

АНАЛИЗ КОНТРОЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ «РЕПЛИКАТЫ Т-КЛЕТОК» И «СУММА Т-КЛЕТОК» ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ ИММУННОГО СТАТУСА У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ БОЛЬНЫХ И ВЫЯВЛЕНИЕ ДУБЛЬ-НЕГАТИВНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ Т-ЛИМФОЦИТОВ (CD45⁺CD3⁺CD4⁻CD8⁻)

Шестакова Е.В.¹, Зурочка А.В.², Квятковская С.В.¹,
Бецков С.Г.¹, Дукардт В.В.¹, Хайдуков С.В.³

¹ Клиника ГОУ ВПО Челябинской государственной медицинской академии, г. Челябинск

² ГОУ ВПО Челябинская государственная медицинская академия, г. Челябинск

³ Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Резюме. Нами было проанализировано использование аналитических контрольных показателей «репликаты Т-клеток» и «сумма Т-клеток» на примере 174 больных ВИЧ-инфекцией вне зависимости от возраста и стадии заболевания. Учитывая это, пациенты были разделены нами на 2 группы. Больные, у которых сумма CD45⁺CD3⁺CD4⁺ и CD45⁺CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов совпадает с процентным и абсолютным содержанием CD45⁺CD3⁺ лимфоцитов, либо разница несовпадения абсолютных значений не превышает разницу «репликаты Т-клеток». Лица этой группы составили 36,78%. Пациенты, у которых сумма CD45⁺CD3⁺CD4⁺ лимфоцитов и CD45⁺CD3⁺CD8⁺ меньше процентного и абсолютного содержания CD45⁺CD3⁺, либо разница несовпадения абсолютных значений превышает разницу «репликаты Т-клеток» (41,38% больных). Подобное несовпадение контрольных сумм может быть связано с высоким содержанием в образце γδ-Т-клеток, имеющих дважды негативный фенотип CD45⁺CD3⁺CD4⁻CD8⁻.

Ключевые слова: проточная цитометрия, Т-клетки, ВИЧ.

Shestakova E.V., Zurochka A.V., Kviatkovskaya S.V., Betskov S.G., Dukardt V.V., Haidukov S.V.

ANALYSIS OF CONTROL MEASUREMENTS OF «T-CELL REPLICATES» AND «T-CELL SUMMARY» IN INVESTIGATION OF THE IMMUNE STATUS OF HIV-INFECTED PATIENTS AND DETECTION DOUBLE NEGATIVE SUBPOPULATION OF T-LYMPHOCYTES (CD45⁺CD3⁺CD4⁻CD8⁻)

Abstract. We analyzed efficiency of application for analytic control parameters, i.e., «T-cell replicates» and «T-cell summary» in a sample of 174 HIV-infected patients, independently of age or disease stage. The patients were divided in two groups. Group 1 consisted of patients with total CD45⁺CD3⁺CD4⁺ and CD45⁺CD3⁺CD8⁺ lymphocyte concentrations being similar to relative and absolute concentrations

Адрес для переписки:

Хайдуков Сергей Валерьевич

Институт биоорганической химии

им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.

Тел.: (495) 336-02-55.

E-mail: khsv@mail.ibch.ru

of CD45⁺CD3⁺ lymphocytes, or the difference between absolute measurements not exceeding «T-cell replicates» differences. Group 1 included 36.78% of the whole cohort. Group 2 consisted of patients with total CD45⁺CD3⁺CD4⁺ & CD45⁺CD3⁺CD8⁺ lymphocytes concentrations being lower than relative and absolute concentrations of CD45⁺CD3⁺ lymphocytes, and the differences in absolute values being higher than «T-cell replicates» differences (41.38% of total sample). Such difference between control sums may be connected with high concentrations of double-negative $\gamma\delta$ -T-cells (CD45⁺CD3⁺CD4⁻CD8⁻) in the specimens under study. (*Med. Immunol.*, 2008, vol. 10, N 4-5, pp 463-466)

Введение

В диагностике и прогнозировании заболеваний, обусловленных иммунодефицитом, в частности при ВИЧ-инфекции, чрезвычайно важное значение имеет определение относительных и абсолютных концентраций Т-лимфоцитов (CD3⁺), Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺) и цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3⁺CD8⁺). В данном случае происходит критическое нарушение функционирования защитных сил организма преимущественно за счет селективной гибели Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺). Прогрессивное ухудшение клинической и иммунологической картины в значительной степени коррелирует со снижением концентрации CD3⁺CD4⁺ лимфоцитов в периферической крови. Выявление точных абсолютных значений концентрации данной субпопуляции лимфоцитов является наиболее важным параметром для уточнения стадии заболевания и принятия решения о назначении пациенту антиретровирусной и патогенетической терапии.

Приказами Минздрава РФ от 26.05.2003 № 220 «Правила проведения внутрилабораторного контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов» и от 02.02.2000

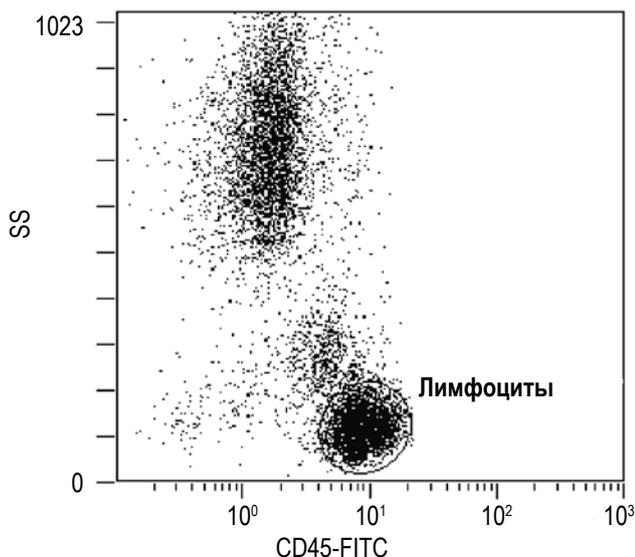


Рисунок 1. Двухпараметрическая гистограмма распределения клеток по флуоресценции и светорассеянию под углом 90° для выделения области лимфоцитов

№ 45 «О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения Российской Федерации» отмечается важная роль контроля качества проводимых исследований. В связи с изложенным выше, одним из основных условий корректной оценки иммунного статуса пациентов является постоянное проведение внутрилабораторного контроля качества. Для этих целей необходимо посредством аттестованных контрольных материалов с известными значениями контролировать состояния проточного цитометра и оценивать качество проведения пре- и аналитического этапов исследования (пробоподготовка, реакционная способность антител и т.д.) [1, 2].

Кроме изложенного выше и согласно общепринятым рекомендациям, в процессе непосредственного выполнения каждого исследования необходимо проведение аналитического контроля качества с учетом следующих контрольных показателей: «репликаты Т-клеток» и «сумма Т-клеток» [1, 2].

Целью данной работы была проверка эффективности использования данных показателей аналитического контроля при ежедневном выполнении внутрилабораторного контроля качества на базе лаборатории прочной цитометрии центра СПИД Клиники ЧГМА.

Материалы и методы

Исследование иммунного статуса у пациентов, инфицированных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), в рамках Национального проекта «Здоровье», проводилось методом проточной цитометрии с использованием прямой иммунофлуоресценции цельной периферической крови и «безотмывочной» технологии.

Клетки периферической крови окрашивали трехцветными комбинациями моноклональных антител к CD45/CD4/CD3 и CD45/CD8/CD3, конъюгированных с флуоресцентными красителями FITC/PE/PC5. Окрашенные образцы анализировали на проточном цитометре EPICS XL («Beckman Coulter», США) с помощью мультипараметрического анализа. Данный тест основан на способности моноклональных антител специфически взаимодействовать с дискретными антигенными детерминантами, экспрессированными на поверхности лейкоцитов. Данная процедура

позволяла вести одновременную идентификацию и подсчет общего количества Т-лимфоцитов ($CD45^+CD3^+$), общего количества Т-хелперов ($CD45^+CD3^+CD4^+$) и общего количества цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD45^+CD3^+CD8^+$). Эритроциты удаляли из исследуемых образцов за счет прямого лизиса с использованием лизирующих и фиксирующих реагентов ImmunoPrep Reagent System и автоматической рабочей станции Q-PREP («Beckman Coulter», США). Популяцию лимфоцитов выделяли при помощи гетерогенного гейтирования [область событий, имеющих яркую флуоресценцию $CD45-FITC$ и низкий уровень сигнала светорассеяния под углом 90° (SS)] (рис. 1). Подсчет абсолютного количества клеток проводился с использованием одноплатформенной технологии и референсных частиц Flow-Count Fluorespheres («Beckman Coulter», США).

Оценку качества работы цитометра проводили ежедневно, включая проверку сигналов светорассеяния и флуоресценции с использованием калибровочных частиц Flow Check Fluorespheres («Beckman Coulter», США) и стандартных настроечных протоколов. Качество аналитического этапа оценивали путем окрашивания контрольного материала Immuno-Trol Cells («Beckman Coulter», США) с заведомо известным диапазоном допустимых значений относительного и абсолютного количества позитивных клеток. Контрольные образцы анализировали в тех же условиях, что и опытные, с использованием тех же реагентов, концентраций и стандартных рабочих протоколов настройки цитометра. После приведенных выше процедур оценивали относительные и абсолютные количества Т-лимфоцитов ($CD45^+CD3^+$), Т-хелперов ($CD45^+CD3^+CD4^+$) и Т-цитотоксических ($CD45^+CD3^+CD8^+$) лимфоцитов.

В ходе выполнения каждого анализа проверяли контрольные показатели «репликаты Т-клеток» (рекомендованная разница в содержании субпопуляции $CD45^+CD3^+$ клеток в каждой пробирке не должна превышать 2%). Другим контрольным показателем была «сумма Т-клеток». Она представляет собой сумму как относительного, так и абсолютного содержания Т-хелперов ($CD45^+CD3^+CD4^+$) и цитотоксических

Т-лимфоцитов ($CD45^+CD3^+CD8^+$) и должна быть равна значению относительного и абсолютного содержания Т-лимфоцитов ($CD45^+CD3^+$), причем разброс не должен превышать $\pm 5\%$.

Результаты и обсуждение

Анализ работы проточного цитофлуориметра EPICS XL показал высокую стабильность работы прибора, причем коэффициенты вариаций (CV) на каналах флуоресценции FL1, FL2, FL3 и FL4 находились в допустимых пределах ($< 1,5\%$). В свою очередь коэффициент вариаций на канале малоуглового светорассеяния FS находился в диапазоне $< 1,3\%$. Стандартным отклонением для всех параметров было $< 0,11$.

Проведение внутрилабораторного контроля качества с использованием аттестованного контрольного материала Immuno Trol и встроенного программного обеспечения (QC) позволило определить средние значения положения максимума пика позитивных клеток, их коэффициенты вариаций и значения стандартного отклонения. Эти параметры были получены как для относительных, так и для абсолютных показателей Т-лимфоцитов ($CD45^+CD3^+$), Т-хелперов ($CD45^+CD3^+CD4^+$) и цитотоксических ($CD45^+CD3^+CD8^+$) Т-лимфоцитов.

Ниже приведены таблицы допустимых значений, полученные от производителей контрольных материалов (табл. 1) и значения, полученные в результате проведения контроля качества в лаборатории (табл. 2).

Полученные данные свидетельствуют об удовлетворительном прохождении лабораторией внутреннего контроля качества и высокой точности как на преаналитическом, так и аналитическом этапах работы.

На следующем этапе было проверено использование аналитических контрольных показателей «репликаты Т-клеток» и «сумма Т-клеток» на примере 174 больных ВИЧ-инфекцией вне зависимости от возраста и стадии заболевания.

При использовании аналитического контрольного показателя «репликаты Т-клеток» рекомендован только процентный разброс ($\pm 2\%$) и не указаны рекомендуемые разбросы в определении абсолютного числа Т-лимфоцитов. Однако

ТАБЛИЦА 1. АТТЕСТОВАННЫЕ ЗНАЧЕНИЯ КОНТРОЛЬНОГО МАТЕРИАЛА IMMUNO-TROL CELLS (ПО ДАННЫМ «БЕКМАН КУЛТЕР»)

	LY%	$\pm 2s$	Cells/ μ L	$\pm 2s$
CD3 ⁺	71	9	799	260
CD3 ⁺ /CD4 ⁺	45	9	518	165
CD3 ⁺ /CD8 ⁺	23	6	259	118

ТАБЛИЦА 2. ЗНАЧЕНИЯ КОНТРОЛЬНОГО МАТЕРИАЛА IMMUNO-TROL CELLS (ПО ДАННЫМ ЛАБОРАТОРИИ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ ЦЕНТРА СПИД)

	LY%	$\pm 2s$	Cells/ μ L	$\pm 2s$
CD3 ⁺	71,1	2,34	752,5	71
CD3 ⁺ /CD4 ⁺	45,5	2,6	480	50,2
CD3 ⁺ /CD8 ⁺	21,9	1,42	255	29

абсолютное число Т-лимфоцитов является более важным показателем при определении уровня Т-хелперов при использовании одноплатформенной технологии. Таким образом, для определения границ допустимых вариаций было применено четвертое правило Вестгардта (R4S), используемое для выявления случайных ошибок в пределах одной аналитической серии в случае, когда расстояние между результатами измерения контрольного материала в данной аналитической серии составляло более 4S.

В свою очередь, внутрилабораторный контроль качества проводимых процедур выявил, что значение стандартного отклонения для абсолютного числа Т-лимфоцитов составляло 35,5 клеток/мкл (табл. 1).

Исходя из приведенного выше, анализ контрольного показателя «репликатов Т-клеток» у пациентов с разницей относительного содержания CD45⁺CD3⁺ лимфоцитов в разных пробирках, превышающей 2%, был расценен как проявление случайной ошибки. То же относилось и к абсолютным значениям CD45⁺CD3⁺ лимфоцитов, превышающим 140 клеток/мкл. По-видимому, это было связано с погрешностями на этапах пробоподготовки (неточность дозирования, плохое перемешивание крови и т.д.). Данные образцы отправляли на повторное исследование. В результате, данную особенность выявили у 21,8% (38 человек) пациентов.

Данные цитометрического анализа остальных пациентов были использованы для оценки аналитического контрольного показателя «сумма Т-клеток». Сумма как относительного, так и абсолютного содержания CD45⁺CD3⁺CD4⁺ и CD45⁺CD3⁺CD8⁺ клеток в конечном итоге должна быть равна как относительному, так и абсолютному содержанию CD45⁺CD3⁺ клеток и не превышать ±5%.

В результате проделанной работы обследованные пациенты были разделены на 2 группы:

1) Сумма CD45⁺CD3⁺CD4⁺ и CD45⁺CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов у которых совпадает с относительным и абсолютным содержанием CD45⁺CD3⁺ лейкоцитов, либо несовпадение абсолютных значений не превышает разницу «репликатов Т-клеток». Пациенты этой группы составили 36,78% (64 человека)

2) Сумма CD45⁺CD3⁺CD4⁺ и CD45⁺CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов у которых меньше относительного и абсолютного содержания CD45⁺CD3⁺ лейкоцитов, и это несовпадение абсолютных значений превышает разницу «репликатов Т-клеток». Пациенты этой группы составили 41,38% (72 человека).

Согласно литературным данным, подобное несовпадение контрольных сумм может быть связано с высоким содержанием в образце γδ-Т-клеток, которые достаточно часто представлены дубль-негативным фенотипом CD45⁺CD3⁺CD4⁻CD8⁻ [2,3,6]. Данный эффект особенно проявляется как у ВИЧ-инфицированных [5], так и у пациентов с цитомегаловирусной инфекцией [4].

Заключение

Таким образом, для повышения аналитической точности работы и выявления случайных ошибок необходимо использовать оценку не только относительных, но и абсолютных значений «репликатов Т-клеток». Также необходимо учитывать данные допустимых отклонений, полученные в результате ежедневного анализа контрольного материала. Достаточно высокий процент пациентов, включенных во вторую группу с несовпадением контрольных сумм абсолютных и относительных значений, свидетельствует о необходимости дальнейшего более подробного исследования дубль-негативных субпопуляций Т-лимфоцитов, в частности γδ-Т-клеток.

Список литературы

1. ВИЧ-инфекция // Информационный бюллетень № 28. — М., 2006. — 24 с.
2. Canadian Guidelines for Flow Cytometric Immunophenotyping. 2001. Edition.
3. De Paoli P., Gennari D., Martelli P., Basaglia G., Crovatto M., Battistin S., Santini G. A subset of gamma delta lymphocytes is increased during HIV-1 infection // Clin. Exp. Immunol. — 1991. — Vol. 83. — P. 187-191.
4. Dechanet J., Merville P., Lim A., Retiere C., Pitard V., Lafarge X., Michelson S., Meric C., Hallet M.M., Kourilsky P., Bonneville M., Moreau J.F. Implication of γδ T cells in the human immune response to cytomegalovirus // J. Clin. Invest. — 1999. — Vol. 103. — P. 1437-1449.
5. Lambert C., Genin C. CD3 bright lymphocyte population reveal gamma delta T cells // Cytometry B. Clin. Cytom. — 2004. — Vol. 61, N 1. — P. 45-53.
6. Margolick J.B., Scott E.R., Odaka N., Saah A.J. Flow Cytometric analysis of gamma delta T cells and natural killer cells in HIV-1 infection // Clin. Immunol. Immunopathol. — 1991. — Vol. 58. — P. 126-138.

поступила в редакцию 30.06.2007
принята к печати 13.09.2007