

DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-145-151

Метод фильтруемости эритроцитов в диагностике наследственного сфероцитоза

Д.С. Прудинник^{1,2}, Л.Д. Колева^{1,2}, Е.А. Бовт^{1,2}, Н.С. Кушнир^{1,2}, А.С. Суворова¹, И.А. Долгих¹, С.С. Шахиджанов^{1,2}, В.М. Витвицкий², Ф.И. Атауллаханов², Е.И. Синауридзе^{1,2}, С.А. Плясунова¹, Н.С. Сметанина¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

²ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН, Москва

Дифференциальная диагностика наследственного сфероцитоза является сложной задачей из-за схожести клинических и лабораторных проявлений у пациентов с данным заболеванием и другими формами наследственных гемолитических анемий, а также из-за малой доступности молекулярно-генетических исследований. Разработка легко выполнимых лабораторных исследований для дифференциальной диагностики наследственных гемолитических анемий остается актуальной. В настоящей работе впервые предложено использовать для диагностики наследственного сфероцитоза метод измерения фильтруемости эритроцитов. Цель исследования: сравнить метод фильтруемости эритроцитов с другими методами диагностики наследственного сфероцитоза и оценить его специфичность и чувствительность. В исследование включены 30 пациентов (18 девочек и 12 мальчиков, средний возраст 8,6 года) с наследственным сфероцитозом и 15 пациентов (9 девочек и 6 мальчиков, средний возраст 10 лет) с другими наследственными гемолитическими анемиями (дефицит пируваткиназы ($n = 14$) и стоматоцитоз ($n = 1$)). Для диагностики наследственной гемолитической анемии пациентам выполнялись исследование общего анализа крови на автоматическом гематологическом анализаторе, осмотической резистентности до и после 24 ч инкубации при 37°C, эритроцитометрия с расчетом индекса сферичности, ЭМА-тест (связывание эозин-5-малеимида) и измерение фильтруемости эритроцитов через искусственные фильтры с цилиндрическими порами диаметром 3–5 мкм. Настоящее исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. Родители всех пациентов, включенных в исследование, подписали добровольное информированное согласие на забор крови из периферической вены и проведение диагностических исследований. Фильтруемость эритроцитов для всех случаев диагностированного в соответствии с действующими клиническими рекомендациями наследственного сфероцитоза очень низкая (0–0,31 ед.). Она была выше только в 3 случаях и составила 0,47, 0,64 и 0,82 ед., но в 2 из них отсутствовали данные генетики, а еще в 1 случае была обнаружена мутация *SPTA1* с.4339-99C>T, которая ранее была охарактеризована не только как наследственный сфероцитоз, но и как эллиптоцитоз. Фильтруемость эритроцитов в группе других гемолитических анемий составила от 0,55 до 0,86 ед. (медиана 0,77 ед.). Чувствительность метода фильтруемости по отношению к наследственному сфероцитозу составила 93% (при специфичности 100%), тогда как для ЭМА-теста – 89% (при специфичности 95%). Проведенные сравнительные исследования показали, что при диагностике наследственного сфероцитоза измерение фильтруемости эритроцитов не уступает ЭМА-тесту по чувствительности и специфичности, однако это исследование гораздо менее трудоемко и затратно, поскольку не требует дорогого оборудования и может быть легко проведено в любой лаборатории.

Ключевые слова: эритроцит, гемолитическая анемия, наследственный сфероцитоз, фильтруемость эритроцитов, дефицит пируваткиназы, осмотическая резистентность эритроцитов, ЭМА-тест, индекс сферичности

Прудинник Д.С. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2024; 23 (2): 145–51. DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-145-151

Red blood cell filterability measurement in the diagnosis of hereditary spherocytosis

D.S. Prudinnik^{1,2}, L.D. Koleva^{1,2}, E.A. Bovt^{1,2}, N.S. Kushnir^{1,2}, A.S. Suvorova¹, I.A. Dolgikh¹, S.S. Shakhidjanov^{1,2}, V.M. Vitvitsky², F.I. Ataulakhonov², E.I. Sinauridze^{1,2}, S.A. Plyasunova¹, N.S. Smetanina¹

¹The Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

²Center for Theoretical Problems of Physico-Chemical Pharmacology of the Russian Academy of Sciences, Moscow

The differential diagnosis of hereditary spherocytosis is a great challenge because of the similar clinical and laboratory signs it shares with other hereditary hemolytic anemias as well as due to the limited availability of molecular genetic testing. The development of easy-to-perform laboratory tests for the differential diagnosis of hereditary hemolytic anemias remains as relevant as ever. Here, a method of measuring red blood cell filterability for the diagnosis of hereditary spherocytosis is proposed for the first time. The aim of our study was to compare red blood cell filterability measurement with other diagnostic tests for hereditary spherocytosis as well as to assess its specificity and sensitivity. We included 30 patients (18 girls and 12 boys, with the median age of 8.6 years) with hereditary spherocytosis and 15 patients (9 girls and 6 boys, with the median age of 10 years) with other hereditary hemolytic anemias (pyruvate kinase deficiency ($n = 14$) and stomatocytosis ($n = 1$)). The diagnostic work-up for hereditary hemolytic anemia included a complete blood count test using an automated hematology analyzer, an osmotic resistance analysis before and after 24 hours of incubation at 37°C, erythrocytometry with sphericity index calculation, EMA test (eosin-5-maleimide binding assay) and red blood cell filterability measurement using artificial filters with cylindrical pores 3–5 μm in diameter. The study was approved by the Independent Ethics Committee and the Scientific Council of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology. The parents of all of the enrolled children signed a voluntary informed consent form for peripheral blood collection and diagnostic

© 2024 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Поступила 29.04.2024
Принята к печати 31.05.2024



EDN: NSAJAA

Контактная информация:

Синауридзе Елена Ивановна,
д-р биол. наук, канд. хим. наук, заведующая лабораторией биофизики
ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России; заведующая лабораторией физиологии и биофизики
клетки ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН
Адрес: 117997, Москва, ул. Саморы Машела, 1
E-mail: sinaurid@list.ru

© 2024 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 29.04.2024
Accepted 31.05.2024

Correspondence:

Elena Sinauridze,
Doctor of Biological Sciences, Candidate of Chemical Sciences, Head of the Laboratory of Biophysics at the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation; Head of the Laboratory of Cell Physiology and Biophysics at the Center for Theoretical Problems of Physico-Chemical Pharmacology of the Russian Academy of Sciences
Address: 1 Samory Mashela St., Moscow 117997, Russia
E-mail: sinaurid@list.ru

testing. In all the cases of hereditary spherocytosis diagnosed in accordance with the relevant clinical recommendations, red blood cell filterability was very low (0–0.31 units). It was higher only in 3 instances, reaching 0.47, 0.64 и 0.82 units, but in two of these cases there were no genetic data available, and the remaining patient was found to harbor the *SPTA1* c.4339–99C>T mutation which was characterized both as spherocytosis and elliptocytosis. Red blood cell filterability in the group of the patients with other hemolytic anemias equalled 0.55 to 0.86 units (with the median of 0.77 units). The sensitivity of the RBC filterability measurement method in diagnosing hereditary spherocytosis was 93% (with 100% specificity), while the EMA test had a sensitivity of 89% and specificity of 95%. Our comparative study showed that red blood cell filterability measurement and the EMA test have similar sensitivity and specificity in diagnosing hereditary spherocytosis but the former is much cheaper and easier to perform since it does not require expensive equipment and can be carried out at any laboratory.

Key words: red blood cell, hemolytic anemia, hereditary spherocytosis, red blood cell filterability, pyruvate kinase deficiency, osmotic resistance of red blood cells, EMA test, sphericity index

Prudinnik D.S., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2024; 23 (2): 145–51.
DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-145-151

Наследственный сфероцитоз (НС) является наиболее распространенной причиной врожденной гемолитической анемии (ГА). Он диагностируется с частотой 1 на 2000 человек, хотя значительное количество бессимптомных случаев могут оставаться недиагностированными [1]. Причиной анемии при НС является сокращение времени жизни эритроцитов в кровотоке в результате снижения их деформируемости. Обусловленный генетическими мутациями качественный или количественный дефицит мембранных белков приводит к нарушению связи цитоскелета внутренней мембраны эритроцитов с ее внешним липидным бислоем. Это сопровождается прогрессирующей потерей площади мембраны в микроциркуляторном русле (уменьшением отношения площади поверхности клетки к ее объему), что приводит к изменению формы и сокращению продолжительности жизни эритроцитов. Аномалии мембраны сопровождаются снижением способности эритроцита к деформации при прохождении микрокапилляров. Такие эритроциты секвестрируются селезенкой, что приводит к анемии. Молекулярные дефекты, приводящие к НС, очень гетерогенны. Наиболее часто встречаются дефицит белка полосы 3 (54%) и дефициты спектрина (31%) [2].

В настоящее время диагностика НС основывается на положительном семейном анамнезе, клинической картине и результатах лабораторных исследований. Диагноз считается установленным, если у пациента наблюдаются Кумбс-негативная ГА, повышенная средняя концентрация гемоглобина в эритроците и сниженный индекс сферичности по данным эритроцитометрии, сниженная осмотическая резистентность эритроцитов (ОРЭ) до и после инкубации, а также снижение ЭМА-теста (связывание эозин-5-малеимида). Дифференциальная диагностика НС является сложной задачей из-за схожести клинических и лабораторных проявлений у пациентов с данным заболеванием и другими формами наследственных ГА (дефицит пируваткиназы эритроцитов, ГА вследствие нестабильного гемоглобина, дизэритропоэтические анемии, наследственный стоматоцитоз), а также из-за малой доступности молекулярно-генетических исследований [3, 4].

Несмотря на то, что ОРЭ и ЭМА-тест являются основными методами в диагностике НС, они имеют ограничения. ОРЭ не является высокоспецифичным для НС, так как в 10–20% случаев НС могут быть получены ложноотрицательные значения [5]. В работе Y.J. Shim и соавт. [6] чувствительность и специфичность ОРЭ в диагностике НС составили 66% и 81,8% соответственно. Однако было показано, что недавно внедренная ОРЭ с использованием проточной цитометрии (FCMOF) может повысить чувствительность и специфичность до 91,3% и 95,8% соответственно [6]. Исследование ОРЭ также не позволяет дифференцировать НС от других состояний, сопровождающихся появлением сфероцитов в периферической крови, в частности от аутоиммунного гемолиза [7].

В отличие от ОРЭ ЭМА-тест демонстрирует лучшие чувствительность и специфичность. Суть метода состоит в связывании флуоресцентного красителя эозин-5-малеимида (ЭМА) с белком полосы 3. N-концевой участок белка полосы 3 взаимодействует с анкирином и белком полосы 4.2, который, в свою очередь, соединяется со спектринным цитоскелетом, обеспечивая дополнительную стабильность мембране эритроцита. Отсутствие или снижение экспрессии любого из белков мембраны эритроцита приводит к нарушению стабильности цитоскелета клетки и снижению количества белка полосы 3 на поверхности мембраны эритроцита. В результате снижается связывание ЭМА с белком полосы 3 и, соответственно, происходит снижение измеряемой флуоресценции. Представленные M. King и соавт. данные [3, 8] свидетельствуют о высокой чувствительности (92,7%) и специфичности (99,1%) метода, что позволяет авторам рекомендовать его в качестве основного для диагностики НС. Существенными ограничениями этого метода являются необходимость использования проточного цитометра, который имеется не во всех диагностических лабораториях, отсутствие стандартных референсных значений из-за широкого диапазона шкал флуоресценции на разных моделях проточных цитометров, дороговизна используемого красителя ЭМА.

Таким образом, разработка легковыполнимых лабораторных исследований для дифференциальной диагностики наследственных ГА остается актуальной.

В настоящей работе впервые предложено использовать для диагностики НС метод измерения фильтруемости эритроцитов.

Цель настоящего исследования – сравнение метода фильтруемости эритроцитов с другими методами диагностики НС и оценка его специфичности и чувствительности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Пациенты

В работе была использована периферическая кровь пациентов, обратившихся в ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России в период с 2017 г. по май 2024 г. с установленным согласно действующим клиническим рекомендациям диагнозом НС ($n = 30$, 18 девочек, 12 мальчиков, средний возраст 8,6 (0,5–17) года, у 10 человек диагноз подтвержден молекулярно-генетически), и пациентов с другими ГА ($n = 15$, дефицит пируваткиназы ($n = 14$) и стоматоцитоз ($n = 1$), 9 девочек и 6 мальчиков, средний возраст 10 (1–30) лет, диагноз генетически верифицирован у всех кроме одного пациента с дефицитом пируваткиназы). Настоящее исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. Родители всех пациентов, включенных в исследование, подписали добровольное информированное согласие на забор крови из периферической вены и проведение диагностических исследований.

Измеряемые параметры

Всем пациентам были проведены измерение фильтруемости эритроцитов и стандартные исследования для диагностики наследственных ГА: общий клинический анализ крови с подсчетом эритроцитарных индексов, числа ретикулоцитов и нормобластов, ОРЭ, ЭМА-тест, эритроцитометрия с подсчетом индекса сферичности. Исследования выполнялись в клинко-диагностической лаборатории Центра им. Дмитрия Рогачева по общепринятой методике. Наличие дефицита пируваткиназы подтверждено снижением активности пируваткиназы эритроцитов и выявлением мутаций/делеций гена *PKLR*.

Измерение фильтруемости эритроцитов

Забор крови и пробоподготовка

Кровь у пациентов с НС забирали в вакуумную пробирку объемом 3 мл (S-monovette, Sarstedt, Германия) с 3,2% (0,106 М) цитратом натрия. У пациентов с дефицитом пируваткиназы и другими ГА кровь забирали в вакуумную пробирку объемом 2,6 мл (S-monovette, Sarstedt, Германия) с K_2 EDTA в качестве антикоагулянта. Для выделения эритроцитов

кровь была центрифугирована при 1000g в течение 8 мин. Верхний слой плазмы вместе с лейкотромбослоем был удален, и эритроциты далее отмывались центрифугированием при 1000g в течение 8 мин дважды 4-кратным объемом раствора Тироде (135 мМ NaCl, 4 мМ KCl, 0,33 мМ NaH_2PO_4 , 1 мМ $MgCl_2$, 11 мМ глюкозы, 2,5 мМ $CaCl_2$, 10 мМ HEPES и 1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, pH 7,4). Отмытые эритроциты были последовательно ресуспендированы в том же растворе до гематокрита 1% и использованы для измерения фильтруемости.

Определение фильтруемости эритроцитов

Определение фильтруемости эритроцитов проводили в соответствии с ранее описанной методикой [9] с помощью запатентованного нами ранее фильтрометра ИДА-1 [10, 11] (рисунк 1). С помощью ИДА-1 измеряли время прохождения через один и тот же фильтр сначала 250 мкл буфера (tb), а затем 250 мкл 1% суспензии исследуемых эритроцитов (ts). Фильтруемость (F) была определена как отношение этих времен ($F = tb/ts$). В качестве фильтров была использована полиэтилентерфталатная пленка (Институт ядерных исследований, Дубна, Московская область, Россия) толщиной 10 мкм с цилиндрическими порами диаметром 3,5 мкм.

Статистический анализ данных

Сравнение между группами пациентов с НС и другими ГА для всех тестов было сделано с помощью U-критерия Манна–Уитни. Рассчитанные величины p приведены на рисунке 2. Различия между группами

Рисунок 1
Общий вид фильтрометра ИДА-1

Figure 1
An IDA-1 filterometer



считали достоверными при $p < 0,05$. Всю статистическую обработку проводили в программе OriginPro 8.1 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время в России диагностика НС основывается на использовании нескольких лабораторных методов: ЭМА-тест, ОРЭ (с и без дополнительной инкубации суспензии эритроцитов в течение

24 ч при 37°C), эритроцитометрия с расчетом индекса сферичности [2, 5].

Результаты измерения фильтруемости эритроцитов, ЭМА-теста, ОРЭ (H_{50} после 24 ч инкубации при 37°C), а также значения индекса сферичности, полученные у пациентов с НС и при других ГА представлены на рисунке 2. Рассчитанные медианы и области (полутонный межквартильный интервал) значений каждого теста в обеих группах представлены в таблице 1. Очевидно, что все лабораторные методы достоверно различают 2 исследованные

Рисунок 2

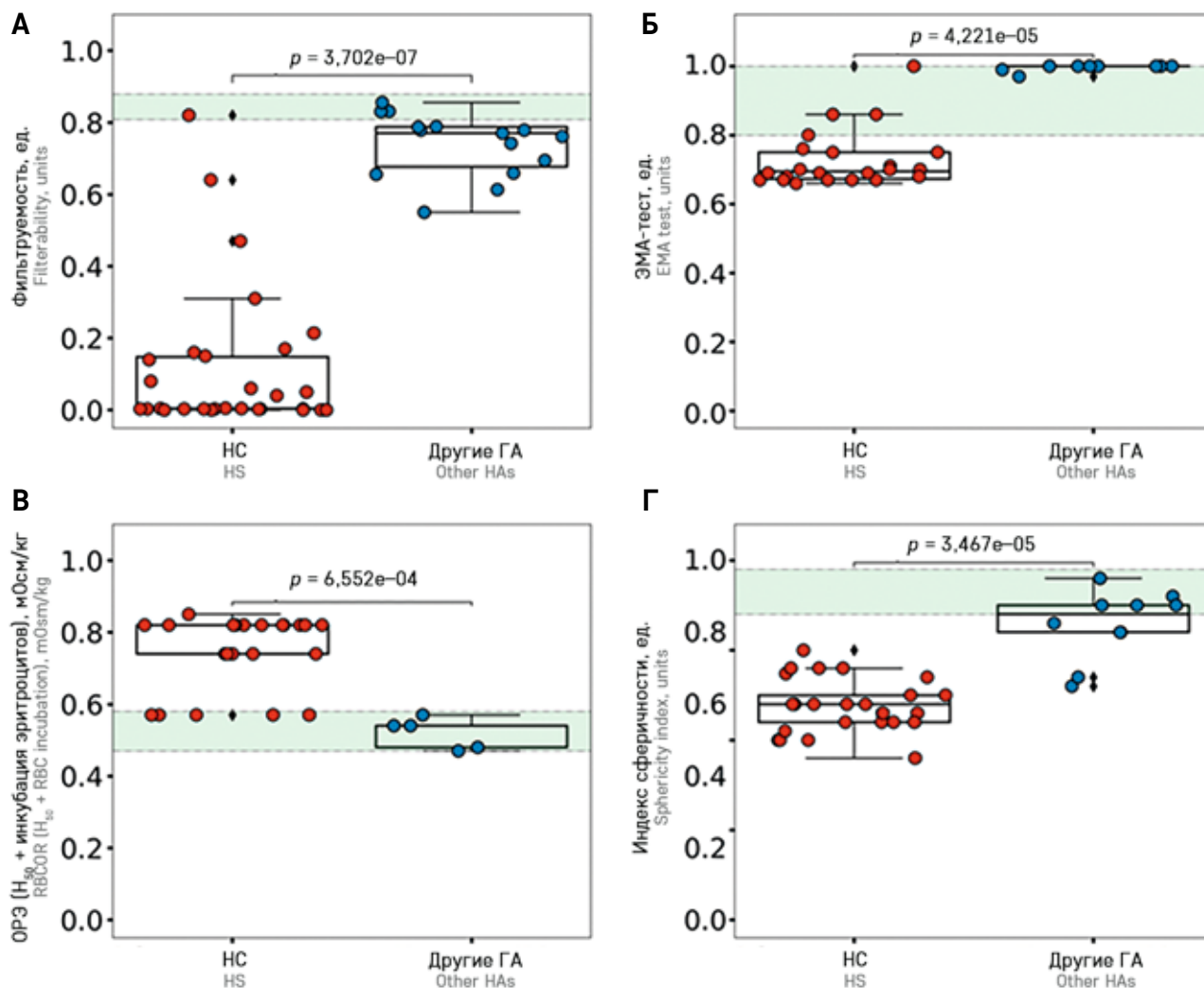
Распределение величин фильтруемости (А), ЭМА-теста (Б), ОРЭ (величина осмоляльности, при которой лизировано 50% клеток (H_{50}) после 24 ч инкубации эритроцитов при 37°C) (В) и индекса сферичности (Г) в группах пациентов с НС и другими ГА

Размер боксов соответствует области от 25-го до 75-го перцентиля всех измеренных величин. Медианы показаны горизонтальными линиями, длина «усов» соответствует полутонному размеру межквартильной области. Черные ромбики отмечают точки, выходящие за 1,5 межквартильных интервала, однако, имея дело с популяцией пациентов, мы не можем отбрасывать эти точки, так как они являются не ошибками измерения, а характеризуют индивидуальные различия пациентов. Достоверность различий между группами для всех тестов определена U-критерием Манна-Уитни. Закрашенные области соответствуют области нормальных значений для каждого теста. Различия считали достоверными при $p < 0,05$

Figure 2

The distribution of the results of filterability measurement (A), EMA test (Б), red blood cell osmotic resistance analysis (RBCOR) (osmolality at which 50% of cells lyse (H_{50}) after 24 hours of incubation at 37°C) (В) and sphericity index calculation (Г) in the groups of the patients with hereditary spherocytosis (HS) and other hemolytic anemias (HA)

The boxes extend from the 25th to the 75th percentile of all the measured values, with the horizontal lines indicating the medians, and the length of each whisker equal to 1.5 times the interquartile range (IQR). The black diamonds indicate data points outside the 1.5 IQR. However, since we study a population of patients we cannot disregard these data points because they are not miscalculations but rather a representation of individual differences among the patients. In all the tests, the significance of differences between the patient groups was determined using the Mann-Whitney U test. The filled-in areas indicate normal ranges for all the tests. The differences were considered significant at $p < 0.05$



группы, однако достоверность различий между группами самая высокая при исследовании фильтруемости эритроцитов (величина $p = 3,702 \times 10^{-7}$). Эта величина выше, чем для ЭМА-теста ($p = 4,221 \times 10^{-5}$).

Обращает на себя внимание тот факт, что большая часть пациентов с НС имели очень низкую фильтруемость (в области 0–0,31 ед.), но существуют также несколько пациентов, у которых фильтруемость была выше (0,47; 0,64 и 0,82 ед.). Этим пациентам диагноз НС был поставлен в соответствии с клиническими рекомендациями.

Таблица 1
Средние значения всех тестов в обеих группах пациентов*

Tables 1
The median values of the test results in the two groups of the patients*

Параметр Parameter	НС HS	Другие ГА Other HAs	Нормальные значения Normal range
ЭМА-тест, ед. EMA test, units	0,695 (0,556; 0,866)	1 (1; 1)	0,8–1,0
Фильтруемость, ед. Filterability, units	0,004 (–0,214; 0,364)	0,770 (0,510; 0,954)	0,810–0,880
ОРЭ (Н ₅₀ после инкубации эритроцитов), мОсм/кг RBCOR (H ₅₀ after RBC incubation), mOsm/kg	0,82 (0,62; 0,94)	0,54 (0,39; 0,63)	0,47–0,58
Индекс сферичности, ед. Sphericity index, units	2,4 (1,75; 2,95)	3,4 (2,75; 3,95)	3,4–3,9

Примечание. * – представлены медианы и области, соответствующие полупорному межквартильному интервалу.
Notes. * – the medians and values within the 1.5 IQR.

Таблица 2
Фильтруемость эритроцитов у пациентов с различными мембранопатиями*

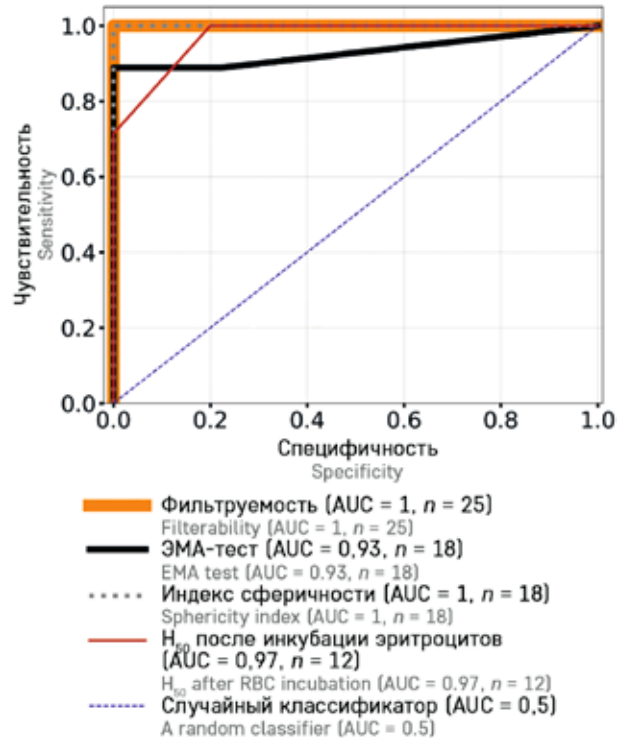
Tables 2
Red blood cell filterability in the patients with various membranopathies*

Пациент Patient	Величина фильтруемости, ед. Filterability, units	Диагноз (согласно клиническим рекомендациям) Diagnosis (established in accordance with the clinical recommendations)	Дополнительные данные Additional data
Все пациенты с НС кроме 1–3 (n = 27) All the patients with HS except pts. 1–3 (n = 27)	0–0,31	НС HS	У 10 пациентов диагноз подтвержден генетически, у остальных – клинико-лабораторно в соответствии с клиническими рекомендациями In 10 patients, the diagnosis was confirmed genetically, the others were diagnosed based on clinical and laboratory signs in accordance with the clinical recommendations
1	0,47	НС HS	Мутация гена <i>SPTA1</i> с.4339-99C>T в гетерозиготном состоянии, которая, по данным базы NCBI [12], была прежде охарактеризована и как сфероцитоз, и как эллиптоцитоз Heterozygous c.4339-99C>T mutation in the <i>SPTA1</i> gene which was previously characterized both as spherocytosis and elliptocytosis (according to the NCBI database [12])
2	0,64	НС HS	Нет данных о генетике и о возможных трансфузиях No data on genetics or possible transfusions
3	0,82	НС HS	Нет данных о генетике и о возможных трансфузиях No data on genetics or possible transfusions
4	0,86	Стоматоцитоз Stomatocytosis	Мутация гена <i>PIEZO1</i> , характерная для стоматоцитоза или ксероцитоза A mutation in the <i>PIEZO1</i> gene common in stomatocytosis or xerocytosis

Примечание. * – включены пациенты (с данными генетики и без) с величиной фильтруемости 0–0,31 ед., пациенты с диагностированным согласно клиническим рекомендациям НС, у которых величина фильтруемости превышает 0,31 ед., а также данные пациента со стоматоцитозом.
Notes. * – here we included the patients (with/without genetic data) with RBC filterability of 0–0.31 units, the patients diagnosed with HS according to the clinical recommendations whose RBC filterability was over 0.31 units as well as the patients with confirmed stomatocytosis.

Рисунок 3
ROC-кривые, построенные по данным каждого из тестов для пациентов с генетически подтвержденным диагнозом НС и с другими ГА, в первую очередь с дефицитом пируваткиназы, для определения чувствительности и специфичности каждого метода при постановке диагноза НС
Незначительное снижение чувствительности метода измерения фильтруемости эритроцитов, полученное при исследовании группы, куда вошли все пациенты с НС (даже без наличия его генетического подтверждения), может быть связано с тем, что в части случаев при молекулярно-генетическом исследовании диагноз может измениться, как, например, у пациента с гетерозиготной мутацией гена *SPTA1* с.4339-99C>T, которая в части случаев была характеризована как эллиптоцитоз. Чувствительность становилась максимальной, если в группу были включены только генетически подтвержденные НС. При этом специфичность метода оставалась максимальной в любом варианте

Figure 3
ROC curves generated using the test results of the patients with genetically confirmed HS or other HAs (mostly, with pyruvate kinase deficiency) in order to determine sensitivity and specificity of each method for HS diagnosis
The slightly decreased sensitivity of the RBC filterability measurement method tested in the group of all the HS patients (even if the diagnosis had not been genetically confirmed) may be explained by the fact that in some patients, molecular genetic testing may lead to a change of diagnosis, as it happened in the patient with heterozygous с.4339-99C>T mutation in the *SPTA1* gene that was in some cases characterized as elliptocytosis. The sensitivity reached its maximum when the analysis included the patients with genetically confirmed HS only. The specificity remained high in both cases



тически. Полученные в результате расчетов величины чувствительности и специфичности каждого из исследованных методов по отношению к диагностике НС приведены в *таблице 3*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование фильтруемости эритроцитов показало высокую чувствительность, а также максимальную специфичность при дифференциальной

Таблица 3
Чувствительность и специфичность различных методов, используемых для диагностики НС

Метод Method	Чувствительность Sensitivity	Специфичность Specificity	AUC	n
Данные для всех пациентов The entire cohort				
Фильтруемость эритроцитов RBC filterability	0,93	1,00	0,97	45
ЭМА-тест EMA test	0,89	0,95	0,97	31
ОРЭ (H ₅₀ после 24 ч инкубации эритроцитов при 37°C) RBCOR (H ₅₀ after RBC incubation at 37°C over 24 hours)	1,00	0,80	0,98	28
Индекс сферичности эритроцитов RBC sphericity index	0,80	1,00	0,95	35
Данные только для пациентов с генетически подтвержденным НС Only the patients with genetically confirmed HS				
Фильтруемость эритроцитов RBC filterability	1,00	1,00	1,00	25
ЭМА-тест EMA test	0,89	0,78	0,93	18
ОРЭ (H ₅₀ после 24 ч инкубации эритроцитов при 37°C) RBCOR (H ₅₀ after RBC incubation at 37°C over 24 hours)	1,00	0,80	0,97	12
Индекс сферичности эритроцитов RBC sphericity index	1,00	1,00	1,00	18

диагностике НС и других ГА, в первую очередь дефицита пируваткиназы. Отмечаются особенно высокие значения величин чувствительности и специфичности (100%), если в группу с НС входят только пациенты с генетически подтвержденным диагнозом. Простой и доступный метод измерения фильтруемости эритроцитов может быть легко применен в любой лаборатории и стать надежной альтернативой дорогому и ограниченно доступному ЭМА-тесту.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ
Работа частично поддержана грантом Российского научного фонда №23-24-00178 (для В.М. Витвицкого и С.С. Шахиджанова).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ
Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID
Prudinnik D.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5995-7702>
Koleva L.D. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8803-5694>
Bovt E.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4724-8647>
Kushnir N.S. ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-8800-6465>
Suvorova A.S. ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-9565-5591>
Dolgikh I.A. ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-6738-9558>
Shakhidjanov S.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5677-8052>
Vitvitsky V.M. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6251-6115>
Ataullakhanov F.I. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3403-181X>
Sinauridze E.I. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5948-3444>
Plyasunova S.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4503-0735>
Smetanina N.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2756-7325>

Литература / References

1. Ciepiela O. Old and new insights into the diagnosis of hereditary spherocytosis. *Ann Transl Med* 2018; 6 (17): 339. DOI: 10.21037/atm.2018.07.35
2. Bianchi P. Current Diagnostic Approach and Screening Methods for Hereditary Spherocytosis. *Thalass Rep* 2013; 3 (s1): e32. DOI: 10.4081/thal.2013.s1.e32
3. King M.J., Zanella A. Hereditary red cell membrane disorders and laboratory diagnostic testing. *Int J Lab Hem* 2013; 35: 237–43. DOI: 10.1111/ijlh.12070
4. Bolton-Maggs P.H., Langer J.C., Iolascon A., Tittensor P., King M.J. Guidelines for the diagnosis and management of hereditary spherocytosis – 2011 update. *Br J Haematol* 2012; 156 (1): 37–49. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2011.08921.x
5. Кузьминова 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): 168–72. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-3-168-172 [Kuzminova Zh.A., Plyasunova S.A., Zhogov V.V., Smetanina N.S. The cytometric technique of binding of eosin-5-maleimide in diagnostic of hereditary spherocytosis. *Clinical Laboratory Diagnostics* 2016; 61 (3): 168–72. (In Russ.)].
6. Shim Y.J., Won D.I. Flow cytometric osmotic fragility testing does reflect the clinical severity of hereditary spherocytosis. *Cytometry B Clin Cytom* 2014; 86 (6): 436–43. DOI: 10.1002/cyto.b.21143
7. Справочник MSD, профессиональная версия. Сфероциты. [Электронный ресурс] URL: <https://www.msd-manuals.com/ru-ru/professional/multimedia/image/сфероциты> (дата обращения 03.06.2024). [MSD manual professional edition. Spherocytes. [Electronic source] URL: <https://www.msdmanuals.com/ru-ru/professional/multimedia/image/сфероциты> (Date of access: 03.06.2024). (In Russ.)].
8. King M.J., Behrens J., Rogers C., Flynn C., Greenwood D., Chambers K. Rapid flow cytometric test for the diagnosis of membrane cytoskeleton-associated haemolytic anaemia. *Br J Haematol* 2000; 111 (3): 924–33. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2000.02416.x
9. Prudinnik D.S., Sinauridze E.I., Shakhidzhanov S.S., Bovt E.A., Protsenko D.N., Rumyantsev A.G., Ataullakhanov F.I. Filterability of Erythrocytes in Patients with COVID-19. *Biomolecules* 2022; 12 (6): 782. Special Issue: Biochemical and Biophysical Properties of Red Blood Cells in Disease. DOI: 10.3390/biom12060782.
10. Атауллаханов Ф.И., Витвицкий В.М., Костына М.А., Лисовская И.Л. Способ определения деформируемости эритроцитов и устройство для его осуществления. Патент РФ №2052194C1 от 27.11.1991, дата публикации 10.01.1996. [Ataullakhanov F.I., Vitvitsky V.M., Kostyna M.A., Lisovskaya I.L. A method and a device for measuring red blood cell deformability. RF patent №2052194C1 of 27.11.1991, date of publication: 10.01.1996. (In Russ.)].
11. Lisovskaya I.L., Shurkhina E.S., Nesterenko V.M., Rozenberg J.M., Ataullakhanov F.I. Determination of the content of nonfilterable cells in erythrocyte suspensions as a function of the medium osmolality. *Biorheology* 1998; 35: 141–53.
12. NIH, National Library of Medicine (National Center for Biotechnology Information) [Electronic resource] URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/> (accessed 03.06.2024).