***	
B-лимфоциты, %	233	1,33	4,43	7,61	**0,0772**	76	1,66	4,92	8,39	**0,2748**	0,0190
B-лимфоциты, *n*	171	91,68	278,00	594,00	0,0206	61	103,00	316,34	573,93	**0,4002**	0,0038
T–, %	231	13,94	25,32	37,81	**0,3793**	76	15,10	29,41	41,99	**0,8478**	0,0060
T–, *n*	171	668,86	1595,00	2643,00	**0,1697**	64	986,00	2044,54	3187,86	**0,2979**	< 0,0001
T+, %	230	1,67	4,73	10,24	0,0008	73	0,78	4,83	9,13	**0,0686**	0,9703
T+, *n*	168	111,00	303,00	657,00	0,0041	53	77,00	317,00	545,23	**0,7232**	0,2243
T/NK-лимфоциты, %	233	17,58	30,42	44,85	**0,1923**	75	20,45	34,31	47,04	**0,5983**	0,0025
T/NK-лимфоциты, *n*	172	1112,20	1927,00	3480,00	0,0074	65	1266,00	2352,41	3749,72	**0,3882**	< 0,0001
Всего лимфоцитов, %	230	21,07	34,50	50,13	**0,2921**	76	23,60	39,56	54,81	**0,6350**	0,0012
Всего лимфоцитов, *n*	171	1286,10	2213,00	3958,00	0,0112	64	1477,00	2768,65	4212,79	**0,3771**	< 0,0001
M–, %	232	4,47	8,28	12,12	**0,5516**	77	4,23	7,17	10,49	**0,7431**	0,0001
M–, *n*	171	237,26	523,00	828,00	**0,1772**	57	258,00	460,08	676,21	**0,4308**	0,1295
M+, %	219	0,18	0,45	1,01	0,0005	76	–0,08	0,46	1,01	0,0094	0,3692
M+, *n*	157	10,38	30,00	65,00	0,0117	65	–11,00	28,83	74,09	0,0138	0,8788
Всего моноцитов, %	233	4,79	8,77	13,01	**0,3693**	77	4,42	7,68	11,39	**0,8100**	0,0003
Всего моноцитов, *n*	171	257,58	557,00	881,00	**0,1734**	57	279,00	488,04	718,94	**0,5233**	0,1217
Незрелые гранулоциты, %	202	0,01	0,08	0,24	< 0,0001	73	–0,09	0,05	0,19	0,0083	0,0044
Незрелые гранулоциты, *n*	148	0,72	5,00	17,00	0,0005	60	–6,00	4,00	14,00	0,0153	0,0318
Всего эозинофилов, %	209	0,75	2,20	5,16	0,0013	75	–0,38	2,35	5,59	0,0359	0,5028
Всего эозинофилов, *n*	158	41,17	149,00	342,00	0,0114	62	0,0	161,30	417,00	0,0020	0,1856
Зрелые нейтрофилы, %	234	32,32	51,33	68,46	**0,1844**	77	29,92	48,72	66,20	**0,4482**	0,0740
Зрелые нейтрофилы, *n*	169	1511,30	3127,00	5573,00	0,0399	65	1203,00	3279,10	5553,00	**0,4402**	0,5774
Всего нейтрофилов, %	235	32,47	51,38	68,53	**0,1874**	77	30,04	48,73	66,28	**0,4827**	0,0627
Всего нейтрофилов, *n*	170	1523,20	3130,00	5577,00	0,0347	65	1211,00	3289,00	5562,00	**0,4278**	0,6123
Xb	200	0,01	0,03	0,09	0,0020	72	0,0	0,03	0,09	0,0417	0,1620
Xt	226	0,03	0,13	0,36	< 0,0001	76	0,0	0,14	0,33	0,0153	0,7935
Xm	194	0,0	0,01	0,03	0,0001	57	0,0	0,01	0,03	**0,3262**	0,1675
Xn	203	0,01	0,05	0,13	0,0019	69	0,0	0,06	0,13	0,0009	0,9107
Всего базофилов, %	229	0,35	0,90	1,76	0,0020	77	0,20	0,90	1,58	**0,5588**	0,5851

* Референсные значения 2,5–97,5 ‰. Полужирным шрифтом выделено нормальное распределение.

** Статистически значимо при $p < 0,05$.

случае нормального распределения анализируемого параметра.

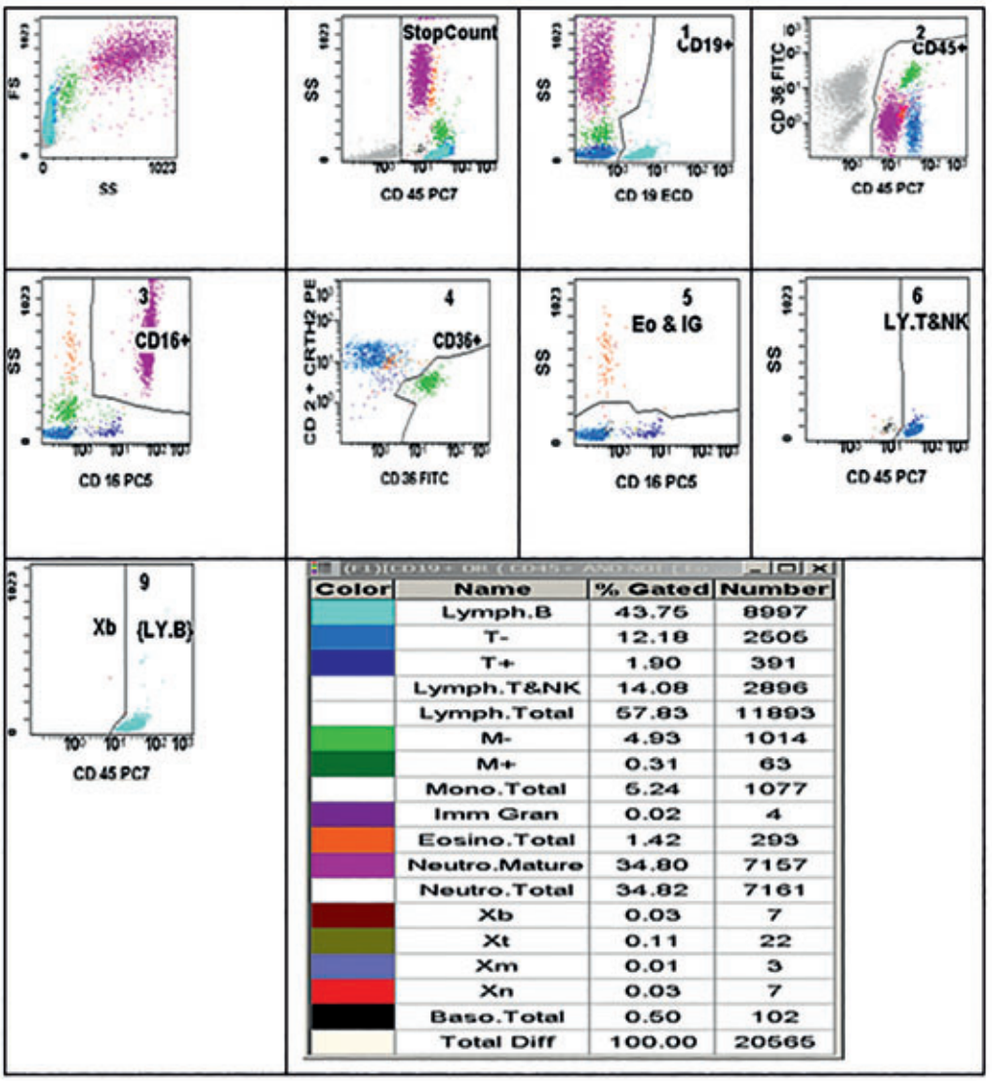
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

РИ популяций лейкоцитов периферической крови, полученных на проточном цитометре Cytomics FC500 и CytoDiff™, представлены в табл. 3.

В процессе исследования крови доноров с целью получить РИ было выявлено два патологических образца крови. В 1 случае (первичный донор, 44 года) отмечалось повышенное содержание В-лимфоцитов (43,75 %) (рис. 1). В общем анализе крови количество лейкоцитов было 8,56 × 10^9/л, лимфоцитов — 56,3 %. Дальнейшее расширенное иммунофенотипирование этого образца крови с использованием 10-цветного анализа (проточный цитометр Navios, BC) позволило установить диагноз В-клеточного хронического лимфолейкоза.

В другом случае выявлено значительное число CD16-негативных гранулоцитов (45,65 %) при нормальной лейкоцитарной формуле, которые цитометр определил как незрелые гранулоциты, однако при исследовании окрашенного мазка крови эти клетки не обнаружены. Исследование иммунограммы этого донора показало снижение абсолютного числа клеток CD4+, но ВИЧ-инфекция не была подтверждена. В литературе описано изменение экспрессии CD16 на нейтрофилах при сепсисе у новорожденных, одновременном носительстве ВИЧ-инфекции и туберкулеза, пароксизмальной ночной гемоглобинурии (ПНГ), а также при генетическом дефекте экспрессии CD16, встречающемся с частотой 1:1000 человек [6, 7]. По результатам скрининга было решено не использовать данные компоненты крови в клинике. В первом случае они были переведены в брак по признаку наличия у донора онкопатологии, во втором случае компоненты крови были переданы в лабораторию контроля качества.

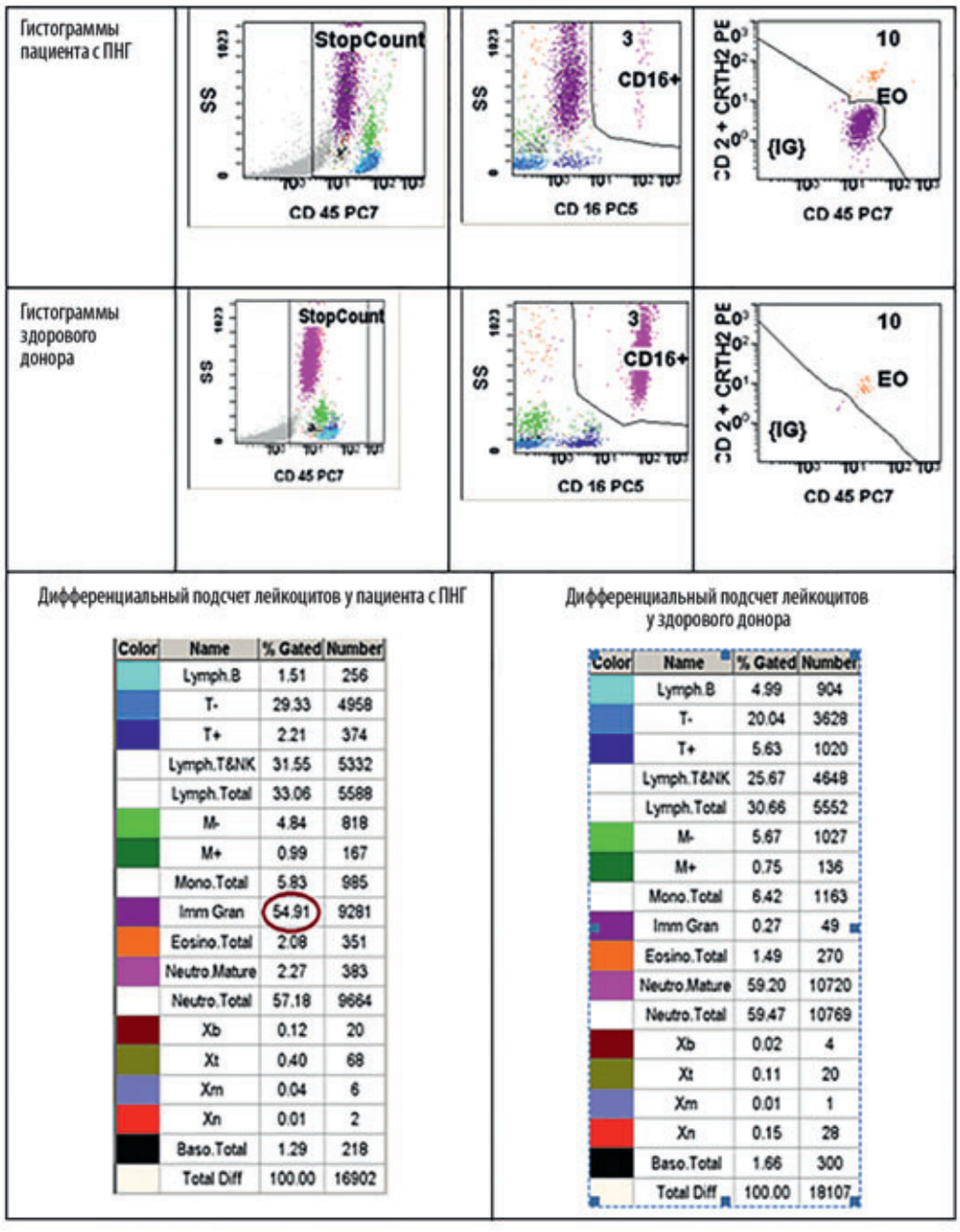
Таким образом, предварительный скрининг популяций лейкоцитов с использованием МПЦ и панели CytoDiff™ может повысить объективность селекции доноров по медицинским показаниям, безопасность



Color	Name	% Gated	Number
	Lymph.B	43.75	8997
	T-	12.18	2505
	T+	1.90	391
	Lymph.T&NK	14.08	2896
	Lymph.Total	57.83	11893
	M-	4.93	1014
	M+	0.31	63
	Mono.Total	5.24	1077
	Imm Gran	0.02	4
	Eosino.Total	1.42	293
	Neutro.Mature	34.80	7157
	Neutro.Total	34.82	7161
	Xb	0.03	7
	Xt	0.11	22
	Xm	0.01	3
	Xn	0.03	7
	Baso.Total	0.50	102
	Total Diff	100.00	20565

Рис. 1. Случай В-клеточного хронического лимфолейкоза, выявленный с помощью CytoDiff™ у первичного донора. CD19-позитивные клетки составляют 43,75 %

Fig. 1. A case of B-cell chronic lymphocytic leukemia detected by means of CytoDiff™ in a first-time donor. CD19-positive cell accounted for 43.75 %



Дифференциальный подсчет лейкоцитов у пациента с ПНГ

Color	Name	% Gated	Number
	Lymph.B	1.51	256
	T-	29.33	4958
	T+	2.21	374
	Lymph.T&NK	31.55	5332
	Lymph.Total	33.06	5588
	M-	4.84	818
	M+	0.99	167
	Mono.Total	5.83	985
	Imm Gran	54.91	9281
	Eosino.Total	2.08	351
	Neutro.Mature	2.27	383
	Neutro.Total	57.18	9664
	Xb	0.12	20
	Xt	0.40	68
	Xm	0.04	6
	Xn	0.01	2
	Baso.Total	1.29	218
	Total Diff	100.00	16902

Дифференциальный подсчет лейкоцитов у здорового донора

Color	Name	% Gated	Number
	Lymph.B	4.99	904
	T-	20.04	3628
	T+	5.63	1020
	Lymph.T&NK	25.67	4648
	Lymph.Total	30.66	5552
	M-	5.67	1027
	M+	0.75	136
	Mono.Total	6.42	1163
	Imm Gran	0.27	49
	Eosino.Total	1.49	270
	Neutro.Mature	59.20	10720
	Neutro.Total	59.47	10769
	Xb	0.02	4
	Xt	0.11	20
	Xm	0.01	1
	Xn	0.15	28
	Baso.Total	1.66	300
	Total Diff	100.00	18107

Рис. 2. Использование CytoDiff™ в скрининге ПНГ. На гистограмме пациента с ПНГ повышен процент CD16-негативных гранулоцитов (ImmGran — незрелые гранулоциты) по сравнению с гистограммой у здорового донора
ПНГ — пароксизмальная ночная гемоглобинурия.

Fig. 2. The use of CytoDiff™ in PNH screening. The PNH patient's histogram shows an increased percentage of CD16-negative granulocytes (ImmGran — immature granulocytes) compared to the histogram of a healthy donor
ПНГ — paroxysmal nocturnal hemoglobinuria.

донации, качество заготавливаемых компонентов крови и в конечном итоге безопасность для реципиента. Расширенная лейкоцитарная формула за счет субпопуляций лимфоцитов и моноцитов может представлять современный скрининг донорской крови, способный выявить изменения в субпопуляционном составе лимфоцитов, что считается основанием для дальнейшего обследования донора.

Из литературы известно, что CD16-негативные гранулоциты наблюдаются при ПНГ [6–8]. Учитывая этот факт, мы использовали CytoDiff™-анализ у 53 пациентов, направленных с подозрением на ПНГ. У всех больных отмечалась анемия (гемоглобин 62–105 г/л), тромбоцитопения (130–50 × 10^9/л) и/или лейкопения различной степени выраженности. Диагноз ПНГ подтвержден у 6 пациентов, у 7 — окончательный диагноз был апластическая анемия с ПНГ-клоном. У всех 13 больных (4 мужчины, 9 женщин, средний возраст 41,5 года) выявлен различный процент CD16-негативных гранулоцитов (3–45 %), идентифицированных прибором как незрелые гранулоциты (рис. 2). При микроскопии окрашенных мазков крови незрелые гранулоциты обнаружены не были, на основании чего мы пришли к выводу, что ложно завышенный процент незрелых гранулоцитов обусловлен отсутствием экспрессии CD16 на нейтрофилах. Получена хорошая корреляция между процентом незрелых гранулоцитов и размером ПНГ-клона (r = 0,9257). Таким образом, наши данные показали, что

CytoDiff™-анализ, выявляя низкую экспрессию CD16 на нейтрофилах, является хорошим скринингом при подозрении на ПНГ у больных с анемическим синдромом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, многоцветная проточная цитометрия с использованием CytoDiff™ — это новый шаг в оценке лейкоцитарной формулы, направленный во многом на то, чтобы в крупных лабораториях снизить число микроскопических исследований мазков крови, повысить объективность, точность и воспроизводимость результатов [9–11]. Наши предварительные исследования показали, что CytoDiff™-анализ успешно может быть внедрен в систему скрининга донорской крови на станциях и в отделениях переливания крови. Выявленный В-клеточный лимфоцитоз у первичного донора подтвердил необходимость изменения существующей схемы оценки крови доноров (оценка концентрации гемоглобина и гематокрита при первичной донации). Определяемые субпопуляции лимфоцитов и моноцитов, незрелые гранулоциты могут предоставить клиницистам важную информацию относительно наличия скрытого воспалительного процесса, состояния иммунной системы, а также внести определенный вклад в скрининг редкой патологии — пароксизмальной ночной гемоглобинурии.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование финансировалось компанией Beckman Coulter.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция и дизайн: С.А. Луговская, Е.В. Наумова.
Сбор и обработка данных: Ф.А. Дюков, Е.В. Наумова, И.Ю. Бугров.
Анализ и интерпретация данных: С.А. Луговская, Е.В. Наумова, А.И. Костин.
Подготовка рукописи: С.А. Луговская, Е.В. Наумова, Ф.А. Дюков, А.И. Костин.
Окончательное одобрение рукописи: все авторы.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Koepke JA, van Assendelft OW, Brindza LJ, et al. Reference leukocyte (WBC) differential count (proportional) and evaluation of instrumental methods. Wayne, PA: CLSI; 2007. pp. 1–35.
2. Rumke CL. Laboratory aids. Variability of results in differential cell counts on blood smears. Triangle. 1960;4:154–8.
3. Novis DA, Walsh M, Wilkinson D, et al. Laboratory Productivity and the Rate of Manual Peripheral Blood Smear Review: A College of American Pathologists Q-Probes Study of 95,141 Complete Blood Count Determinations Performed in 263 Institutions. Arch Pathol Lab Med. 2006;130(5):596–601.
4. Roussel M, Benard C, Ly-Sunnaram B, Fest T. Refining the white blood cell differential: The first flow cytometry routine application. Cytometry. 2010;77A(6):552–63. doi: 10.1002/cyto.a.20893.
5. Roussel M, Davis BH, Fest T, Wood BL. Toward a reference method for leukocyte differential counts in blood: Comparison of three flow cytometric candidate methods. Cytometry. 2012;81A(11):973–82. doi: 10.1002/cyto.a.22092.
6. Elghetany MT, Lacombe F. Physiologic variations in granulocytic surface antigen-expression: Impact of age, gender, pregnancy, race, and stress. J Leuk Biol. 2004;75(2):157–62. doi: 10.1189/jlb.0503245.
7. Fromont P, Bettaieb A, Skouri H, et al. Frequency of the polymorphonuclear neutrophil Fc gamma receptor III deficiency in the French population and its involvement in the development of neonatal alloimmune neutropenia. Blood. 1992;79(8):2131–4.
8. Meddws-Taylor S, Martin DJ, Tiemessen CT. Altered Expression of FcγRIII (CD16) on Polymorphonuclear Neutrophils from Individuals with Human Immunodeficiency Virus Type 1 Disease and Pulmonary Tuberculosis. Clin Diagn Lab Immunol. 1997;4(6):789–91.
9. Faucher J-L, Lacronique-Gazaille C, Frebet E, et al. “6 Markers/5 Colors” Extended White Blood Cell Differential by Flow Cytometry. Cytometry Part A. 2007;71A(11):934–44. doi: 10.1002/cyto.a.20457.
10. Huang CM, Yu LH, Pu CW, et al. Assessment of a five-color flow cytometric assay for verifying automated white blood cell differentials. Chin Med J. 2013;126(4):716–21.
11. Qu C, Wang J, Pu C, et al. Efficiency of Leukocyte Differential Using Flow Cytometry with CytoDiff in Different Workflows. Clin Lab. 2017;63(4):659–68. doi: 10.7754/Clin.Lab.2017.161221.