

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НОРМАТИВНЫХ ЗНАЧЕНИЙ TREC И KREC В СУХИХ ПЯТНАХ КРОВИ НОВОРОЖДЕННЫХ РАЗНОГО СРОКА ГЕСТАЦИИ В СВЕРДЛОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Дерябина С.С.^{1,2,3}, Тузанкина И.А.^{2,3,4}, Шершнева В.Н.^{3,5}

¹ ГБУЗ СО «Клинико-диагностический центр „Охрана здоровья матери и ребенка“, г. Екатеринбург, Россия

² ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

³ ГОУ ВПО «Уральский федеральный университет имени Первого президента России Б.Н. Ельцина, г. Екатеринбург, Россия

⁴ ГБУЗ СО «Областная детская клиническая больница № 1», г. Екатеринбург, Россия

⁵ ФГБУН «Институт промышленной экологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Резюме. В ходе подготовительного этапа работы по внедрению генетического тестирования на тяжелый комбинированный иммунодефицит в программу неонатального скрининга в Свердловской области проведено исследование по количественному определению маркеров Т- и В-клеточного неогенеза (TREC и KREC соответственно) в крови условно здоровых новорожденных. Материалом исследования служили архивные образцы сухих пятен крови, собранных на тест-бланки для рутинного неонатального скрининга у 26 девочек и 26 мальчиков, родившихся доношенными и не имевших тяжелых заболеваний на первом году жизни. Дополнительно исследовано влияние гестационного возраста плода на количество данных маркеров (TREC и KREC) у недоношенных новорожденных разного срока гестации. Обследованы образцы крови 55 недоношенных детей, родившихся преждевременно (23–36 недель гестации). Показано, что уровни TREC и KREC последовательно возрастали с увеличением срока гестации, однако динамика данных изменений концентрации маркеров оказалась различной. В связи с этим рекомендуемый срок взятия образца крови для скрининга на ТКИН полностью соответствует срокам взятия образцов, принятым для большинства наследственных скринируемых заболеваний. Исключение составляет получение результата с полным отсутствием TREC или KREC в образце крови новорожденного любой степени недоношенности (при валидном количестве копий контрольного гена), что должно служить сигналом для незамедлительного назначения этому ребенку консультации врача-иммунолога и проведения углубленного иммунологического обследования, поскольку это может явиться первым прогностическим признаком фатального заболевания. Для получения корректных пороговых уровней TREC/KREC необходимы дополнительные исследования на большей выборке новорожденных (1000–5000) с последующей валидацией полученных референсных границ в исследованиях с включением больных с разными формами первичных иммунодефицитов.

Ключевые слова: тяжелая комбинированная иммунная недостаточность, первичные иммунодефициты, TREC, KREC, массовое обследование новорожденных, ретроспективная диагностика

Адрес для переписки:

Дерябина Светлана Степановна
ГБУЗ СО «Клинико-диагностический центр „Охрана
здоровья матери и ребенка“»
620041, Россия, г. Екатеринбург, ул. Флотская, 52.
Тел/факс: 8 (343) 374-31-10.
E-mail: ssderyabina@gmail.com

Address for correspondence:

Deryabina Svetlana S.
Medical Centre “Health Care of Mother and Child”
620041, Russian Federation, Ekaterinburg, Flotskaya str., 52.
Phone/Fax: 7 (343) 374-31-10.
E-mail: ssderyabina@gmail.com

Образец цитирования:

С.С. Дерябина, И.А. Тузанкина, В.Н. Шершнева
«Определение нормативных значений TREC и KREC в сухих
пятнах крови новорожденных разного срока гестации
в Свердловской области» // Медицинская иммунология,
2018. Т. 20, № 1. С. 85–98.

doi: 10.15789/1563-0625-2018-1-85-98

© Дерябина С.С. и соавт., 2018

For citation:

S.S. Deryabina, I.A. Tuzankina, V.N. Shershnev
“Determination of reference values for TREC and KREC
in dry blood spots of newborns from different gestation ages
in Sverdlovsk Region”, *Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya*, 2018, Vol. 20, no. 1,
pp. 85–98. doi: 10.15789/1563-0625-2018-1-85-98

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-1-85-98

DETERMINATION OF REFERENCE VALUES FOR TREC AND KREC IN DRY BLOOD SPOTS OF NEWBORNS FROM DIFFERENT GESTATION AGES IN SVERDLOVSK REGION

Deryabina S.S.^{a, b, c}, Tuzankina I.A.^{b, c, d}, Shershnev V.N.^{c, e}

^a Medical Center "Health Care of Mother and Child", Ekaterinburg, Russian Federation

^b Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation

^c B.N. Yeltsin Ural Federal University, Ekaterinburg, Russian Federation

^d Regional Children Clinical Hospital No. 1, Ekaterinburg, Russian Federation

^e Institute of Industrial Ecology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation

Abstract. As a preparatory stage for implementation of genetic testing for severe combined immunodeficiency under a neonatal screening program, a study was performed in Sverdlovsk Region which concerned quantitative determination of T and B cell neogenesis markers (TREC and KREC, respectively) in blood of conditionally healthy newborns. Archived samples of dry blood spots collected in test-forms for routine neonatal screening were used as biological material for the study of full-term 26 girls and 26 boys who did not exhibit serious illnesses during first year of their life. In addition, we investigated potential effects of foetal gestational age upon the number of TREC and KREC in preterm infants. Blood samples from 55 preterm infants (23 to 36 gestational weeks) were also examined. It was shown that the levels of TREC and KREC increased sequentially with the increased gestation terms, but the quantitative changes of markers showed different dynamics. In this respect, the recommended terms of blood sample collection for SCID screening is entirely consistent with timing of blood sampling for routine newborn screening. An alternative result was obtained with a complete absence of TREC or KREC in blood sample of a newborn, irrespectively of prematurity degree (at valid copy numbers of a control gene) which should serve as an indication for immediate consulting of the child by immunologist and in-depth immunological examination, because it may be a first prognostic sign of a fatal disease.

In order to obtain correct cut-off levels for TREC/KREC, additional studies are needed on a larger sample of newborns (1.000 to 5.000), followed by validation of the obtained reference boundaries in studies involving patients with different forms of primary immunodeficiencies.

Keywords: severe combined immunodeficiency, primary immunodeficiency, TREC, KREC, newborn screening, retrospective diagnosis

Введение

Современные достижения иммунологии все явственнее указывают на то, что в патогенезе многих заболеваний существенная роль отводится иммунной системе [5, 7, 10]. Работы последних лет в области фундаментальной иммунологии, клеточной биологии, белковой и геномной инженерии позволили по-новому взглянуть на некоторые механизмы функционирования иммунной системы и определить спектр и локализацию нарушений, приводящих к развитию различных видов иммунопатологии, в том числе первичных иммунодефицитных состояний (ПИД).

Повышенная восприимчивость новорожденных к инфекции является общей проблемой в неонатологии и считается одной из самых главных уязвимостей ребенка в неонатальный период жизни: инвазивные неонатальные инфекции являются причиной почти 36% случаев ранней

младенческой смертности [40, 41, 52], выжившие после сепсиса новорожденные имеют повышенный риск длительного пребывания в стационаре, развития бронхолегочной дисплазии и плохо поддающихся коррекции отклонений в психомоторном развитии [9, 27, 40, 44, 45, 50].

Результаты недавних исследований [28] ясно показывают, что «зерно» для проявления различных иммунологически опосредованных заболеваний, впервые проявляющихся в зрелом возрасте, закладывается в раннем послеродовом периоде жизни. Именно на протяжении этого периода иммунная система новорожденного подвергается тонкой самонастройке с помощью различных функциональных «клавиш» и в условиях прямой стимуляции факторами окружающей среды [25, 28, 38].

Многие исследователи объясняют «несостоятельность» первичного иммунного ответа ново-

рожденного незрелостью его иммунной системы на момент родов, ее функциональной неполноценностью по аналогии с не полностью сформированными органами (мозг, легкие) и системами (нервная, дыхательная) [28, 29]. Другая теория рассматривает угнетенное состояние иммунной системы, наблюдаемое и у плода, и у матери, как обязательное условие их взаимного симбиоза в течение всей беременности, обеспечивающее «сдерживание» иммунного конфликта. После рождения иммунная система ребенка начинает активно «дозреть» и вскоре приобретает все черты специфической реактивности взрослого [1, 29, 37].

Однако рецидивирующие хронические инфекции, а также симптомы обычных инфекций, особенностью которых является тяжелое или атипичное течение и отсутствие ответа на стандартные терапевтические воздействия, нередко могут быть настораживающими признаками особой группы заболеваний – первичных иммунодефицитов [6, 13, 14, 21]. В этой связи особую важность для врача-клинициста приобретает возможность выявления ребенка с первичным иммунодефицитом, у которого «сбой» иммунного ответа обусловлен не физиологическим состоянием новорожденности, а наличием генетического дефекта, нарушающего нормальное функционирование одного или нескольких ключевых компонентов иммунной системы.

Особого внимания заслуживают дети, родившиеся на малом сроке гестации (до 32 нед.) и дети, родившиеся с экстремально низкой массой тела. Известно, что распространенность сепсиса новорожденных обратно коррелирует с гестационным возрастом и массой тела при рождении [40, 44, 45] следовательно, дети, рожденные преждевременно, могут быть отнесены к группе риска по развитию инфекций. Поскольку состояние иммунодефицита у недоношенных детей не подвергалось всесторонней оценке до начала скринирования на данную патологию, в настоящее время такие дети рассматриваются как имеющие повышенный риск развития инфекций и требуют соответствующих условий выхаживания [17, 20, 33]. В этом контексте, незрелость иммунной системы как фактор, имеющий временный эффект, обусловленный гестационным возрастом, трудноотделим от специфических факторов, связанных с состоянием здоровья недоношенных новорожденных: врожденных аномалий, инфекционных, эндокринных осложнений и нарушений обмена веществ. [25, 28, 38]. Поэтому крайне важно иметь алгоритм уточнения дефектных механизмов, лежащих в основе иммунных реакций

у новорожденных любого гестационного возраста, который будет способствовать раннему распознаванию пациентов с врожденной иммунной недостаточностью.

Благодаря возросшему в последнее время вниманию к данной проблеме со стороны Всемирного общества здравоохранения (ВОЗ) и международных медицинских организаций (ESID, J-Project, JMF) отмечается постепенное исчезновение «диагностического провала» среди больных ПИД за счет появления надежных методов диагностики тяжелых форм иммунной недостаточности (ТКИН) [26, 33, 46]. Во многих странах мира разрабатываются и внедряются в национальные программы массового обследования новорожденных новые, улучшенные методы скринирования на расширенный список иммунодефицитных состояний, тем самым подчеркивается значительный потенциал этой превентивной стратегии здравоохранения [18, 20].

Попытки создать единую российскую базу данных больных первичными иммунодефицитами пока не увенчались успехом. По данным отечественных исследователей, в России ежегодно фиксируется около 180 новых случаев ПИД [14].

В Свердловской области регистр ПИД за 5 лет (2010–2015) увеличился со 163 (взрослых 43) до 372 (взрослых 104) пациентов. Ежегодно регистр пополняется на 20–70 человек, что составляет от 15 до 43% всероссийского регистра. В то же время большое количество пациентов с первичным иммунодефицитом до сих пор не имеют точного диагноза, что означает безвозвратную потерю времени для назначения адекватной терапии, необратимые повреждения внутренних органов и, как следствие, невозможность вернуть человека на иной, качественно новый уровень жизни.

На сегодняшний день эффективным способом оценки пролиферации Т-лимфоцитов признано определение TREC (T-cell receptor excision circle). TREC представляют собой кольцевые фрагменты ДНК, образующиеся при реаранжировке Т-клеточного рецептора (ТКР) и содержащие определенные константные последовательности, по которым их можно обнаружить [2, 12].

Количество копий TREC в образце ДНК измеряется с помощью количественной ПЦР в реальном времени (кПЦР-РВ) и отражает число наивных Т-клеток, вышедших из тимуса в кровоток. Любой генетический дефект, который нарушает развитие Т-клеток, индуцирует их апоптоз или блокирует их дифференцировку в тимусе, приводит к Т-клеточной лимфопении и низкому уровню TREC [4, 20, 33, 46]. Таким образом,

количественная оценка уровня TREC позволяет выявить детей с типичной ТКИН, а также с другими заболеваниями, затрагивающими численность и функционирование Т-клеточного звена иммунной системы (например, синдром Ди Джорджи или синдром CHARGE).

Новорожденные дети с ТКИН имеют очень низкие или неопределяемые уровни TREC, именно это позволяет выявлять таких детей на первой неделе жизни как угрожаемых по данному заболеванию и направлять на углубленное иммунологическое исследование до манифестации клинических проявлений болезни.

По состоянию на сентябрь 2016 года неонатальный скрининг на ТКИН полностью реализован в 41 штате США и находится в стадии разработки еще в нескольких других штатах. Израиль также выполняет скринирование на ТКИН в рамках государственной программы, несколько пилотных проектов осуществляются в странах Европы, Ближнего Востока и Азии [19, 32, 39, 42, 51].

Проблема идентификации больных с В-клеточными дефектами, приводящими к развитию не менее тяжелых и угрожающих жизни состояний (агаммаглобулинемия Брутона, гипериммуноглобулинемия М, ТКИН с отсутствием В-клеток), в настоящее время решается скринированием на KREC (kappa-deleting recombination exercise circle) [22, 42, 47].

KREC — аналог кольцевой молекулы TREC, образующийся в процессе созревания В-клеток в костном мозге. Как и в случае TREC, KREC не может реплицироваться в клетке, является стабильной структурой и встречается более чем в 50% В-лимфоцитов [34, 47]. Тестирование новорожденных на KREC потенциально полезно для выявления больных с дефектами раннего созревания В-клеток в костном мозге [33, 34, 47].

Большим преимуществом является возможность комбинировать данные тесты: TREC и KREC могут быть измерены одновременно в реакции мультиплексной ПЦР, что позволяет обнаруживать суммарно больше первичных иммунодефицитов, чем при отдельном тестировании TREC или KREC. Благодаря применению такой комбинации маркеров возрастает количество больных детей, получивших возможность на основании результата скрининга своевременно начать адекватную патогенетически обоснованную терапию, что, в конечном итоге, ведет к снижению общей заболеваемости и младенческой смертности, обусловленных данными нозологиями.

В Российской Федерации в настоящее время ПИД, включая и его фатальную форму — ТКИН, диагностируется после манифестации клинических признаков. Учитывая то, что ПИД имеет несколько фенотипических масок и часто «микрирует» под другие заболевания, а у врачей первичного звена отсутствует настороженность относительно данной нозологии, российским больным приходится преодолевать «диагностическую одиссею» — длинную последовательность клинических диагностических исследований и направлений, предшествующих окончательной диагностике состояния. Между тем, только по данным областной детской клинической больницы № 1 (ОДКБ № 1) г. Екатеринбурга, ежегодно в получении консультации специалиста-иммунолога нуждаются около 12 000 детей с патологическими нарушениями функционирования иммунной системы, не редко находящиеся уже в состоянии крайней тяжести по причине инфекционных, воспалительных, аутоиммунных и других осложнений. Осложнения, которые получает больной ребенок во время данного диагностического пути, зачастую становятся необратимыми, несмотря на проводимое лечение.

Возможность на основании сниженного количества в крови TREC и KREC формировать группу риска по ПИД среди детей еще в неонатальный период позволило бы вывести диагностику данных заболеваний на новый качественный уровень, своевременно назначать пораженным детям адекватную, патогенетически обоснованную терапию и, в конечном итоге, достичь стабильного общего состояния таких пациентов.

Поскольку подобных исследований в российской популяции новорожденных не проводилось, первоочередной задачей в этом направлении является определение нормативных значений содержания копий TREC и KREC в лимфоцитах условно здоровых детей данного возраста и недоношенных детей с разным сроком гестации.

Материалы и методы

Образцы и экстракция ДНК

В ходе исследования было выполнено количественное определение копий TREC, KREC и гена рецептора интерлейкина 17— *IL17RA* (в качестве внутреннего контроля взятия материала) в лимфоцитах 52 условно здоровых новорожденных (26 девочек и 26 мальчиков) и 55 новорожденных, родившихся преждевременно.

Материалом для исследования служили образцы крови детей, родившихся в Свердловской области в период с 01.01.2011 по 31.07.2016, у которых брали кровь на фильтровальные карточки

для неонатального скрининга 903 Wallac Russia CE Card (GE Healthcare Bio-Sciences Corp, США). Фильтровальные карточки хранились в Лаборатории неонатального скрининга ГБУЗ СО «Клинико-диагностический центр „Охрана здоровья матери и ребенка“» (КДЦ «ОЗМР», г. Екатеринбург, главный врач — Е.Б. Николаева), хранение карточек производилось при комнатной температуре.

В исследование были включены условно здоровые дети, отобранные случайным образом из архива лаборатории неонатального скрининга. Критерием отбора в данную группу служили отрицательные результаты неонатального скрининга по 16 заболеваниям [8] и отсутствие данных о тяжелых заболеваниях ребенка на первом году жизни.

Для выяснения характера влияния гестационного возраста плода на количество образующихся TREC и KREC в исследование были включены 55 недоношенных новорожденных (11 детей, родившихся на сроке 23-25 недель гестации, 15 — на сроке 27-28 недель, 16 — на сроке 30-32 недели и 15 детей, родившихся на сроке 35-36 недель гестации).

Экстракция ДНК из сухих пятен крови для методики количественной ПЦР в реальном времени проводилась с помощью набора «ДНК-сорб-В» (Амплисенс, Россия). Поскольку в дальнейшем требовалось количественно оценивать наличие маркеров TREC и KREC в единице объема цельной крови в пересчете на определенное количество лейкоцитов пациента, было принято решение о модификации протокола, заявленного фирмой-производителем. Учитывались следующие моменты:

- биологический материал из фильтровальной карточки должен быть взят в минимальном количестве;
- этого количества должно быть достаточно для выделения качественной ДНК;
- цифровое значение количества должно быть удобным для последующих расчетов.

Исходя из этого, в реакцию выделения ДНК брали 3 диска, выбитых из сухих пятен крови на фильтре ручным дыроколом (Single Hole Punch, 1/8" Hole Size, США). Учитывая, что один выбитый стандартный диск размером 3,2 мм содержит в себе 3,0-3,2 мкл цельной крови [47], приняли, что объем крови, взятой для экстракции ДНК, в нашем случае приблизительно равен 10 мкл.

Указанные диски (3 шт. от каждого образца) выбивали в пробирки объемом 1,5 мл типа «Эппендорф», заливали 150 мкл лизирующего буфе-

ра (из набора), тщательно встряхивали на шейкере и после краткосрочного центрифугирования в течение 15 с инкубировали в термостате при 65 °С в течение 30-45 минут. Для исключения контаминации соседних образцов область ножа пробойника после каждого образца обрабатывали 70% раствором этанола и обжигали в пламени. По окончании инкубации пробирки помещали в центрифугу “Mini Spin” (Eppendorf, США), после чего центрифугировали в течение 1 минуты 12 500 оборотов/мин. Надосадочную жидкость переносили в чистую пробирку и добавляли 15 мкл Сорбента, входящего в состав набора. Дальнейшая процедура экстракции не отличалась от инструкции фирмы-производителя. С целью концентрирования образца ввиду малого количества материала ДНК элюировали в 50 мкл ТЕ-буфера. Хранение образцов ДНК проводили при -30 °С без удаления сорбента.

Количественный анализ TREC и KREC методом ПЦР в режиме реального времени

Количественное определение маркеров наивных Т- и В-клеток было проведено с помощью мультиплексной тест-системы, разработанной в Институте химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН, г. Новосибирск) и Новосибирского государственного исследовательского университета (г. Новосибирск) совместно с ГБУЗ «Детская городская клиническая больница № 9 (ДГКБ № 9) им. Г.Н. Сперанского» (Москва) [2].

Мультиплексную ПЦР в режиме реального времени проводили в амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США), для построения калибровочных кривых использовали входящие в состав набора калибраторы с концентрацией 10^7 , 10^5 , 5×10^3 копий в 1 мл каждого аналита (TREC/KREC/IL17RA). Количество копий анализируемых ДНК мишеней рассчитывали, исходя из полученных калибровочных кривых с помощью программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager (Bio-rad, США). Тангенс угла наклона калибровочной кривой составлял не менее -3,2 с коэффициентом корреляции $R^2 > 0,98$, что соответствовало общепринятым значениям [35]. Разница в пороговом цикле между дублями составляла не более 0,5 цикла.

Использование в исследуемой тест-системе референсного гена IL17RA в качестве внутреннего контрольного образца позволяло контролировать этапы экстракции ДНК и проведения реакции амплификации. Это явилось также своеобразным показателем адекватности количества материала, взятого для исследования,

поскольку фильтровальные карточки отдельных образцов имели различные сроки хранения (от нескольких месяцев до 3-х лет), что могло сказаться на эффективности экстракции ДНК. В дальнейшем экспериментальным путем было подтверждено, что данный объем крови (3 диска) отвечает всем вышеуказанным требованиям. Концентрация полученных растворов ДНК составляла 10-30 нг/мкл, отношение поглощения при длинах волн 260 нм и 280 нм (коэффициент A_{260}/A_{280}) находилось в пределах 1,7-1,9, что свидетельствовало о высокой чистоте препаратов. Измерение концентрации ДНК и степени ее чистоты определяли спектрофотометрическим методом с использованием NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, США).

Методы математической обработки данных

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием пакетов прикладных программ Excel, Statistica 7.0 for Windows. Методы описательной статистики применялись на предварительном этапе сопоставления показателей различных групп. На основании варьирования показателя, численности выборок, а также закономерности распределения использовали непараметрические методы представления данных в виде медианы и интерквартильного размаха (25%-75%). Сравнение вариационных рядов осуществлялось с помощью непараметрического критерия Краскела—Уоллиса и Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение

Необходимо отметить, что зарубежные исследователи используют различные подходы к оценке уровня содержания TREC и KREC: количество копий мишеней в расчете на 10^6 моноклеаров, TREC/CD45⁺T-клеток, TREC/KREC на микролитр крови или TREC/KREC на миллиграмм ДНК [2, 12, 46].

Согласно инструкции используемой нами тест-системы, абсолютное количество молекул TREC, KREC и нормировочного локуса *IL17RA* в анализируемом образце ДНК определяется с помощью калибровочных кривых. Поскольку концентрации TREC, KREC и нормировочного локуса *IL17RA* в калибровочных кривых выражены в копиях молекул на миллилитр, то и количество данных маркеров для каждого исследуемого образца, определяемое в течение реакции, выражается в тех же единицах — копий на миллилитр. Учитывая количество взятого в реакцию объема раствора ДНК, можно получить размерность маркеров в копиях на реакцию, однако для клинициста-иммунолога гораздо важнее знать не абсолютное количество TREC и KREC на один

миллилитр цельной крови пациента или на одну абстрактную реакцию, а долю наивных Т- и В-клеток (суррогатными маркерами которых и являются TREC и KREC соответственно) среди всех клеток лейкоцитарного ряда. Таким образом, зная количество ядродержащих клеток в единице объема цельной крови, взятой в реакцию выделения ДНК, можно легко пересчитать количество TREC (KREC) на количество лейкоцитов.

При исследовании ДНК, выделенной из цельной крови, количество копий TREC(KREC) в образце рассчитывают на 10^5 лейкоцитов с учетом внутреннего контроля, осуществляемого нормировочным локусом *IL17RA*, по формуле [2]:

$$\text{TREC (KREC)} = \frac{\text{TREC (KREC) в 1 мл}}{\text{IL17RA в 1 мл}} \times 200\,000.$$

Данная формула учитывает количество ядродержащих клеток в образце крови, взятой для выделения ДНК (100 мкл): 1 мл крови содержит примерно 10^6 лейкоцитов, следовательно, в 0,1 мл их 10^5 , к тому же, количество клеток в 2 раза меньше копий *IL17RA* (в связи с диплоидным набором хромосом у человека).

При исследовании ДНК, выделенной из сухих пятен крови разработанным нами способом, количество копий TREC(KREC) в образце рассчитывают на 10^4 лейкоцитов с учетом внутреннего контроля *IL17RA*:

$$\text{TREC (KREC)} = \frac{\text{TREC (KREC) в 1 мл}}{\text{IL17RA в 1 мл}} \times 20\,000.$$

Данная формула также учитывает количество ядродержащих клеток в образце крови: количество клеток в 2 раза меньше копий *IL17RA*, а объем материала для выделения ДНК (3 диска, выбитых из сухого пятна) в нашем случае составил 10 мкл (0,01 мл) цельной крови. С учетом объема реакции и в пересчете на лейкоциты числитель равен 2×10^4 (20 000).

Таким образом, в ходе исследования были получены количественные значения маркеров TREC и KREC в лимфоцитах 52 условно здоровых новорожденных (табл. 1).

Полученные количественные значения TREC не имели статистически значимых различий по полу (критерий Манна—Уитни $p = 0,11$, рис. 1), что соответствует результатам, полученным зарубежными исследователями [36, 43].

Количество копий KREC, определенных для девочек и мальчиков, значимо отличалось (критерий Манна—Уитни $p = 0,01$) (рис. 2). Однако значимость данного различия, на наш взгляд,

ТАБЛИЦА 1. КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ЗНАЧЕНИЯ УРОВНЕЙ TREC И KREC, ОПРЕДЕЛЕННЫЕ В СУХИХ ПЯТНАХ КРОВИ УСЛОВНО ЗДОРОВЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ

TABLE 1 CONCENTRATION OF TREC AND KREC, QUANTIFIED BY REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION IN DRY BLOOD SPOTS OF HEALTHY NEWBORNS

Статистические параметры Statistical parameters	TREC, копий на 10^4 лейкоцитов TREC, copies per 10^4 leucocytes	KREC, копий на 10^4 лейкоцитов KREC, copies per 10^4 leucocytes
ME	641,9	147,3
$Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$	419,0-855,0	88,3-232,4
Min-Max	261,9-1620,1	25,4-973,0

Примечание. В таблице для каждого маркера отображены: медиана (Me), квартильный размах ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), размах (минимум, максимум, Min-Max) переменной.

Note. For each marker, the following indexes are shown: median (Me), $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$; minimal and maximal values, (Min-Max).

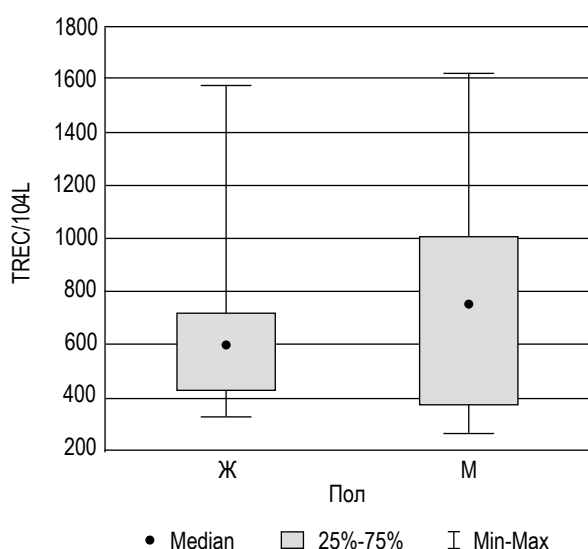


Рисунок 1. Количество копий TREC на 10^4 лейкоцитов в группе условно здоровых девочек (Ж) и мальчиков (М)
Примечание. На диаграмме для каждой группы отображены: медиана, квартильный размах ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), размах (минимум, максимум) переменной.

Figure 1. TREC values (copy numbers per 10^4 leukocytes) in the group of healthy newborns: 26 girls (F) and 26 boys (M)

Note. Minimum, first quartile; median, third quartile and maximum are depicted in the figure.

не является определяющим фактором при установлении порогового уровня для KREC при разделении нормального и патологичного результатов анализа у детей любого пола и требует дополнительной проверки на расширенной выборке испытуемых.

Все используемые в настоящее время в мировой практике скрининг-тесты имеют хорошо скорректированные диагностические пороги для четкого алгоритма дифференцировки «больных» и «здоровых» новорожденных. Очевидно, что для качественного и надежного разделения здоровых детей и детей с риском развития

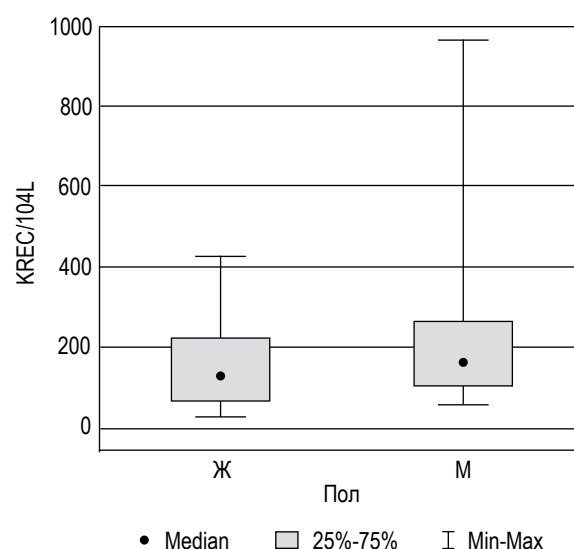


Рисунок 2. Количество копий KREC на 10^4 лейкоцитов в группе условно здоровых девочек (Ж) и мальчиков (М)
Примечание. На диаграмме для каждой группы отображены: медиана, квартильный размах ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), размах (минимум, максимум) переменной.

Figure 2. KREC values (copy numbers per 10^4 leukocytes) in the group of healthy newborns: 26 girls (F) and 26 boys (M)

Note. Minimum, first quartile; median, third quartile and maximum are depicted in the figure.

первичного иммунодефицита также требуется определить корректные уровни отсечения — cut-off — для каждого из исследуемых маркеров. Как правило, количественные значения TREC и KREC, определенные в общей популяции населения, не имеют нормального распределения, поэтому для выбора подходящих диагностических уровней отсечения должно быть проанализировано от 5 000 до 10 000 новорожденных популяции обследуемого региона [20].

Однако скрининговые исследования на тяжелый комбинированный иммунодефицит, проводимые в настоящее время в США и странах

Европы, до сих пор не стандартизованы методологически, что приводит к значительной разнице в определении уровня cut-off между разными лабораториями [2, 31, 33, 46]. Полученные нами количественные показатели маркеров Т- и В-клеточного неогенеза (TREC и KREC) могут быть использованы в качестве «локальных» нормативных значений для новорожденных в Свердловской области, так как разработаны на основании имеющейся базы данных обследуемой популяции.

Результаты сравнительного анализа уровней TREC и KREC, полученных у детей с иммунозависимой патологией, развившейся на первом году жизни, и у новорожденных в контрольной группе, показали, что у 40% детей с клиническими признаками первичных иммунодефицитов содержание TREC и/или KREC в сухом пятне крови уже на первой неделе жизни было значительно ниже рассчитанных нами нормативных интервалов [3]. Таким образом, своевременное проведение исследований по количественной оценке TREC/KREC у новорожденных могло сыграть решающую роль в ранней диагностике ПИД у таких пациентов и тем самым предотвратить неминуемые фатальные осложнения, случившиеся на первом году их жизни.

Определение количества TREC и KREC в образцах сухих пятен крови новорожденных с разным сроком гестации

Преждевременные роды являются одной из самых значимых проблем современного здравоохранения. Показано, что количество проведенных мероприятий интенсивного терапевтического и реанимационного воздействия обратно пропорционально гестационному возрасту плода. Ежегодно в отделения интенсивной терапии детских больниц поступают до 88% детей, рожденных на сроке до 34 недель, 12% родившихся на сроке 35-37 недель и только 2,6% младенцев, родившихся в срок [25].

Младенцы, родившиеся в срок до 32 недель гестации, в большей мере подвержены различным сердечно-сосудистым, неврологическим, метаболическим и желудочно-кишечным заболеваниям, а также имеют повышенную восприимчивость к инфекциям органов дыхания и мочевыводящих путей [38, 45]. Хотя многие из этих факторов риска действительно связаны с преждевременными родами, некоторые случаи тяжелой патологии новорожденных не могут быть объяснены только физиологической незрелостью жизненно важных органов и систем. Кроме того, в дополнение к незрелости иммунной системы, недоношенные дети подвергаются по-

вышенному риску приобретения рецидивирующих бактериальных инфекций в течение первых недель жизни из-за частого назначения инвазивных процедур, таких как катетеризация сосудов, парентеральное питание или искусственная вентиляция легких [28, 40, 45].

В развитых странах уровень недоношенных новорожденных составляет от 5 до 18% с тенденцией к росту [11]. Согласно данным из отчета областной службы охраны здоровья матери и ребенка, в Свердловской области за 5 лет (2010-2015 гг.) количество детей, родившихся при сроке гестации 22-36 недель, увеличилось с 5,9% до 7,2%.

Тенденция к увеличению доли детей, родившихся с низкой и экстремально низкой массой тела, создает дополнительные трудности в области неонатологии и педиатрии в целом и предъявляет определенные требования к осуществлению Программ неонатального скрининга в частности, поскольку зачастую требует пересмотра пороговых уровней биохимических маркеров и использования дополнительного (ретестового) исследования для данной категории новорожденных.

Более высокая частота аномальных результатов количества TREC у недоношенных новорожденных отмечается во многих исследованиях [16, 20, 32, 48]. В этом контексте незрелость иммунной системы как фактор, имеющий временный эффект, обусловленный гестационным возрастом, трудно отделим от специфических факторов, связанных с состоянием здоровья недоношенных новорожденных. Эти факторы могут включать в себя врожденные аномалии, инфекционные, эндокринологические осложнения и нарушения обмена веществ, которые также могут приводить к нарушениям функции тимуса и, как следствие, к снижению числа тимических мигрантов в периферической крови [15, 20]. Поэтому крайне важно найти алгоритм уточнения дефектных механизмов, лежащих в основе иммунных реакций у новорожденных, который будет способствовать раннему распознаванию пациентов с врожденной иммунной недостаточностью.

В отличие от многочисленных упоминаний о низких уровнях TREC среди недоношенных, данные о диапазоне значений KREC в этой группе в литературе представлены весьма незначительно [24].

С целью исследования влияния гестационного возраста плода на количество маркеров Т- и В-клеточного неогенеза (TREC и KREC) мы провели исследования данных маркеров среди групп новорожденных с разным сроком гестации: до 25-ти недель (n = 13), в 27-28 недель (n = 11), 30-32 недели (n = 15), 35-36 недель (n = 16).

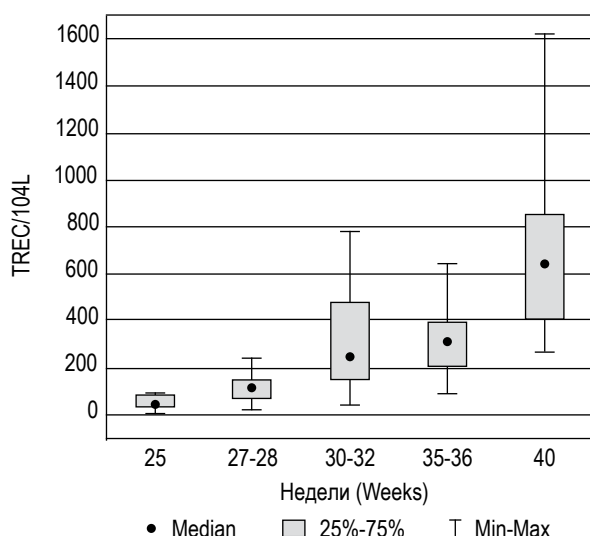


Рисунок 3. Значения TREC (копий/10⁴L) у новорожденных с разным гестационным возрастом
Примечание. На диаграмме для каждой группы отображены: медиана, квартильный размах (Q_{0,25}-Q_{0,75}), размах (минимум, максимум) переменной.

Figure 3. TREC data from premature infants in groups at different gestational age (< 25, 27-28, 30-32, 35-36 weeks) and full-term infants (40 weeks [p = 0.001, Mann-Whitney test])
Note. TREC concentration (copies per 10⁴ leucocytes) is represented in box plot showing median, Q_{0,25}-Q_{0,75}, minimal and maximal values.

Как и следовало ожидать, уровни TREC и KREC последовательно возрастали с увеличением срока гестации, однако динамика данных изменений концентрации маркеров оказалась различной, что, по нашему мнению, соответствовало динамике созревания самих Т- и В-лимфоцитов в антенатальном периоде.

Известно, что концентрация В-клеток значительно возрастает в системе кровообращения плода с середины второго триместра беременности и остается на высоком уровне в течение всего третьего триместра, заметно снижаясь перед самым рождением [29]. Прирост концентрации Т-клеток в тимусе в конце второго и особенно третьего триместра беременности заметно отстает по срокам от созревания В-клеток, почти полностью завершающегося к 30-й неделе [24, 38]. Отражением данных процессов созревания Т- и В-лимфоцитов явилось изменение определяемых уровней TREC и KREC. Так, количество копий TREC заметно возрастало с увеличением гестационного возраста: 47,3 (23-25 недель), 114,6 (27-28 недель), 243,5 (30-32 недели), 312,8 (35-36 недель) копий/10⁴L (здесь и далее указаны значения медиан), оставаясь достоверно ниже нормативных значений TREC (469,0 копий/10⁴L) у всех недоношенных детей с 24 по 36 недели гестации (критерий Манна-Уитни, p = 0,001)

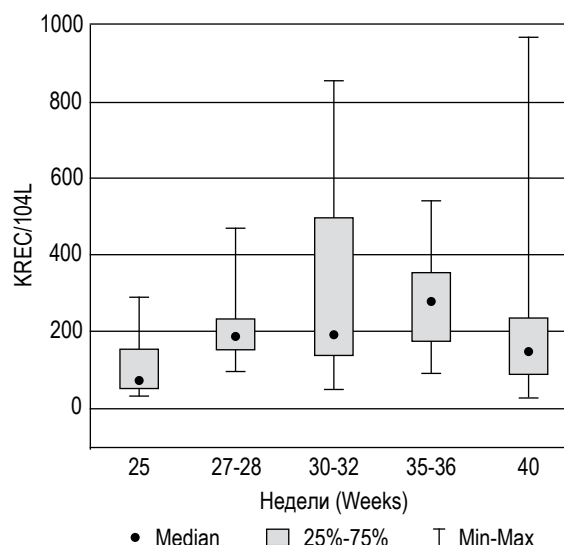


Рисунок 4. Значения KREC (копий/10⁴L) у новорожденных с разным гестационным возрастом (p = 0,001, тест Манна-Уитни)

Примечание. На диаграмме для каждой группы отображены: медиана, квартильный размах (Q_{0,25}-Q_{0,75}), размах (минимум, максимум) переменной.

Figure 4. KREC data from premature infants in groups at different gestational age (< 25, 27-28, 30-32, 35-36 weeks) and full-term infants (40 weeks [p = 0.001, Mann-Whitney test])
Note. KREC concentration (copies per 10⁴ leucocytes) is represented in box plot showing median, Q_{0,25}-Q_{0,75}, minimal and maximal values.

(рис. 3). Наиболее выраженный прирост концентрации Т-клеток наблюдался на протяжении третьего триместра беременности, что еще раз подтверждает данные о том, что последние недели внутриутробной жизни являются критическим кульминационным периодом для созревания иммунной системы плода [23, 24, 49].

Известно, что процесс созревания и дифференцировки лимфоцитов в тимусе заметно отстает по срокам от созревания В-клеток в костном мозге [30], поэтому у недоношенных детей нередко регистрируются низкие уровни маркера Т-клеточного неогенеза (TREC) при «нормальных» уровнях KREC [24]. В-клетки, впервые регистрируемые в печени плода с 8-й недели гестации, на 13-й неделе заселяют костный мозг, который к середине срока гестации становится преобладающим местом В-клеточного развития, а с 30-й недели остается единственным органом, поставляющим в кровь зрелые В-лимфоциты [38]. Концентрация В-клеток значительно возрастает в системе кровообращения плода с середины второго триместра беременности и остается на высоком уровне в течение всего третьего триместра, снижаясь перед самым рождением [29].

Поскольку эксцизионные кольца В-клеточного рецептора являются суррогатным маркером В-клеточного неогенеза, логично предполо-

жить, что динамика изменения количества копий KREC будет соответствовать динамике созревания самих В-лимфоцитов.

В нашем исследовании количество копий KREC у недоношенных достоверно возрастало в период с 22-й по 28-ю недели гестации: 72,4 (23-25 недель), 191,1 (27-28 недель), 187,8 (30-32 недели), 269,0 (35-36 недель) (критерий Манна-Уитни, $p = 0,01$) и после 28-й недели даже превысило уровень KREC доношенных новорожденных (147,3 копий/ 10^4 L) (рис. 4.).

Вполне вероятно, что это связано с усиленной пролиферацией В-клеточного пула лимфоцитов (как известно, количество KREC при этом не увеличивается) и процессом перераспределения В-клеток в организме ребенка, необходимым для выполнения адаптационных механизмов поддержания гомеостаза в меняющихся условиях окружающей среды. Таким образом, количество копий KREC, полученное в сухом пятне крови новорожденного со сроком гестации старше 28 недель, не ниже рассчитанных нормативных значений, служит своего рода сигналом адекватного (правильного) прохождения процесса созревания В-клеток в костном мозге и не требует взятия повторного образца для исследования данного маркера по достижении ребенком 37 недель («возраста доношенности»).

Однако, поскольку в качестве теста для программы неонатального скрининга на ТКИН предлагается использовать мультиплексную методику, т.е. одновременное исследование в сухом пятне крови сразу двух маркеров (TREC и KREC), оптимальный срок выполнения такого тестирования будет определяться маркером, для которого свойственно более позднее появление в системе кровообращения плода. В данном случае таковым является TREC.

Это означает, что рекомендуемый срок взятия образца крови для скрининга на ТКИН должен быть не ранее 37 недель гестации, поскольку именно в этом возрасте гарантировано получение наиболее информативных данных о состоянии иммунной системы ребенка. В этом контексте тестирование на ТКИН полностью соответствует срокам взятия образцов, принятым для большинства наследственных скринируемых заболеваний.

Однако необходимо учитывать, что полное отсутствие TREC или KREC в образце крови новорожденного любой степени недоношенности (при валидном количестве копий контрольного гена) должно служить сигналом для незамедлительного назначения этому ребенку консультации врача-иммунолога и проведения углубленного иммунологического обследования, поскольку именно этот факт (отсутствие маркеров наивных Т- и В-клеток) может явиться первым прогно-

стическим признаком фатального заболевания. Четкий алгоритм диагностики (ретестовое определение TREC и KREC в сухом пятне крови, УЗИ тимуса, иммунофенотипирование лимфоцитов, измерение уровней сывороточных иммуноглобулинов и др. иммунологических параметров) будет способствовать повышению уровня диагностического процесса в каждом конкретном случае и установлению истинной причины тяжелого состояния недоношенного ребенка с тяжелой лимфопенией, прогрессированием воспалительного процесса, нарастанием полиорганной недостаточности или другой иммунозависимой патологии, что было подтверждено в наших дальнейших исследованиях (неопубликованные данные).

Последующая молекулярно-генетическая верификация диагноза ПИД будет иметь значение для семейного анамнеза, поскольку знание о наследовании иммунодефицитного заболевания в семье позволит вести следующую беременность женщины с обязательным наблюдением у иммунолога и направлением на медико-генетическое консультирование.

Заключение

Как известно, клинические признаки иммунодефицитного состояния не всегда убедительно подтверждаются результатами стандартных иммунологических методов лабораторного анализа. Для дифференциации диагноза во многих случаях требуется проведение дорогостоящих специализированных иммунологических тестов: иммунофенотипирование, определение цитокинового профиля, определение химеризма лимфоцитов и др.

Напротив, предлагаемый метод генетического тестирования новорожденных на ТКИН и другие формы ПИД путем простого пятночного теста на TREC и KREC в первые дни жизни может значительно облегчить алгоритм обследования детей с подозрением на первичный иммунодефицит и другие формы иммунозависимой патологии, поскольку позволит формировать среди новорожденных группу риска по данным заболеваниям и заметно ускорять время постановки корректного диагноза в каждом конкретном случае. Однако для выбора корректных диагностических уровней отсечения необходимы дополнительные исследования на большей выборке (от 5 000 до 10 000 новорожденных популяции обследуемого региона) с последующей валидацией полученных референсных границ в исследованиях с включением больных с разными формами первичных иммунодефицитов.

Список литературы / References

1. Валиуллина А.Я., Ахмадеева Э.Н., Крывкина Н.Н. Проблемы и перспективы успешного выхаживания и реабилитации детей, родившихся с низкой и экстремально низкой массой тела // Вестник современной клинической медицины, 2013. Т. 6, № 1. С. 34-41. [Valiullina A.Ya., Akhmadeeva E.N., Kryvkina N.N. Problems and prospects for successful nursing and rehabilitation of newborns with low and extremely low body weight. *Vestnik sovremennoy klinicheskoy meditsiny* = *Bulletin of Modern Clinical Medicine*, 2013, Vol. 6, no. 1, pp. 34-41. (In Russ.)]
2. Гордукова М.А., Оскорбин И.П., Мишукова О.В., Зимин С.Б., Зиновьева Н.В., Давыдова Н.В., Смирнова А.С., Никитина И.А., Корсунский И.А., Филипенко М.Л., Протеус А.П. Разработка набора реагентов для количественного определения молекул ДНК TREC и KREC в цельной крови и сухих пятнах крови методом мультиплексной ПЦР в режиме реального времени // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 5. С. 467-478. [Gordukova M.A., Oskorbin I.P., Mishukova O.V., Zimin S.B., Zinovieva N.V., Davydova N.V., Smirnova A.S., Nikitina I.A., Korsunsky I.A., Filipenko M.L., Prodeus A.P. Development of real-time multiplex pcr for the quantitative determination of TREC's and KREC's In whole blood and in dried blood spots. *Meditsinskaya immunologiya* = *Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 5, pp. 467-478. (In Russ.) doi:10.15789/1563-0625-2015-5-467-478.
3. Дерябина С.С., Тузанкина И.А., Власова Е.В., Шершневу В.Н. Количественная оценка кольцевых структур TREC и KREC у детей с нарушениями функции иммунной системы на первом году жизни // Медицинская генетика, 2015. № 2. С. 53-54. [Deryabina S.S., Tuzankina I.A., Vlasova E.V., Shershnev V.N. Quantitative assessment of TREC and KREC for children with impaired function of their immune system in the first year of life. *Meditsinskaya genetika* = *Medical Genetics*, 2015, no. 2, pp. 53-54. (In Russ.)]
4. Донецкова А.Д., Ярилин А.А. Т-рецепторные эксцизионные кольца и значимость их определения в клинике // Иммунология, 2013. Т. 34, № 4. С. 220-226. [Donetskova A.D., Yarilin A.A. T-receptor excision circles and the significance of their determination in the clinic. *Immunologiya* = *Immunology*, 2013, Vol. 34, no. 4, pp. 220-226. (In Russ.)]
5. Кузьменко Н.Б., Варламова Т.В., Мерсиянова И.В. Молекулярно-генетическая диагностика первичных иммунодефицитных состояний: (обзор лит. и собств. клин. наблюдения) // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2016. № 1. С. 10-16. [Kuzmenko N.B., Varlamova T.V., Mersiyanova I.V. Molecular genetic diagnosis of primary immunodeficiencies (Review of literature and clinical case reports). *Voprosy gematologii/onkologii i immunopatologii v pediatrii* = *Questions of Hematology/Oncology and Immunopathology in Pediatrics*, 2016, no. 1, pp. 10-16. (In Russ.)]
6. Латышева Е.А. Первичные иммунодефициты: состояние проблемы на сегодняшний день: Jmf-центры в России // Вопросы современной педиатрии, 2013. Т. 12, № 6. С. 73-77. Latysheva E.A. Primary immunodeficiency: status of a problem today. Russian network of Jmf-centers. *Voprosy sovremennoy pediatrii* = *Current Pediatrics*, 2013, Vol. 12, no. 6, pp. 73-77. (In Russ.)]
7. Литвицкий П.Ф., Синельникова Т.Г. Врожденный иммунитет: механизмы реализации и патологические синдромы: ч. 2. // Вопросы современной педиатрии, 2009. Т. 8, № 2. С. 59-67. [Litvitsky P., Sinelnikova T. Inborn immunity: mechanisms of realization and pathological syndromes. *Voprosy sovremennoy pediatrii* = *Current Pediatrics*, 2009, Vol. 8, no. 2, pp. 52-58. (In Russ.)]
8. О совершенствовании массового обследования новорожденных детей на наследственные заболевания на территории Свердловской области: приказ Минздрава Свердл. обл. № 166-П от 02.03.2012: [Электронный ресурс] // Электронный фонд правовой и нормативно-технической документации: <http://docs.cntd.ru/document/412369518> (дата обращения: 28.04.15). [On the improvement of the mass newborn screening for hereditary diseases in the Sverdlovsk region: the law of Health of the Sverdlovsk region No. 166-P of 02/03/2012: [URL] // Electronic Fund of legal and normative-technical documentation. Access mode: <http://docs.cntd.ru/document/412369518> (date of access: 2015, April 28).
9. Овсянников Д.Ю., Илларионова Т.Ю., Пушко Л.В., Кузьменко Л.Г. Часто болеющие дети: что еще кроме инфекций? // Вопросы современной педиатрии, 2013. Т. 12, № 1. С. 74-86. [Ovsyannikov D.Yu., Illarionova T.Yu., Pushko L.V., Kuz'menko L.G. Frequently ill children: what else besides infections? *Voprosy sovremennoy pediatrii* = *Current Pediatrics*, 2013, Vol. 12, no. 1, pp. 74-86. (In Russ.)]
10. Парахонский, А.П. Пути и трудности развития клинической иммунологии // Современные наукоемкие технологии, 2010. № 10. С. 71-75. [Parakhonsky A.P. Ways and difficulties of the clinical immunology development. *Sovremennyye naukoemkie tekhnologii* = *Modern Science-Intensive Technologies*, 2010, no. 10, pp. 71-75. (In Russ.)]
11. Совершенствование практических подходов в акушерстве и фетальной медицине: информационный бюллетень: рек. Междунар. федерации акушеров-гинекологов (FIGO) 2015 года / под ред. В.Е. Радзинского. М.: Редакция журнала StatusPraesens, 2015. 8 с. [Recommendations of the International Federation of Obstetricians and Gynecologists (FIGO) 2015. Perfection of practical approaches in obstetrics and fetal medicine. Information Bulletin (Ed. V.E. Radzinsky)]. Moscow: Editorial office of the journal StatusPraesens, 2015. 8 p.

12. Стеганцева М.В., Кустанович А.М., Шарапова С.О., Определение кольцевых структур ДНК Т-клеточного (TREC) и В-клеточного (KREC) рецептора как маркера эффективности функционирования иммунной системы // Актуальные вопросы детской онкологии, гематологии и иммунологии: сб. науч. тр. Минск, 2012. С. 206-214. [Stegantseva M.V., Kustanovich A.M., Sharapova S.O. Determination of T-cell (TREC) and B-cell (KREC) receptor excision circles as a markers for the effectiveness of the immune system functioning. *Aktual'nye voprosy detskoy onkologii, gematologii i immunologii: sbornik nauchnykh trudov* = *Actual Questions of Pediatric Oncology, Hematology and Immunology: a Collection of Scientific Papers*, Minsk, 2012, pp. 206-214. (In Russ.)]
13. Тузанкина И.А. К вопросу диагностики иммунопатологии // Медицинская иммунология, 2010. Т. 12, № 6. С. 485-496. [Tuzankina I.A. About problem of immunopathology's diagnostics. *Meditsinskaya immunologiya* = *Medical Immunology (Russia)*, 2010, Vol. 12, no. 6, pp. 485-496. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2010-6-485-496.
14. Щербина А.Ю. Маски первичных иммунодефицитных состояний: проблемы диагностики и терапии // Российский журнал детской гематологии и онкологии, 2016. Т. 3, № 1. С. 52-58. [Shcherbina A.Yu. Masks of primary immunodeficiency disorders: diagnostic and therapeutic problems. *Rossiyskiy zhurnal detskoy gematologii i onkologii* = *Russian Journal of Children Hematology and Oncology*, 2016, Vol. 3, no. 1, pp. 52-58. (In Russ.)]
15. Accetta D.J. Cause of death in neonates with inconclusive or abnormal T-cell receptor excision circle assays on newborn screening. *J. Clin. Immunol.*, 2011, Vol. 31, no. 6, pp. 962-967.
16. Adams S.P., Rashid S., Premachandra T., Harvey K., Ifederu A., Wilson M.C., Gaspar H.B. Screening of neonatal UK dried blood spots using a duplex TREC screening assay. *J. Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 34, no. 3, pp. 323-330.
17. Adkins B., Leclerc C., Marshall-Clarke S. Neonatal adaptive immunity comes of age. *Nature Reviews Immunology*, 2004, Vol. 4, no. 7, pp. 553-564.
18. Arkwright P.D., Gennery A.R. Ten warning signs of primary immunodeficiency: a new paradigm is needed for the 21st century. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2011, Vol. 123, no. 8, pp. 7-14.
19. Audrain M., Thomas C., Mirallie S., Bourgeois N., Sebille V., Rabetrano H., Durand-Zaleski I., Boisson R., Persyn M., Pierres C., Mahlaoui N., Fischer A. Evaluation of the T-cell receptor excision circle assay performances for severe combined immunodeficiency neonatal screening on Guthrie cards in a French single centre study. *Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 150, no. 2, pp. 137-139.
20. Borte S., von Döbeln U., Fasth A., Wang N., Janzi M., Winiarski J., Sack U., Pan-Hammarström Q., Borte M., Hammarström L. Neonatal screening for severe primary immunodeficiency diseases using high-throughput triplex real-time PCR. *Blood*, 2012, Vol. 119, no. 11, pp. 2552-2555.
21. Chapel H., Prevot J., Gaspar H.B., Español T., Bonilla F.A., Solis L., Drabwell J. Primary immune deficiencies – principles of care. *Frontiers in Immunology*, 2014, Vol. 5, no. 627, pp. 1-15.
22. Chiarini M., Zanotti C., Serana F., Sottini A., Bertoli D., Caimi L., Imberti L. T-cell receptor and K-deleting recombination excision circles in newborn screening of T- and B-cell defects: review of the literature and future challenges. *Journal of Public Health Research*, 2013, Vol. 2, no. 1, pp. 9-16.
23. Clapp D.W. Developmental regulation of the immune system. *Semin. Perinatol.*, 2006, Vol. 30, no. 2, pp. 69-72.
24. de Felipe B., Olbrich P., Lucenas J.M. Prospective neonatal screening for severe T- and B-lymphocyte deficiencies in Seville. *Pediatr. Allergy Immunol.*, 2016, Vol. 27, no. 1, pp. 70-77.
25. Escobar G.J., Greene J.D., Hulac P., Kincannon E., Bischoff K., Gardner M.N., Armstrong M.A., France E.K. Rehospitalization after birth hospitalization: patterns among infants of all gestations. *Arch. Dis. Child*, 2005, Vol. 90, no. 2, pp. 125-131.
26. Geha R.S., Notarangelo L.D., Casanova J.L., Chapel H., Conley M.E., Fischer A., Hammarström L., Nonoyama S., Ochs H.D., Puck J.M., Roifman C., Seger R., Wedgwood J. Primary immunodeficiency diseases: an update from the international Union of Immunological Societies Primary immunodeficiency Diseases Classification Committee. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2007, Vol. 120, no. 4, pp. 776-794.
27. Glass H.C., Bonifacio S.L., Chau V., Glidden D., Poskitt K., Barkovich A.J., Ferriero D.M., Miller S.P. Recurrent postnatal infections are associated with progressive white matter injury in premature infants. *Pediatrics*, 2008, Vol. 122, no. 2, pp. 299-305.
28. Holt P.G., Jones C.A. The development of the immune system during pregnancy and early life. *Allergy*, 2000, Vol. 55, no. 8, pp. 688-697.
29. Huenecke S., Fryns E., Wittekindt B., Buxmann H., Königs C., Quaiser A., Fischer D., Bremm M., Klingebiel T., Koehl U., Schloesser R., Bochennek K. Percentiles of lymphocyte subsets in preterm infants according to gestational age compared to children and adolescents. *Human Immunology*, 2016, Vol. 84, no. 5, pp. 291-298.
30. Ito T., Liu Y.J., Kadowaki N. Functional diversity and plasticity of human dendritic cell subsets. *Int. J. Hematol.*, 2005, Vol. 81, no. 3, pp. 188-196.

31. Kalman L., Lindegren M.L., Kobrynski L., Vogt R., Hannon H., Howard J.T., Buckley R. Mutations in genes required for T-cell development: IL7R, CD45, IL2RG, JAK3, RAG1, RAG2, ARTEMIS, and ADA and severe combined immunodeficiency: HuGE review. *Genet. Med.*, 2004, Vol. 6, no. 1, pp. 16-26.
32. Kwan A., Abraham R.S., Currier R., Brower A., Andruszewski K., Abbott J.K., Baker M., Ballow M., Bartoshesky L.E., Bonilla F.A., Brokopp C., Brooks E., Caggana M., Celestin J., Church J.A., Comeau A.M., Connelly J.A., Cowan M.J., Cunningham-Rundles C., Dasu T., Dave N., De La Morena M.T., Duffner U., Fong C.T., Forbes L., Freedenberg D., Gelfand E.W., Hale J.E., Hanson I.C., Hay B.N., Hu D., Infante A., Johnson D., Kapoor N., Kay D.M., Kohn D.B., Lee R., Lehman H., Lin Z., Lorey F., Abdel-Mageed A., Manning A., McGhee S., Moore T.B., Naides S.J., Notarangelo L.D., Orange J.S., Pai S.Y., Porteus M., Rodriguez R., Romberg N., Routes J., Ruehle M., Rubenstein A., Saavedra-Matiz C.A., Scott G., Scott P.M., Secord E., Seroogy C., Shearer W.T., Siegel S., Silvers S.K., Stiehm E.R., Sugerman R.W., Sullivan J.L., Tanksley S., Tierce M.L. 4th, Verbsky J., Vogel B., Walker R., Walkovich K., Walter J.E., Wasserman R.L., Watson M.S., Weinberg G.A., Weiner L.B., Wood H., Yates A.B., Puck J.M., Bonagura V.R. Newborn screening for severe combined immunodeficiency in 11 screening programs in the United States. *JAMA*, 2014, Vol. 312, no. 7, pp. 729-738.
33. Kwan A., Puck J.M. History and current status of newborn screening for severe combined immunodeficiency. *Semin. Perinatol.*, 2015, Vol. 39, no. 3, pp. 194-205.
34. Nakagawa N., Imai K., Kanegane H., Sato H., Yamada M., Kondoh K., Okada S., Kobayashi M., Agematsu K., Takada H., Mitsuiki N., Oshima K., Ohara O., Suri D., Rawat A., Singh S., Pan-Hammarström Q., Hammarström L., Reichenbach J., Seger R., Ariga T., Hara T., Miyawaki T., Nonoyama S. Quantification of κ -deleting recombination excision circles in Guthrie cards for the identification of early B-cell maturation defects. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2011, Vol. 128, no. 1, pp. 223-225.
35. Nolan T., Hands R.E., Bustin S.A. Quantification of mRNA Using Real-Time RT-PCR / T. Nolan, R.E. Hands, S.A. Bustin. *Nature Protocols*, 2006, Vol. 1, no. 3, pp. 1559-1582.
36. Ou X., Zhao H., Sun H., Yang Z., Xie B., Shi Y., Wu X. Detection and quantification of the age-related sjTREC decline in human peripheral blood. *International Journal of Legal Medicine*, 2011, Vol. 125, no. 4, pp. 603-608.
37. Pérez A., Gurbindo M.D., Resino S., Aguarón A., Muñoz-Fernández MA. NK cell increase in neonates from the preterm to the full-term period of gestation. *Neonatology*, 2007, Vol. 92, no. 3, pp. 158-163.
38. Quinello C., Silveira-Lessa A.L., Ceccon M.E.J.R., Cianciarullo M.A., Carneiro-Sampaio M., Palmeira P. Phenotypic differences in leucocyte populations among healthy preterm and full-term newborns. *Scandinavian Journal of Immunology*, 2014, Vol. 80, pp. 57-70.
39. Rozmus J., Junker A., Thibodeau M.L., Grenier D., Turvey S.E., Yacoub W., Embree J., Haddad E., Langley J.M., Ramsingh R.M., Singh V.A., Long R., Schultz K.R. Severe combined immunodeficiency (SCID) in Canadian children: A national surveillance study. *J. Clin. Immunol.*, 2013, Vol. 33, no. 8, pp. 1310-1316.
40. Shane A.L., Stoll B.J. Neonatal sepsis: progress towards improved outcomes. *Journal of Infection*, 2014, Vol. 68, no. 1, pp. 24-32.
41. Sharma A.A., Jen R., Butler A., Lavoie P.M. The developing human preterm neonatal immune system: a case for more research in this area. *Clin. Immunol.*, 2012, Vol. 145, no. 1, pp. 61-68.
42. Somech R., Lev A., Simon A.J., Korn D., Garty B.Z., Amariglio N., Rechavi G., Almashanu S., Zlotogora J., Etzioni A. Newborn screening for severe T and B cell immunodeficiency in Israel: a pilot study. *Isr. Med. Assoc. J.*, 2013, Vol. 15, no. 8, pp. 404-409.
43. Sottini A., Ghidini C., Zanotti C., Chiarini M., Caimi L., Lanfranchi A., Moratto D., Porta F., Imberti L. Simultaneous quantification of recent thymic T-cell and bone marrow B-cell emigrants in patients with primary immunodeficiency undergone to stem cell transplantation. *Clin. Immunol.*, 2010, Vol. 136, no. 2, pp. 217-227.
44. Stoll B.J., Hansen N., Fanaroff A.A., Wright L.L., Carlo W.A., Ehrenkranz R.A., Lemons J.A., Donovan E.F., Stark A.R., Tyson J.E., Oh W., Bauer C.R., Korones S.B., Shankaran S., Laptook A.R., Stevenson D.K., Papile L.A., Poole W.K. Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics*, 2002, Vol. 110, no. 2, Pt 1, pp. 285-291.
45. Stoll B.J., Hansen N.I., Higgins R.D., Fanaroff A.A., Duara S., Goldberg R., Laptook A., Walsh M., Oh W., Hale E. Very low birth weight preterm infants with early onset neonatal sepsis: the predominance of gram-negative infections continues in the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network, 2002-2003. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 2005, Vol. 24, no. 7, pp. 635-639.
46. van der Spek J., Groenwold R.H., van der Burg M., van Montfrans J.M. TREC based newborn screening for severe combined immunodeficiency disease: a systematic review. *J. Clin. Immunol.*, 2015, Vol. 35, no. 4, pp. 416-430.
47. van Zelm M.C., van der Burg M., Langerak A.W., van Dongen J.J. PID comes full circle: application of V(D)J recombination excision circles in research, diagnostics and newborn screening of primary immunodeficiency disorders. *Front. Immunol.*, 2011, Vol. 2, p. 12.
48. Vogel B.H., Bonagura V., Weinberg G.A., Ballow M., Isabelle J., DiAntonio L., Parker A., Young A., Cunningham-Rundles C., Fong C.T., Celestin J., Lehman H., Rubinstein A., Siegel S., Weiner L., Saavedra-Matiz C., Kay D.M., Caggana M. Newborn screening for SCID in New York State: experience from the first two years. *J. Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 34, no. 3, pp. 289-303.

49. Wang M.L., Dorer D.J., Fleming M.P., Catlin E.A. Clinical outcomes of near-term infants. *Pediatrics*, 2004, Vol. 114, no. 2, pp. 372-376.
50. Whelan M.A., Hwan W.H., Beausoleil J., Hauck W.W., McGeedy S.J. Infants presenting with recurrent infections and low immunoglobulins: characteristics and analysis of normalization. *J. Clin. Immunol.*, 2006, Vol. 26, no. 1, pp. 7-11.
51. Yu H.H., Lee W.I., Tsai L.P., Hsu L.W., Hu M.H., Hwu W.L. Incidence of severe combined immunodeficiency through newborn screening in a Chinese population. *J. Formos Med. Assoc.*, 2015. Vol. 114, no. 1, pp. 12-16.
52. Zasada M., Kwinta P., Durlak W., Bik-Multanowski M., Madetko-Talowska A., Pietrzyk J.J. Development and Maturation of the Immune System in Preterm Neonates: Results from a Whole Genome Expression Study. *BioMed Research International*, 2014. Available at: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/498318/> (Accessed 19 February 2017).

Авторы:

Дерябина С.С. — заведующая лабораторией молекулярной диагностики ГБУЗ СО «Клинико-диагностический центр „Охрана здоровья матери и ребенка“»; младший научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук; младший научный сотрудник кафедры иммунохимии ГОАУ ВПО «Уральский федеральный университет имени Первого президента России Б.Н. Ельцина, г. Екатеринбург, Россия

Тузанкина И.А. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук; ведущий научный сотрудник кафедры иммунохимии ГОАУ ВПО «Уральский федеральный университет имени Первого президента России Б.Н. Ельцина; врач аллерголог-иммунолог научного отдела ГБУЗ СО «Областная детская клиническая больница № 1», г. Екатеринбург, Россия

Шершнева В.Н. — к.ф.-м.н., доцент, ФГБУН «Институт промышленной экологии» Уральского отделения Российской академии наук; доцент кафедры вычислительной техники, ГОАУ ВПО «Уральский федеральный университет имени Первого президента России Б.Н. Ельцина, г. Екатеринбург, Россия

Authors:

Deryabina S.S., Head, Laboratory of Molecular Diagnostics, Medical Center “Health Care of Mother and Child”; Junior Research Associate, Laboratory of Inflammation Immunology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Junior Research Associate, Department of Immunochemistry, B.N. Yeltsin Ural Federal University, Ekaterinburg, Russian Federation

Tuzankina I.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Laboratory of Inflammation Immunology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Leading Research Associate, Department of Immunochemistry, B.N. Yeltsin Ural Federal University; Clinical Allergologist/Immunologist, Research Department, Regional Children Clinical Hospital No. 1, Ekaterinburg, Russian Federation

Shershnev V.N., PhD (Physics/Mathematics), Associate Professor, Institute of Industrial Ecology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Assistant Professor, Department of Computer Science, B.N. Yeltsin Ural Federal University, Ekaterinburg, Russian Federation

Поступила 11.06.2017

Отправлена на доработку 21.06.2017

Принята к печати 13.07.2017

Received 11.06.2017

Revision received 21.06.2017

Accepted 13.07.2017