

Определение осмотической резистентности эритроцитов методом проточной цитометрии у пациентов с наследственным сфероцитозом

Е.Ф. Мицура¹, Ж.Н. Пугачева¹, Л.И. Волкова²

¹ Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека
Республика Беларусь, 246040, г. Гомель, ул. Ильича, 290

² Белорусская медицинская академия последипломного образования
Республика Беларусь, 220013, г. Минск, ул. Петруся Бровки, 3, корп. 3

Резюме

Для диагностики наследственного сфероцитоза используется тест осмотической резистентности, оценивающий выраженность гемолиза в серии гипотонических растворов хлорида натрия, который требует больших временных и трудовых затрат и обладает невысокой чувствительностью и специфичностью. Предложены новые методики оценки осмотической резистентности при помощи проточной цитометрии, но они недостаточно стандартизованы. Цель исследования – разработка и апробация метода определения осмотической резистентности эритроцитов с помощью проточной цитометрии у пациентов с наследственным сфероцитозом. **Материал и методы.** Проводилось обследование 33 пациентов с наследственным сфероцитозом и 30 детей контрольной группы. Метод включал исследование препаратов крови в фосфатно-солевом буфере и их серийных разведений в дистиллированной воде при помощи проточной цитометрии – как в свежей крови, так и после 24-часовой инкубации. Оценивалась доля сохранных (не гемолизированных) эритроцитов. В качестве референтных интервалов использованы 5-й и 95-й процентиля показателей контрольной группы. **Результаты и их обсуждение.** Среди лиц с наследственным сфероцитозом до инкубации патологические изменения хотя бы в двух разведениях были выявлены у 81,8 % пациентов, после инкубации патологические изменения обнаружены еще у 4 из 6 пациентов. Диагностическая чувствительность теста 93,9 %, диагностическая специфичность 83,3 %, прогностическая ценность положительного результата (PPV) 86,1 %, прогностическая ценность отрицательного результата (NPV) 92,6 %. Таким образом, предложенный метод с установлением референтных значений позволяет быстро и объективно оценить осмотическую резистентность эритроцитов и может применяться для дифференциальной диагностики при наследственном сфероцитозе.

Ключевые слова: наследственный сфероцитоз, осмотическая резистентность, проточная цитометрия.

Конфликт интересов. Авторы статьи заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Автор для переписки: Мицура Е.Ф., e-mail: ronco-gomel@mail.ru

Для цитирования: Мицура Е.Ф., Пугачева Ж.Н., Волкова Л.И. Определение осмотической резистентности эритроцитов методом проточной цитометрии у пациентов с наследственным сфероцитозом. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2020; 40 (3): 81–87. doi: 10.15372/SSMJ20200312

Determination of osmotic resistance of erythrocytes using flow cytometry in patients with hereditary spherocytosis

E.F. Mitsura¹, Zh.N. Pugacheva¹, L.I. Volkova²

¹ Republican Scientific and Practical Center for Radiation Medicine and Human Ecology
Belarus, 246040, Gomel, Il'icha str., 290

² Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education,
Belarus, 220013, Minsk, Petrusya Brovki str., 3, bldg. 3

Abstract

To diagnose hereditary spherocytosis (HS), an osmotic resistance test is used to assess the severity of hemolysis in a series of hypotonic sodium chloride solutions, which demands intensive and time consuming workload and has low sensitivity and specificity. New methods for evaluating osmotic resistance based on flow cytometry were proposed, but they are not sufficiently standardized. **Objective:** development and testing of the method for determining the osmotic resistance of red blood cells (RBCs) using flow cytometry in patients with HS. **Material and methods.** In 2017-2019, 33 patients with HS and 30 children in the control group were examined. The method included the study of blood preparations in phosphate-buffered saline (PBS) and their serial dilutions in distilled water using flow cytometry, both in fresh blood and after 24-hour incubation. The proportion of preserved (not hemolyzed) RBCs was evaluated. As reference intervals, 5 and 95 percentiles of the control group indicators were used. **Results and discussion.** Among people with HS, before incubation, pathological changes in at least two dilutions were detected in 81.8 % of patients; after incubation, pathological changes were detected additionally in 4 out of 6 patients. Diagnostic sensitivity of the test is 93.9 %, specificity 83.3 %, positive and negative predictive values 86.1 and 92.6 %, respectively. It was found that the method with proposed reference intervals allows evaluating the osmotic resistance of erythrocytes fast and objectively, and can be used for differential diagnosis in hereditary spherocytosis.

Key words: hereditary spherocytosis, osmotic resistance, flow cytometry.

Conflict of interests. Authors declare lack of the possible conflicts of interests

Correspondence author: Mitsura E.F., e-mail: ronco-gomel@mail.ru

Citation: Mitsura E.F., Pugacheva Zh.N., Volkova L.I. Determination of osmotic resistance of erythrocytes using flow cytometry in patients with hereditary spherocytosis. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2020; 40 (3): 81–87 [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20200312

Введение

В большинстве европейских стран у детей в качестве причин гемолитических анемий лидируют мембранопатии, прежде всего, наследственный сфероцитоз (НС). Это заболевание встречается во всем мире, но чаще – у жителей Северной Европы [1, 2]. Распространенность НС составляет примерно один случай на 5000 населения, хотя считается, что если учитывать более легкие формы болезни, частота в популяции может достигать одного случая на 2000 населения. Клинически НС проявляется как у детей, так и у взрослых, причем легкие формы часто диагностируются во взрослом возрасте [3, 4].

При НС в результате изменения состава белков мембраны эритроцитов (спектрин, анкирин, белок полосы 3 и др.) эритроциты приобретают форму шара (сферы) и после нескольких пассажей через селезенку уменьшаются в объеме и разрушаются [2, 3]. Типичными проявлениями НС являются гемолитическая анемия, желтуха, ретикулоцитоз, образование камней в желчном пузыре, спленомегалия и наличие сфероцитов в мазке периферической крови, сниженная осмотическая стойкость эритроцитов, положительный семейный анамнез [4]. Тяжесть состояния определяется по уровням гемоглобина, билирубина, числу ретикулоцитов [2, 3]. Несмотря на то что НС в большинстве случаев протекает доброкачественно, вследствие интенсивного гемолиза с возрастом повышается риск избыточного накоп-

ления железа, что приводит к сахарному диабету, поражению печени, сердца, эндокринным аномалиям [5].

Традиционно для диагностики наследственных мембранопатий используется тест осмотической резистентности, который оценивает способность эритроцитов к разрушению (гемолизу) в серии гипотонических растворов хлорида натрия. Сфероциты менее устойчивы к лизису и разрушаются быстрее по мере уменьшения тоничности раствора [2]. Классический тест требует больших временных и трудовых затрат и обладает невысокой чувствительностью и специфичностью. Он не всегда выявляет атипичные и легкие случаи НС [6]. Нормальные показатели осмотической резистентности, установленные с его помощью, встречаются в 10–20 % случаев НС [7]. У новорожденных из-за большого количества фетального гемоглобина тест может также быть ложноотрицательным, то же самое возможно при железодефиците, обструктивной желтухе и в фазу восстановления после апластического криза. В идеале необходимо использовать свежую кровь и инкубировать образец при 37 °С в течение 24 ч, так как в некоторых случаях положительный результат теста может быть получен только после инкубации [7].

Определение осмотической резистентности эритроцитов также возможно с помощью проточной цитометрии. Недавно D.I. Won и J.S. Suh [8] и позднее P. Warang et al. [9] сообщили о чувствительном и специфическом методе проточной

цитометрии для обнаружения наследственного сфероцитоза, который основан на гемолизе после воздействия деионизированной воды. Тест осмотической резистентности, продемонстрированный в этих сообщениях, прост и не требует химических реагентов. При способе, предложенном А. Yamamoto et al. [10], используются растворы фосфатно-солевого буфера разной концентрации, причем применяется не деионизированная, а дистиллированная вода. Использование проточной цитометрии для определения осмотической резистентности эритроцитов при НС весьма перспективно, так как этот метод позволяет более точно оценить степень гемолиза, уменьшить время анализа, не требует дополнительных затрат.

Целью нашего исследования является разработка и апробация метода определения осмотической резистентности эритроцитов с помощью проточной цитометрии у пациентов с НС.

Материал и методы

Экспериментальное нерандомизированное контролируемое исследование выполнялось на базе Республиканского научно-практического центра радиационной медицины и экологии человека (РПНЦ РМиЭЧ, Гомель) в 2017–2019 гг. Проведение настоящего исследования и форма информированного согласия одобрены комитетом по этике РПНЦ РМиЭЧ 27.04.2017, протокол № 4.

Критерии включения в исследование: стационарные и амбулаторные пациенты с верифицированным ранее НС, находящиеся на диспансерном учете гематолога, в возрасте от 1 года и старше, возможность получения информированного согласия пациента или законных представителей ребенка. Критерии исключения: наличие на момент включения в исследование острых инфекционных заболеваний, других заболеваний воспалительного и опухолевого генеза, ВИЧ-инфекция, прием лекарственных препаратов. Критериям включения соответствовало 35 пациентов с НС, из которых двое детей были исключены из исследования: один ребенок 5 лет переносил острую респираторную вирусную инфекцию, законные представители другого ребенка не подписали форму информированного согласия.

После получения информированного согласия пациента или законных представителей ребенка были взяты образцы крови 33 больных НС и 30 детей контрольной группы. Среди 33 пациентов с НС было 29 детей и 4 взрослых, наблюдавшихся с детского возраста, их возраст составлял от 1 года до 32 лет (медиана 8 лет). У двоих детей 16 лет ранее была выполнена спленэкто-

мия. В контрольную группу вошло 30 детей, не имеющих гематологической патологии, других острых и хронических заболеваний. Возраст лиц контрольной группы от 3 до 18 лет, медиана 9 лет. В обеих группах преобладали лица мужского пола (60 и 55 % соответственно).

Периферическую венозную кровь забирали в две вакуумные пробирки для крови, покрытые этилендиаминтетрауксусной кислотой, по 1,5 мл в каждую. Далее образцы крови выдерживали при комнатной температуре в течение 1 часа, после чего тщательно проверяли, чтобы исключить несоответствующие образцы со сгустками или явным гемолизом. Кровь в одной пробирке исследовали немедленно, в другой – после инкубации в термостате при 37 °С в течение 24 часов.

В пробирку для отмывки эритроцитов добавляли 2 мл фосфатно-солевого буфера (ФСБ), затем вносили 0,5 мл крови, после чего центрифугировали при 1000–1100 об./мин в течение 5 мин. Супернатант удаляли аспирацией, клеточный осадок ресуспендировали и вносили в каждую из 11 тест-пробирок с заданной концентрацией буфера по 2 мкл. Разведения буфера готовили путем добавления дистиллированной воды до получения концентраций конечного раствора 100 %, 80 %, 70 %, 60 %, 55 %, 50 %, 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 20 %. Каждую тест-пробирку со взвесью эритроцитов в растворах ФСБ с заданной концентрацией встряхивали на «вортексе» 2–3 секунды и инкубировали в течение 3 минут при комнатной температуре (18–25 °С), после чего для снижения агрегации эритроцитов еще раз встряхивали на «вортексе» 2–3 секунды.

Количество эритроцитов подсчитывали на проточном цитофлуориметре FACScan (Beckton-Dickinson, США). Анализировали около 10 000 клеток на dot-plot цитограмме бокового рассеивания (Side Scatter, SSC) по сравнению с прямым рассеиванием (Forward Scatter, FSC) в логарифмической шкале с использованием программного обеспечения FACScan и Cell Quest (Becton Dickinson). Оценивали сохранное число эритроцитов, подвергнутых воздействию гипотонического раствора. Результаты выражали в виде доли сохраненных клеток в процентах от общего числа зарегистрированных событий. Интактные эритроциты находятся в правом верхнем квадрате на dot-plot цитограмме SSC по сравнению с FSC (рисунок, а). Когда эритроциты достигают точки гемолиза, их содержимое выходит из клетки, что сопровождается уменьшением параметров SSC и FSC. В результате гемолизированные эритроциты перемещаются в левый нижний квадрат на dot-plot цитограмме, а неповрежденные остаются в верхнем правом квадрате (рисунок, б). После-

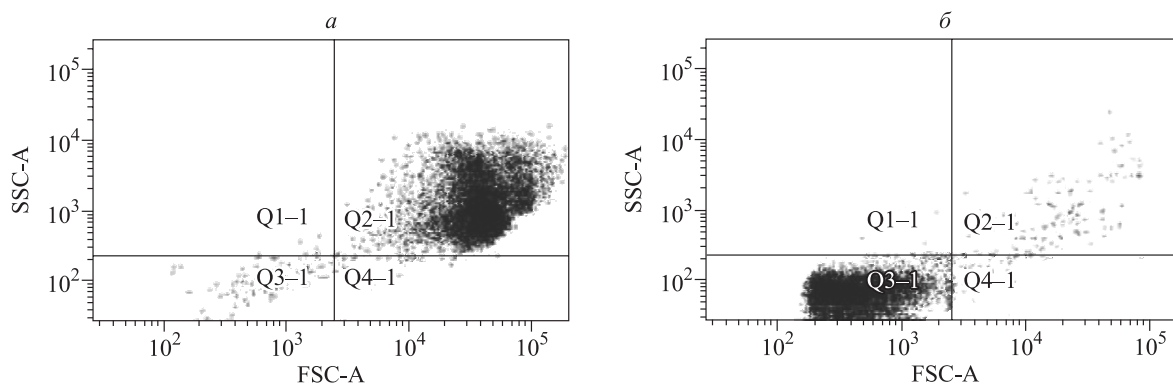


Рис. Dot-plot цитогаммы бокового рассеивания (SSC) по сравнению с прямым рассеиванием (FSC) в 80%-м (а) и 30%-м (б) ФСБ у пациента с НС

Fig. Dot-plot cytograms of side scatter (SSC) versus forward scatter (FSC) in 80 % (a) and 30 % (b) phosphate-buffered saline in a patient with HS.

довательно анализировали данные каждой тест-пробирки.

Количественные показатели представлены как медиана (Me) и интерквартильный размах (Q_1 – Q_3), для сравнения данных в двух независимых группах применялся тест Манна – Уитни. Диагностическая чувствительность, специфичность метода, прогностическая ценность положительного результата (PPV), прогностическая ценность отрицательного результата (NPV) определены при помощи онлайн-калькулятора Medcalc (https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php). Статистически значимой считалась 95 % вероятность различий ($p = 0,05$).

Результаты

У здоровых людей в свежей крови значительный гемолиз с лизисом 50 % и более эритроцитов начинается при концентрации ФСБ 40 %, а у лиц с НС – при концентрации 50–45 % (табл. 1). При этом статистически значимых различий в числе сохранных эритроцитов в крови в группах контроля и НС при начальной концентрации буфера (100 %) не выявлено ($p = 0,086$). После 24-часовой инкубации лизис 50 % эритроцитов и более начинается при концентрации ФСБ 45–40 %, а у пациентов с НС – при концентрации 60–55 %, имеются статистически значимые различия в

Таблица 1. Доля сохранных клеток в свежей крови и после инкубации в контрольной группе и у пациентов с НС, Me (Q_1 – Q_3)

Table 1. The percentage of intact red blood cells in fresh blood and after incubation in the control group and in patients with HS, Me (Q_1 – Q_3)

Концентрация раствора ФСБ, %	Доля сохранных клеток в свежей крови, %		Доля сохранных клеток в крови после 24 ч инкубации, %	
	Контроль	НС	Контроль	НС
100	99,4 (99,3–99,6)	99,2 (98,4–99,5)	99,1 (98,8–99,4)	97,9 (93,0–99,0)*
80	99,4 (98,9–99,5)	98,5 (97,7–99,2)*	98,8 (98,2–99,1)	92,8 (84,7–95,9)*
70	99,4 (98,2–99,5)	98,4 (97,2–99,1)*	98,4 (97,6–99,0)	82,9 (65,5–90,7)*
60	99,2 (97,5–99,4)	96,6 (92,4–98,2)*	97,2 (94,0–98,1)	51,1 (35,2–74,0)*
55	98,8 (97,1–99,3)	92,0 (79,5–97,0)*	91,2 (83,6–94,2)	35,8 (28,1–61,4)*
50	96,6 (93,8–98,3)	65,0 (32,0–90,0)*	81,6 (67,5–88,8)	27,8 (13,9–44,7)*
45	86,3 (75,1–92,7)	23,8 (9,9–33,1)*	56,5 (45,0–67,3)	20,0 (10,6–28,0)*
40	49,7 (42,0–65,2)	14,7 (7,5–27,2)*	32,1 (25,0–47,0)	17,8 (10,1–31,1)*
35	25,1 (16,5–42,0)	8,7 (4,3–18,0)*	18,8 (11,1–31,6)	10,4 (4,5–19,9)*
30	11,6 (5,0–21,9)	4,8 (2,6–8,0)*	14,2 (4,7–21,6)	7,3 (4,6–12,0)
20	8,1 (3,1–10,6)	3,0 (2,0–5,4)*	7,2 (4,3–9,9)	5,0 (3,0–8,7)

Примечание. * – отличие от величины соответствующего показателя группы контроля статистически значимо при $p < 0,05$.

Таблица 2. Референтные интервалы доли сохранных клеток в свежей крови и после инкубации, доля пациентов с патологическими значениями при НС**Table 2.** Reference intervals of the percentage of intact cells in fresh blood and after incubation, and proportion of HS patients with pathological values

Концентрация раствора ФСБ, %	Свежая кровь		Кровь после инкубации	
	Контроль (5–95 %)	НС, %	Контроль (5–95 %)	НС, %
100	97,2–99,9	3,0	94,0–99,7	25
80	96,7–99,7	15,2	93,1–99,3	54,2
70	97,0–99,7	21,2	93,1–99,4	79,2
60	94,8–99,7	36,4	90,7–99,0	95,8
55	94,8–99,6	60,6	73,6–97,8	87,5
50	88,4–99,4	72,7	53,8–93,6	83,3
45	45,1–96,0	78,8	30,0–79,0	79,2
40	12,0–95,1	36,4	8,0–65,6	20,8
35	5,0–65,1	27,3	4,6–41,4	25
30	3,0–33,9	33,3	3,8–30,1	20,8
20	2,1–30,1	35,3	2,9–17,3	23,1

уровне гемолиза при всех концентрациях буфера, кроме 30 % ($p = 0,084$) и 20 % ($p = 0,43$), где гемолиз был значительным в обеих группах.

Для определения референтных интервалов нами использованы показатели здоровых лиц, находящиеся в интервале от 5 до 95 перцентилей, для наглядности приведены доли числа пациентов с НС, чьи значения находятся ниже 5 перцентилей здоровых лиц («патологические значения») (табл. 2). До инкубации патологические значения хотя бы в двух разведениях были выявлены у 27 из 33 пациентов с НС (81,8 %), четыре результата были признаны сомнительными (патологические изменения обнаружены лишь в одном разведении) и два анализа соответствовали нормальным значениям. После инкубации удалось выявить изменения в двух и более разведениях дополнительно у четырех пациентов. В результате у двух больных НС подтвердить диагноз с помощью метода проточной цитометрии не удалось: у одного доли сохранных клеток не отличались от нормальных ни до, ни после инкубации, у другого выявлено по одному патологическому значению до и/или после инкубации.

Патологические изменения обнаружены у 31 пациента с НС (93,9 %) и у 5 из 30 (16,7 %) лиц контрольной группы, у которых значения были ниже нижней границы референтного интервала более чем в одном разведении. Диагностическая чувствительность теста 93,9 % (95%-й доверительный интервал 79,8–99,3), специфичность 83,3 % (95%-й доверительный интервал 65,3–94,4), PPV 86,1 %, NPV 92,6 %.

Обсуждение

Классический метод определения осмотической резистентности с различными разведениями растворов натрия хлорида позволяет выявить около 80 % лиц с НС, а оценка выраженности гемолиза в большой степени субъективна [1].

Тест осмотической резистентности, описанный в сообщении Y.J. Shim et al., может быть использован в качестве первого метода для скрининга НС и отражает тяжесть течения заболевания. Чувствительность теста 91,3 %, специфичность – 87,5 % [11]. Особенностью его постановки является то, что анализ производится в одной и той же пробирке с добавлением деионизированной воды после каждого измерения. Метод применялся и польскими учеными, подтвердившими его применимость и рекомендовавшими увеличить продолжительность анализа [12]. Авторы из Индии, показавшие высокую эффективность данного теста (96 %), полагают, что он должен заменить традиционный тест осмотической резистентности (специфичность 68,9 %) как более быстрый, чувствительный, специфичный и недорогой [13].

Нами использована модификация метода A. Yamamoto et al. [10], не требующая деионизированной воды и не столь чувствительная к строгому следованию протоколу исследования во времени. Фосфатно-солевой буфер лучше сбалансирован по ионному составу по сравнению с растворами хлорида натрия. Оценка выраженности гемолиза объективна, а показатели чувствитель-

ности и специфичности значительно превосходят соответствующие показатели классического теста. Однако авторами не проводилась оценка гемолиза после 24-часовой инкубации и не предлагались референтные значения.

Нами использованы как часто применяемые разведения буфера, так и промежуточные, позволяющие точнее оценить выраженность и скорость гемолиза. Считаем, что в практической работе можно не использовать исследование с неразведенным буфером (100 %) со свежей кровью, а также 30- и 20-процентное разведение после инкубации, так как они не имеют значимых различий у пациентов с НС и лиц контрольной группы ($p > 0,05$). Необходимо также оценивать различия гемолиза в препаратах до и после инкубации. Так, из пяти детей контрольной группы, имеющих сниженные значения осмотической резистентности до инкубации в двух и более разведениях, у трех после инкубации регистрировались нормальные значения. У лиц с НС такой динамики не наблюдалось.

К ограничениям нашего исследования можно отнести отсутствие специального отбора по степени тяжести НС. Референтные интервалы доли сохранных клеток были рассчитаны на основе обследования небольшой контрольной группы, состоящей из 30 здоровых лиц, при взятом нами диапазоне от 5 до 95 процентиля некоторые из них демонстрировали «патологические» значения.

Заключение

Апробированный метод определения осмотической резистентности эритроцитов с помощью проточной цитометрии показал высокую чувствительность (93,9 %) и специфичность (83,3 %) при диагностике наследственного сфероцитоза. Данный метод выполним в лаборатории любого уровня, оснащенной проточным цитометром, и не требует дополнительных материальных затрат. Вместе с тем он позволяет быстро и объективно оценить осмотическую резистентность эритроцитов и может быть рекомендован в широкую клиническую практику в качестве диагностического теста для дифференциальной диагностики гемолитических анемий.

Список литературы/References

1. Максимов А.Г., Тыренко В.В., Голота А.С., Живописева А.М., Малахова С.Н., Петрова Т.Н., Зайцева Т.С. Современные представления о наследственном микросфероцитозе. *Вестн. гематологии*. 2009; 5 (3): 36–44.
2. Maximov A.G., Tyrenko V.V., Golota A.S., Zhi-vopistseva A.M., Malakhova S.N., Petrova T.N., Zaitseva T.S. The modern conception of hereditary spherocytosis. *Vestnik gematologii = Bulletin of Hematology*. 2009; 5 (3): 36–44. [In Russian].
3. Haley K. Congenital hemolytic anemia. *Med. Clin. North. Am.* 2017; 101 (2): 361–374. doi: 10.1016/j.mcna.2016.09.008.
4. Blanc L., Wolfe L.C. General considerations of hemolytic diseases, red cell membrane, and enzyme defects. In: *Lanzkowsky's manual of Pediatric Hematology and Oncology*. 6th ed. Academic Press, 2016: 137–146.
5. King M.J., Garçon L., Hoyer J.D., Iolascon A., Picard V., Stewart G., Bianchi P., Lee S.H., Zanella A., International council for standardization in haematology. ICSH guidelines for the laboratory diagnosis of nonimmune hereditary red cell membrane disorders. *Int. J. Lab. Hematol.* 2015; 37 (3): 304–325. doi: 10.1111/ijlh.12335
6. Mahajan V., Jain S.K. Hereditary spherocytosis. *Neo Reviews*. 2016; 17 (12): 697–704. doi: 10.1542/neo.17-12-e697
7. Farias M.G. Advances in laboratory diagnosis of hereditary spherocytosis. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2016; 55 (7): 944–948. doi: 10.1515/cclm-2016-0738
8. Roper D., Layton M. Investigation of the hereditary haemolytic anaemias: membrane and enzyme abnormalities. In: *Dacie and Lewis Practical Haematology*. 11th ed. Elsevier Ltd, 2011. 245–250.
9. Won D.I., Suh J.S. Flow cytometric detection of erythrocyte osmotic fragility. *Cytometry B. Clin. Cytom.* 2009; 76B: 135–141. doi: 10.1002/cyto.b.20448
10. Warang P., Gupta M., Kedar P., Ghosh K., Colah R. Flow cytometric osmotic fragility – an effective screening approach for red cell membranopathies. *Cytometry B. Clin. Cytom.* 2011; 80 (3): 186–190. doi: 10.1002/cyto.b.20583
11. Yamamoto A., Saito N., Yamauchi Y., Takeda M., Ueki S., Itoga M., Kojima K., Kayaba H. Flow cytometric analysis of red blood cell osmotic fragility. *J. Lab. Autom.* 2014; 19 (5): 483–487. doi: 10.1177/2211068214532254
12. Shim Y.J., Won D.I. Flow cytometric osmotic fragility testing does reflect the clinical severity of hereditary spherocytosis. *Cytometry B. Clin. Cytom.* 2014; 86B: 436–443. doi: 10.1002/cyto.b.21143
13. Ciepiela O., Adamowicz-Salach A., Zgodzińska A., Łazowska M., Kotuła I. Flow cytometric osmotic fragility test: Increased assay sensitivity for clinical application in pediatric hematology. *Cytometry. B. Clin. Cytom.* 2018; 94 (1): 189–195. doi: 10.1002/cyto.b.21511
14. Manivannan P., Tyagi S., Chandra D., Mishra P., Pati H.P., Saxena R. Flow cytometric analysis of patients with hereditary spherocytosis – an Indian scenario. *Hematology*. 2018; 23 (3): 175–180. doi: 10.1080/10245332.2017.1376855

Сведения об авторах:

Екатерина Федоровна Мицура, ORCID: 0000-0003-4206-4988, e-mail: ronco-gomel@mail.ru

Жанна Никитична Пугачева, ORCID: 0000-0002-0310-5532, e-mail: j.pugacheva@gmail.com

Людмила Ивановна Волкова, к.м.н., ORCID: 0000-0003-1054-0054, e-mail: luidmila_volkova@mail.ru

Information about the authors:

Ekaterina F. Mitsura, ORCID: 0000-0003-4206-4988, e-mail: ronco-gomel@mail.ru

Zhanna N. Pugacheva, ORCID: 0000-0002-0310-5532, e-mail: j.pugacheva@gmail.com

Lyudmila I. Volkova, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0003-1054-0054,
e-mail: luidmila_volkova@mail.ru

Поступила в редакцию 31.01.2020

После доработки 11.02.2020

Принята к публикации 03.04.2020

Received 31.01.2020

Revision received 11.02.2020

Accepted 03.04.2020