

Практические аспекты базофильного теста. Преаналитический этап

Наталья Михайловна Афанасьева

ведущий специалист по проточной цитометрии лаборатории
аллергологии, ГК «Алкор Био», Санкт-Петербург

Трудно переоценить важность преаналитического этапа в едином процессе выполнения лабораторных исследований. Минимизация ошибок на данном этапе определяет успех проведения анализа в целом [3, 14].

По статистике, наибольший процент ошибок (около 50%) в лабораторных исследованиях приходится на преаналитический этап [14]. Причем наиболее важным является этап подготовки, связанный с долабораторными манипуляциями:

1. Назначение лабораторного исследования врачом и информирование пациента об особенностях подготовки к исследованию.

2. Регистрация пациента, взятие биоматериала в соответствии с требованиями лабораторного исследования.

3. Доставка биоматериала в лабораторию, регистрация поступившего образца, а также хранение образца до проведения анализа.

Исследования с помощью проточной цитометрии составляют значи-

тельную долю лабораторных анализов в клинической иммунологии и гематологии. Протоколы анализа в проточной цитометрии в большинстве случаев основаны на относительно количественной или качественной оценке клеточного состава исследуемого биоматериала. В связи с этим одним из основных факторов, обеспечивающих достоверность результата исследования, является жизнеспособность клеток образца, что неразрывно связано с качеством его взятия и дальнейшего хранения. Значительное влияние на клеточный состав крови оказывают как неустраняемые (возраст, климат, циркадные ритмы), так и переменные (прием пищи, лекарственных препаратов, курение и прием большого количества алкоголя, физические на-

грузки, проводимые диагностические процедуры и лечебные мероприятия) внелабораторные факторы [3].

Функциональные клеточные тесты в проточной цитометрии представляют собой особую группу исследований, основной задачей которых является не столько оценка иммунофенотипа клетки, сколько ее функциональная активность [15]. Среди широкого спектра клинически значимых функциональных тестов выделяют исследования, связанные с оценкой эффекторных функций фагоцитов – макрофагов или полиморфноядерных (нейтрофилы, эозинофилы, базофилы и тучные клетки) лейкоцитов. В силу своих физиологических функций данная группа клеток очень чувствительна к внешним условиям. Из числа факторов, влияющих на количество и функциональную активность фагоцитов, а значит, и на результат исследования, особенное значение имеют прием лекарственных препаратов (например, глюкокортикоиды) и срок хранения образца крови после венепункции [15]. Одним из таких тестов является базофильный тест (Basophil activation test, BAT), для которого ниже будут рассмотрены основные факторы преаналитического этапа, обеспечивающие успешность проведения исследования.

Назначение и ограничения базофильного теста

Эффективность проводимого обследования обеспечивается с момента назначения диагностического теста врачом с учетом глубокого понимания

клинической значимости исследования и возможности интерпретации полученных результатов.

Базофильный тест предназначен для выявления IgE-опосредованной сенсibilизации (или гиперчувствительности I типа) к различным аллергенам [17]. Принцип метода заключается в цитометрической оценке активации базофилов по изменению уровня экспрессии маркера активации в ответ на стимуляцию аллергенами. Наиболее изученными являются маркеры активации CD63 и CD203c. Результатом проведения анализа может быть либо процент активированных базофилов (применимо для маркера активации CD63), либо индекс активации (SI, применимо для маркера активации CD203c) [16]. Проведение BAT возможно с использованием современных тест-систем, наиболее часто используемые из которых описаны в таблице 1 → 19.

Проведение BAT наиболее оправданно для диагностики сложных случаев гиперчувствительности, когда традиционная схема диагностических мероприятий не позволяет однозначно определить причинно-значимый аллерген [17].

Противопоказанием для проведения любых цитометрических исследований, и в частности BAT, является прием любых препаратов, способных вызвать изменения в клеточном составе крови [5]. Так, при назначении BAT важно избежать приема пациентом препаратов, вызывающих базопению, или нарушение функциональной

Таблица 1

Тест-системы для проведения базофильного теста

Параметр сравнения	Набор AllergenCity kit (Beckman Coulter, США)	FlowCAST (Buhlmann, Швейцария)	АллергоФлоу (Алкор Био, Россия)
Принцип гейтирования базофилов	SS ^{low} CD294 ^{pos} CD3 ^{neg} CD203c ^{pos}	CCR3-PE / CD63-FITC	SS ^{low} CD294 ^{pos} CD3 ^{neg} CD203c ^{pos}
Маркер активации	CD203c	CD63 или CD63+CD203c	CD203c
Результат выражен в (по инструкции)	%CD203c ^{pos} или $SI = \frac{MFI^2(\text{аллерген})}{MFI(\text{ОК})}$	% CD63	$SI = \frac{MFI(\text{аллерген})}{MFI(\text{ОК})}$
Наличие аллергенов к набору (форма выпуска)	нет	Есть (4 теста)	Есть (50 тестов)
Время подготовки проб к анализу	~ 30 минут	~ 1 час	~ 30 минут
Тип образца	ЭДТА, гепарин ²	ЭДТА, гепарин ³	Гепарин
Срок хранения образца, рекомендуемый производителем (по инструкции)	24 часа	Не более 24 часов – для лекарственных аллергенов; до 48 часов – аллергенов белковой природы	
Условия хранения образца (по инструкции)	+18...+25 °C	+18...+25°C	+18...+25 °C

Примечание:

- ¹ SI – stimulation index, индекс стимуляции.
- ² MFI – mean fluorescence intensity, среднее арифметическое значение интенсивности флуоресценции в пробе с аллергеном, MFI (аллерген), или в отрицательном контроле MFI (ОК).
- ³ При условии модификации протокола пробоподготовки.
- ⁴ При условии модификации протокола пробоподготовки.

активности базофилов, – например, иммуносупрессивные средства (глюкокортикостероиды системного назначения, азатиоприн, циклофосфамид, циклоспорин), иммуностимулирующие средства (например, рекомбинантный IL-2), цитостатики (ингибиторы тирозинкиназ) системного назначения (ибрутиниб) [5, 7, 10, 12]. Химиотерапия или срок до 3 недель после ее проведения являются противопоказанием к применению ВАТ. В то же время, согласно литературным данным, прием антигистаминных [7] или анти-IgE иммунобиологических препаратов (омализумаб) [10, 17] не является противопоказанием к проведению ВАТ.

Биоматериал. Требования к типу образца

При планировании исследования с помощью проточной цитометрии важным этапом является выбор типа образца в соответствии с целью исследования. Наиболее часто используемые варианты биологического материала: периферическая кровь, костный мозг, другие типы биологических сред организма человека (спинальная жидкость, мокрота и др.), изолированные мононуклеары периферической крови или костного мозга, опухолевые ткани, клеточные линии и другие [5]. Основные иммунологические исследования, такие как иммунофенотипирование, определение уровня антигенной экспрессии, а также функциональные тесты, проводят преимущественно с использованием периферической крови. Образец крови должен быть взят в со-

ответствии со стандартной техникой венепункции в пробирку с антикоагулянтом [2].

Выбор антикоагулянта определяется задачей иммунологического исследования, а также требованиями к стабильности образца. Для проведения функциональных тестов следует также учитывать совместимость антикоагулянта с функциональной активностью лейкоцитов [3, 4, 5, 8]. Для проведения иммунофенотипирования используют преимущественно два типа антикоагулянтов: калиевая соль ЭДТА (К3ЭДТА или К2ЭДТА) и литиевая соль гепарина (LiH), сравнение основных характеристик которых приведено в таблице ниже → 21 (фрагмент таблицы адаптирован из рекомендаций CLSI H62 [5]).

При оценке функциональной активности базофилов наиболее оптимальным выбором будет литиевая соль гепарина [6] на основании определенных его преимуществ по сравнению с К3ЭДТА:

- ~ не связывает ионы Ca^{2+} , необходимые для активации клетки;
- ~ оказывает менее жесткое влияние на лейкоциты и в меньшей степени повреждает клетки в случае, если нарушено соотношение объема крови и антикоагулянта.

Стабильность образца

В проточной цитометрии стабильность образца является критичным параметром, поскольку при длительном хранении и транспортировке могут меняться такие показатели, как плотность экспрессии целевых маркеров на лейкоцитах, соотношение лей-

Сравнение антикоагулянтов

Антикоагулянт	Характеристика	Преимущества	Недостатки
ЭДТА	<ul style="list-style-type: none"> – Наиболее предпочтительный антикоагулянт для гематологии; – использование калиевой соли наиболее предпочтительно 	<ul style="list-style-type: none"> – Охлаждение образца может увеличить стабильность; – максимально стабилизирует образец до 30 часов [6] 	<ul style="list-style-type: none"> – Длительное хранение образца (более 48 часов) приводит к изменениям морфологических характеристик и антигенной экспрессии; – длительное хранение образца приводит к уменьшению и/или дегрануляции миелоидных клеток и гранулоцитов; – связывание двухвалентных ионов
Гепарин	<p>Подходит для:</p> <ul style="list-style-type: none"> – иммунофенотипирования; – функциональных тестов 	<ul style="list-style-type: none"> – Может использоваться в лиофилизованном виде, что предотвращает разбавление образца; – в меньшей степени токсичен для клеток в случае не полностью заполненной пробирки 	<ul style="list-style-type: none"> – Может снижать показатель гранулярности (SSC) у гранулоцитов при длительном хранении (более 48 часов) при комнатной температуре [6, 8]

коцитарных субпопуляций и их жизнеспособность, что в итоге оказывает влияние на результат диагностики [8].

Согласно общим рекомендациям большинство протоколов в проточной цитометрии успешно реализуются при хранении биологического материала при комнатной температуре (+18...+25 °С) [5, 6]. Соблюдение этого температурного режима требуется в том числе и при транспортировке образцов или длительном их хранении в лаборатории. Рекомендуется избегать значительных перепадов температуры хранения образца: повышение температуры хранения выше 37 °С влечет за собой разрушение лейкоцитов и эритроцитов, а эффект низких температур (+2...+8 °С) не всегда предсказуем и требует

оценки в случае каждого конкретного протокола [6]. В случае оценки функциональных характеристик лейкоцитов хранение при низких температурах может приводить к снижению способности лейкоцитов к активации, поэтому влияние данного параметра оценивается применительно к каждой конкретной методике [6, 8].

Для выполнения любых протоколов в проточной цитометрии необходимо минимизировать время хранения исследуемых образцов до проведения пробоподготовки [8, 4, 5]. Иммунофенотипирование лейкоцитов рекомендуется проводить в образцах крови, стабилизированных К3ЭДТА, в течение не более чем 30 часов в связи с возможными изменениями в про-

порциональном соотношении для некоторых субпопуляций лимфоцитов. Для альтернативных антикоагулянтов допустимо выполнение анализа в течение 48 часов [13].

В рекомендациях по проведению функциональных тестов, в частности ВАТ, вопросу влияния стабильности образца на результат уделяется значительное внимание. Так, в исследованиях Santos A.F. et al. показано, что для проведения ВАТ оптимально использование свежего образца крови, взятого в день постановки или не более чем через 24 часа [16]. Однако необходимо отметить, что положительный результат можно получить и при хранении образца до 48 часов, если речь идет

о тестировании аллергенов белковой природы, поскольку в этом случае активация базофилов практически всегда имеет значительную амплитуду. Лекарственные аллергены, в свою очередь, способны, как правило, активировать базофилы в значительно меньшей степени. В связи с этим при увеличении фоновой активации базофилов (то есть в ОК) в случае длительного хранения образца (более 24 часов) возрастает риск получения ложноотрицательного результата при диагностике лекарственной гиперчувствительности [18].

Поскольку базофилы относятся к гранулоцитам, температурные условия хранения образца крови могут оказывать значительное влияние

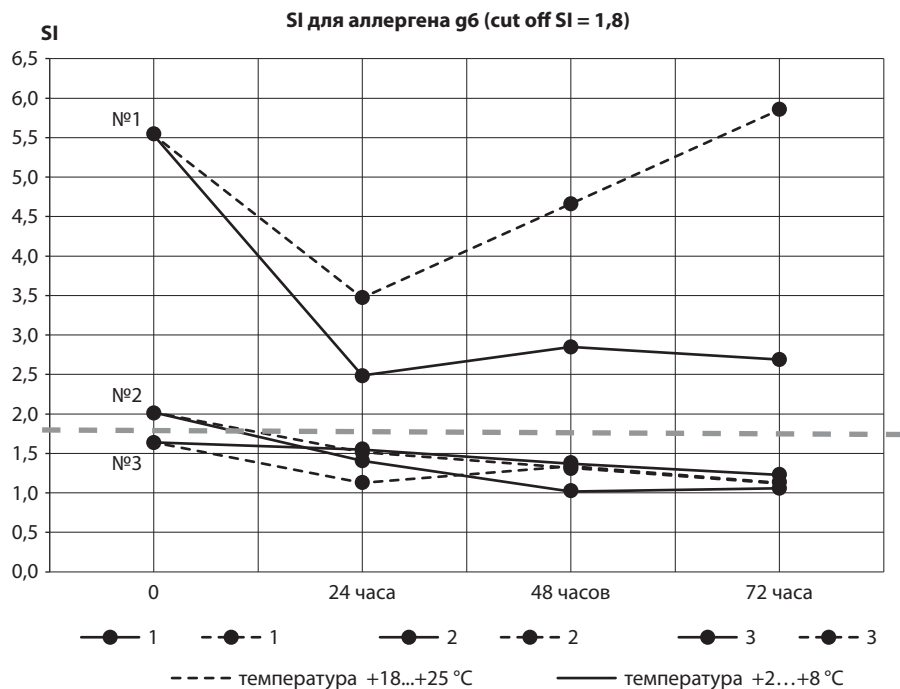


Рисунок. Влияние длительности и условий хранения образца крови на результат ВАТ

на стабильность базофилов [12]. Однако ряд экспериментальных данных показывает равнозначную стабильность результата при хранении крови с ЭДТА как при низких температурах, так и при комнатной температуре в течение 24 часов [9, 18]. И все же исследователи сходятся во мнении, что влияние низкого температурного режима хранения/транспортировки может носить индивидуальный характер [9]. Поэтому для повышения прецизионности теста следует соблюдать общие для проточной цитометрии рекомендации (+18...+25 °C). На рисунке приведена демонстрация рассмотренных выше преаналитических факторов.

Для того чтобы наилучшим образом проиллюстрировать суть влияния длительности и условий хранения, представлены результаты для трех доноров с разным уровнем активации базофилов в ответ на стимуляцию аллергеном тимофеевка (g6). Результаты получены в тест-системе «АллергоФлоу» при использовании «Аллергена для проточной цитометрии» тимофеевка (g6) (реагенты производства ООО «Компания Алкор Био», Россия).

Приведены результаты базофильного теста, полученные в течение первого часа после взятия образцов гепаринизированной крови, а также при хранении в течение 24, 48 и 72 часов в разных условиях: при +2...+8 °C (сплошная линия) и при +18...+25 °C (прерывистая линия). Результаты показывают, что для пациентов с ярко выраженной активацией базофилов (донор № 1, истинно положитель-

ный) и с отсутствием активации (донор № 3, истинно отрицательный) срок хранения образца не влияет на получаемый результат. Кроме того, необходимо отметить, что хранение при +2...+8 °C может снижать уровень активации базофилов (донор № 1). Однако для донора № 2 (латентная сенсibilизация) со слабоположительным уровнем активации индекс активации значительно снизился уже к концу первых суток. И если в данном случае переход диагноза не является критичным, то в случае диагностики лекарственной аллергии может иметь важное диагностическое значение.

Как показывает практика, стандартизация преаналитического этапа любого лабораторного исследования оказывается не менее важным процессом, чем верификация и валидация аналитических характеристик тест-системы. Поэтому в ходе разработки тест-системы «АллергоФлоу» (ООО «Компания Алкор Био», Россия) вопросу оценки влияния факторов долабораторного этапа анализа уделялось особое внимание. Таким образом, соблюдение приведенных рекомендаций позволит минимизировать возможные ошибки долабораторного этапа и получить объективный результат диагностики.

Список литературы

1. ГОСТ Р 53079.4-2008 «Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа».
2. ГОСТ Р 59778-2021 «Процедуры взятия проб венозной и капиллярной крови для лабораторных исследований».

3. Серебровская Л.В., Иванова Л.А., Хайдук С.В. Особенности преаналитического этапа для иммунофенотипирования клеток периферической крови. Медицинская иммунология, 2011, 13(6): 639–646.
4. H42-A2, Enumeration of Immunologically Defined Cell Populations by Flow Cytometry; Approved Guideline–Second Edition, 2007 Clinical and Laboratory Standards Institute guideline.
5. H62, Validation of Assays Performed by Flow Cytometry; Approved Guideline–First Edition, 2021 Clinical and Laboratory Standards Institute guideline.
6. 1997 Revised Guidelines for Performing CD4+ T-Cell Determinations in Persons Infected with Human Immunodeficiency Virus (HIV). CDC. Recommendations and reports, 1997; 46(RR-2): 1–29.
7. Böhm I., Speck U., Schild H. Pilot study on basophil activation induced by contrast medium. Fundamental & Clinical Pharmacology, 2011, 25: 267–276.
8. Davis B.H., Dasgupta A., Kussick S., Han J-Y., Estrellado A. Validation of Cell-based Fluorescence Assays: Practice Guidelines from the ICSH and ICCS – Part II – Preanalytical issues. Cytometry Part B 2013; 84B: 286–290.
9. Kim T., Yu J., Li H. et al. Validation of inducible basophil biomarkers: Time, temperature and transportation. Cytometry, 2021, 100: 632–644.
10. MacGlashan D.W., Jessica H.S., Wood R.A., Saini S.S. Suppression of the basophil response to allergen during treatment with omalizumab is dependent on 2 competing factors. Allergy Clin Immunol, 2012;130:1130–5.
11. McGowan E.C. and Saini S.S. Update on the performance and application of basophil activation tests. Current allergy and asthma reports, 2013, 101–109.
12. Molecular Allergy User's Guide 2.0. European Academy of Allergy and Clinical Immunology, 2022.
13. Nicholson J.K., Green T.A. Collaborating Laboratories. Selection of anticoagulants for lymphocyte immunophenotyping: effect of specimen age on results. J Immunol Methods, 1993;165:31–5.
14. Plebani M. Exploring the iceberg of errors in laboratory medicine. Clin Chim Acta, 2009, 404(1):16–23.
15. Rabinovich P.S. and Robinson J.P. Overview of Functional Cell Assays. Current Protocols in Cytometry. Studies of Cell Function. UNIT 9.1.1. 1997, 9.1.1–9.1.6.
16. Santos A.F., Shreffler W.G. Road map for the clinical application of the basophil activation test in food allergy. Clin Exp Allergy, 2017, 47(9):1115–1124.
17. Santos A.F., Hans-Jürgen T. Basophil activation test: Mechanisms and considerations for use in clinical trials and clinical practice. Allergy, 2021, 76:2420–2432.
18. buhlmannlabs.com/basophils-are-still-alive/.