

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕФЕРЕНСНЫХ ИНТЕРВАЛОВ TREC И KREC ДЛЯ СКРИНИНГА НОВОРОЖДЕННЫХ С ИММУНОДЕФИЦИТНЫМИ СОСТОЯНИЯМИ В РФ

Гордукова М.А.¹, Корсунский И.А.¹, Чурсинова Ю.В.², Бяхова М.М.²,
Оскорбин И.П.³, Продеус А.П.^{1,4}, Филипенко М.Л.^{3,5}

¹ ГБУЗ «Детская городская клиническая больница № 9 имени Г.Н. Сперанского ДЗМ», Москва, Россия

² ГБУЗ «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского», Москва, Россия

³ ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН», г. Новосибирск, Россия

⁴ ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», г. Калининград, Россия

⁵ ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», г. Новосибирск, Россия

Резюме. В настоящей работе мы использовали популяционную выборку сухих пятен крови новорожденных на картах Гатри размером 2739 индивидуальных образцов для определения референсного интервала значений молекул ДНК TREC и KREC с целью диагностики первичных иммунодефицитных состояний в неонатальном скрининге. Медиана полученных абсолютных значений TREC и KREC составила 195 (CI95%: 185-206) и 185 (CI95%: 176-197) копий на мкл, соответственно, нормированных значений для TREC – 2780 (CI95%: 2690-2840) и для KREC – 2790 (CI95%: 2700-2900) копий на 2×10^5 копий гена альбумина или 10^5 ядросодержащих клеток. Референсный интервал рассчитывался для 99 и 99,9 перцентилей всех величин TREC и KREC. Для фильтрации «выпадающих» значений (outliers) был применен критерий Тьюки после логарифмической трансформации данных, ввиду их несимметричного распределения. При анализе абсолютных значений (TREC/KREC на мкл крови) не было идентифицировано «выпадающих» значений TREC, для KREC из дальнейшего анализа было исключено 18 значений (от 9,8 до 13,5). В нормированных значениях TREC/KREC «выбросов» не выявлено. Полученные референсные значения TREC и KREC (на уровне 0,1 перцентиля) составили 458 и 32 на 10^5 ядросодержащих клеток, 23 и 17 на мкл крови новорожденных соответственно.

Ключевые слова: первичные иммунодефициты (ПИД), Т-лимфоциты, В-лимфоциты, скрининг, TREC, KREC, новорожденные, референсные интервалы, нормы

Адрес для переписки:

Гордукова Мария Александровна
ГБУЗ «Детская городская клиническая больница № 9
имени Г.Н. Сперанского ДЗМ»
123317, Россия, Москва, Шмитовский проезд, 29.
Тел.: 8 (499) 256-21-62.
Факс: 8 (499) 256-61-27.
E-mail: ma.gordukova@dgkb-9.ru

Address for correspondence:

Gordukova Maria A.
G. Speransky Children's Hospital No. 9
123317, Russian Federation, Moscow, Shmitovsky lane, 29.
Phone: 7 (499) 256-21-62.
Fax: 7 (499) 256-61-27.
E-mail: ma.gordukova@dgkb-9.ru

Образец цитирования:

М.А. Гордукова, И.А. Корсунский, Ю.В. Чурсинова,
М.М. Бяхова, И.П. Оскорбин, А.П. Продеус,
М.Л. Филипенко «Определение референсных интервалов
TREC и KREC для скрининга новорожденных
с иммунодефицитными состояниями в РФ»
// Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 3.
С. 527-538. doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-527-538
© Гордукова М.А. и соавт., 2019

For citation:

M.A. Gordukova, I.A. Korsunsky, Yu.V. Chursinova,
M.M. Byakhova, I.P. Oscorbin, A.P. Prodeus, M.L. Filipenko
“Determining reference ranges for TREC and KREC assays
in immune deficiency screening of newborns in Russian
Federation”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 3, pp. 527-538.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-527-538
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-3-527-538

DETERMINING REFERENCE RANGES FOR TREC AND KREC ASSAYS IN IMMUNE DEFICIENCY SCREENING OF NEWBORNS IN RUSSIAN FEDERATION

Gordukova M.A.^a, Korsunsky I.A.^a, Chursinova Yu.V.^b,
Byakhova M.M.^b, Oscorbin I.P.^c, Prodeus A.P.^{a,d}, Filipenko M.L.^{c,e}

^a G. Speransky Children's Hospital No. 9, Moscow, Russian Federation

^b M. Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI), Moscow, Russian Federation

^c Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

^d Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

^e Novosibirsk State University (NSU), Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. In this work, we used a reference population of newborns and sampled dried blood spots on Guthrie cards of 2,739 individual samples to determine the reference intervals for TRECs and KRECs values, in order to diagnose primary immunodeficiency by means of neonatal screening. The median absolute values for TRECs and KRECs were 195 (CI95%: 185–206) and 185 (CI95%: 176–197) copies per μL , respectively; the normalized value for TRECs was 2780 (CI95%: 2690–2840), and for KRECs, 2790 (CI95%: 2700–2900) copies per 2×10^5 copies of the albumin gene or 10^5 cells. The reference interval was calculated for 99 and 99.9 percentiles of total TRECs and KRECs individual values. Due to asymmetric distribution of data, the outliers were filtered off, using the Tukey's criterion applied after logarithmic transformation of the data. When analyzing absolute values for TREC/KREC (per μL of blood), no “drop-down” TRECs values were identified; for KRECs, 18 experimental values were excluded from further analysis (from 9.8 to 13.5). The outlying values were not identified among the normalized values of TRECs/KRECs. The obtained reference values for TRECs and KRECs (at the 0.1 percentile level) were, respectively, 458 and 32 per 10^5 cells, or 23 and 17 per μL of blood samples from neonates.

Keywords: primary immunodeficiency (PID), T cells, B cells, screening, TREC, KREC, newborn, reference intervals

Введение

Референсные интервалы являются важной частью интерпретации результатов лабораторных исследований и представляют собой наиболее широко используемый инструмент принятия медицинских решений [23]. Концепция референсных интервалов впервые описана в 1969 году [21] и сегодня является обязательной для всех разработанных клинико-лабораторных тестов.

Для определения референсных интервалов требуется группа клинически здоровых индивидов с целью установления «нормальных» значений тестируемого аналита [19]. Этот процесс является дорогостоящим, трудоемким и сложным. Международная федерация клинической химии и лабораторной медицины (IFCC) опубликовала рекомендации по созданию и использованию лабораторных референсных интервалов [46]. Минимальная референсная группа должна быть не менее 120 человек, в которой 90 % доверительные границы референсного интервала должны определяться непараметрическими методами [23]. Значительно большие группы (до 700) должны быть исследованы в случае, если распределение значений аналита имеет значи-

тельную асимметрию и не соответствует нормальному [33].

Критерии определения клинически здорового индивидуума не всегда очевидны и могут существенно отличаться в зависимости от заболевания, специфики популяционной группы или тестируемого аналита. Например, Национальный комитет по клиническим лабораторным стандартам в США (NCCLS) рекомендует использование как априорных, так и апостериорных критериев исключения для выборки анализируемых образцов от здоровых субъектов [38]. Априорные критерии могут включать проводимые до основного исследования лабораторные анализы, на основании которых исключаются больные субъекты. Критерии апостериорного исключения применяются после отбора образцов и проведения основного исследования — определения лабораторных измерений. Субъекты, имеющие невыявленные медицинские проблемы, могут быть включены в референсную группу и давать выбросы измеряемых значений тестируемого аналита. На этом этапе стандарт NCCLS позволяет апостериорно исключить их значения, если они выявлены критерием Диксона [18], в особенности если для рас-

четов используются подходы непараметрической статистики.

Классический (априорный) подход к формированию выборки здоровой референсной популяционной группы часто не может быть применен к детям. Для них референсные группы являются труднодоступными, этические соображения ограничивают отбор проб крови у здоровых детей с целью определения референсных интервалов различных аналитов [5]. Определение референсных норм у новорожденных стоит в ряду организационно сложных задач, для которых популяционные подходы с минимальным отбором на стадии формирования выборки и дальнейшим статистическим анализом целевого аналита является методом выбора [40]. Особенно это применимо к определению референсных интервалов аналитов, используемых для диагностики редких заболеваний, для которых попадание «больных» субъектов в референсную группу имеет низкую вероятность. К такой группе заболеваний относятся первичные иммунодефицитные состояния (ПИД), которые представляют собой гетерогенную группу врожденных дефектов иммунной системы. Тяжелый комбинированный иммунодефицит (SCID, ТКИН) — это одна из форм ПИД, которая может привести к смерти ребенка без ранней терапии, а результаты терапии значительно улучшаются, если случаи заболевания диагностируются и младенцы получают лечение в течение первых нескольких месяцев жизни. Эксцизионные кольца Т-клеточного рецептора (TREC) представляют собой небольшие кольцевые молекулы эпизомальной ДНК, которые образуются во время перестройки генов Т-клеточного рецептора (TCR) в наивных Т-клетках и, таким образом, являются суррогатными маркерами для клеток — недавних эмигрантов тимуса. Скрининг на ТКИН с использованием анализа на эксцизионные кольца Т-клеточного рецептора (TREC) был введен во многих странах мира [41]. Также была описана возможность дополнительного исследования с тем же подходом с помощью эксцизионных колец каппа-делеционного элемента (KREC), позволяющая выявлять детей с тяжелыми формами ПИД, проявляющимися Т- и В-клеточной лимфопенией. Количественный анализ KREC был успешно применен для обнаружения пациентов с болезнью Брутона (Х-сцепленная агаммаглобулинемия, XLA) [12], с дефицитом аденозин деаминазы (ADA) [48], синдромом повреждения Неймегена (NBS) [12], с дефицитом пуриноклеозид-фосфорилазы (PNP) [30]. Дуплексный TREC/KREC анализ успешно использовался для скрининга пациентов с ТКИН [47, 50], атаксией телеангиэктазией (АТМ) [12, 27], синдро-

мом Вискотта—Олдрича (WAS) [11], синдромом делеции 22q11.2 или синдромом Ди Джоржи [16, 20, 32] и трисомией по 21-й хромосоме [54].

Ранее нами была разработана мультиплексная ПЦР в режиме реального времени для количественного анализа молекул ДНК TREC и KREC [1]. В настоящей работе мы использовали популяционную выборку сухих пятен крови новорожденных на картах Гатри с минимальными критериями исключения для определения референсного интервала значений молекул ДНК TREC и KREC с дальнейшей целью диагностики первичных иммунодефицитных состояний в неонатальном скрининге.

Материалы и методы

Сухие пятна крови на картах Гатри были получены из ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского (заведующая лабораторией С.Г. Калининкова, директор Д.Ю. Семенов). Карты были собраны в ходе стандартной программы скрининга новорожденных [4]. Сбор пяточной крови от новорожденных детей осуществлялся на специальные фильтровальные бумажные тест-бланки — карты Гатри — на 4-5 день жизни ребенка.

Критерии исключения: недоношенность (срок гестации менее 37 недель), количество копий гена *ALB* (гена сывороточного альбумина, присутствующего в гаплоидном геноме в единичной копии) менее 10^5 на мл цельной крови.

Экстракцию ДНК проводили с помощью комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» (ЦНИИ Эпидемиологии, Москва) с удлинением времени инкубации с лизирующим раствором до 45 минут и переносом жидкой фазы в отдельную пробирку с раствором для преципитации для того, чтобы избежать ингибирования ПЦР бумагой. Полученный препарат ДНК растворяли в 50 мкл буфера.

Количество молекул ДНК TREC и KREC определяли с помощью ПЦР в режиме реального времени и набора реагентов «БиТ-тест» (ООО «АБВ-ТЕСТ», Москва) на приборах CFX96 (Bio-Rad, США) и Rotor-Gene 3000 (Corbett Research) согласно инструкции производителя. Нормированные значения TREC и KREC рассчитывали на 10^5 ядросодержащих клеток (лейкоцитов) с учетом внутреннего контроля *ALB* по формуле: кол-во TREC (KREC) = (кол-во копий TREC (KREC) на мл/кол-во копий *ALB*)*200000.

Статистическая обработка данных

Анализ нормальности распределения значений молекул ДНК TREC и KREC проводили с помощью теста Д’Агостино—Пирсона [15]. Построение 99 и 99,9% «левосторонних»

(референсное нижнее значение аналита) референсных интервалов выполняли с помощью непараметрического метода определения перцентилей [24] с помощью программного обеспечения MedCalc v. 11.

Результаты

Международная федерация клинической химии и лабораторной медицины (IFCC) рекомендует использовать для оценки референсных значений аналита по меньшей мере 120 субъектов. В нашем исследовании мы использовали значительно большую выборку (2739 индивидуальных образцов пятен крови на картах Гатри), что было обусловлено анализом предварительных данных, показывающих несимметричное распределение значений TREC и KREC.

С помощью количественной ПЦР в режиме реального времени (кПЦР-РВ) нами определено количество молекул ДНК TREC и KREC, а также гена альбумина, маркирующего количество ядро-

содержащих клеток в образце сухого пятна крови. В основном до настоящего времени большая часть исследователей проводила нормировку количества значений TREC и реже KREC (которые просто хуже изучены и пока реже использовались для скрининга ПИД) к 1 мкл крови на карте Гатри.

Мы провели дополнительное уточнение соответствия объема крови площади пятна на картах Гатри (Whatman 903™). В результате анализа площади сухого пятна крови, полученного нанесением 25 мкл свежей периферической крови пациентов возрастом от 1 до 12 месяцев, было выяснено, что 2 мм² соответствуют примерно 1 мкл крови (коэффициент вариации не превышал 10%). Площадь кружка диаметром 3,2 мм равна 7 мм². Таким образом, в одном анализируемом образце, состоящем из трех пятен, в среднем содержится около 10,5 мкл крови. В процессе выделения осадок ДНК растворяли в 50 мкл буфера и использовали 10 мкл для проведения кПЦР-РВ, что соответствует анализу около 2 мкл крови.

ТАБЛИЦА 1. ОПИСАТЕЛЬНАЯ СТАТИСТИКА ЗНАЧЕНИЙ TREC И KREC В ИССЛЕДУЕМОЙ ВЫБОРКЕ ДНК СУХИХ ПЯТЕН И НИЖНИЕ РЕФЕРЕНСНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ ДЛЯ 1 И 0,1 ПЕРЦЕНТИЛЯ

TABLE 1. DESCRIPTIVE STATISTICS OF TREC AND KREC VALUES IN THE STUDIED DRY SPOTS DNA SAMPLES AND LOWER REFERENCE VALUES OF ONE AND 0.1 PERCENTILES.

	TREC (норма) TREC (normalized)	KREC (норма) KREC (normalized)	TREC на 1 мкл TREC per mkl	KREC на 1 мкл KREC per mkl
Наименьшее значение Minimum	389	29	20	17
Наибольшее значение Maximum	25700	37900	2260	3265
Среднее Mean	3103	3485	290	289
Медиана Median	2780	2790	195	185
95% CI для медианы 95% CI for median	2690-2840	2700-2900	185-206	176-197
Коэффициент асимметрии Skewness	2,00 (p < 0,0001)	3,04 (p < 0,0001)	2,00 (p < 0,0001)	2,56 (p < 0,0001)
Тест на нормальное распределение D'Agostino-Pearson test	Нет Not p < 0,0001	Нет Not p < 0,0001	Нет Not p < 0,0001	Нет Not p < 0,0001
Нижняя граница (99% референсный интервал) Low values (99% reference interval)	733	162	26	26
Нижняя граница (99,9% референсный интервал) Low values (99,9% reference interval)	458	32	23	17

На основании этих рассуждений нами были рассчитаны абсолютные значения концентрации ДНК TREC и KREC на 1 мкл крови новорожденных. Медиана полученных значений составила 195 (CI95%: 185–206) и 185 (CI95%: 176–197) копий на мкл, соответственно (табл. 1). Диаграмма рассеивания полученных значений TREC и KREC приведена на рисунке 1, диаграммы распределений – на рисунке 2. Нормированные значения TREC и KREC рассчитывали на 10^5 ядросодержащих клеток (лейкоцитов) с учетом внутреннего контроля *ALB*. Медиана полученных нормированных значений составила для TREC 2780 (CI95%: 2690–2840) и для KREC – 2790 (CI95%: 2700–2900) копий на 2×10^5 копий гена альбумина или 10^5 ядросодержащих клеток (табл. 1).

Определение референсных интервалов молекул TREC и KREC было выполнено на основе анализа ДНК из сухих пятен крови на рутинно собранных картах Гатри от новорожденных, представляющих собой популяционную группу, из которой были удалены образцы, полученные от недоношенных детей (срок гестации менее 37 недель), в соответствии с основным положением ГОСТа Р 53022.3–2008 [2]. Референсный интервал рассчитывался для 99 и 99,9 перцентилей всех величин TREC и KREC. Проверку соответствия распределения полученных значений TREC и KREC с нормальным проводили обобщенным тестом Д’Агостино–Пирсона [15] (табл. 1). Также оценивали наличие асимметрии. Ввиду того, что полученные распределения TREC и KREC отличались от нормального распределения ($p < 0,0001$), применяли непараметрический метод определения 1% и 0,1% перцентилей. Для фильтрации «выпадающих» значений (outliers) был применен критерий Тьюки [52] после логарифмической трансформации данных, ввиду их несимметричного распределения. При анализе абсолютных значений (TREC/KREC на мкл крови) не было идентифицировано «выпадающих» значений TREC, для KREC из дальнейшего анализа было исключено 18 значений (от 9,8 до 13,5). В нормированных значениях TREC/KREC «выбросов» не выявлено. Полученные референсные значения TREC и KREC приведены в таблице 1.

Обсуждение

Для использования разработанного набора реагентов «БиТ» в клинической практике, в частности для неонатального скрининга иммунодефицитных состояний, необходимо определение популяционного распределения нормальных значений TREC и KREC, которое в дальнейшем может быть использовано в качестве клинических пороговых значений нормы и патологии.

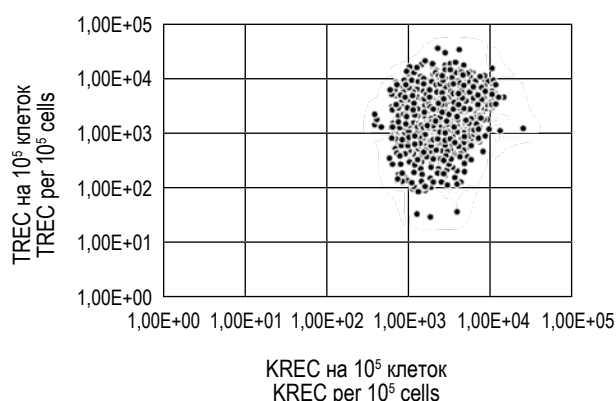
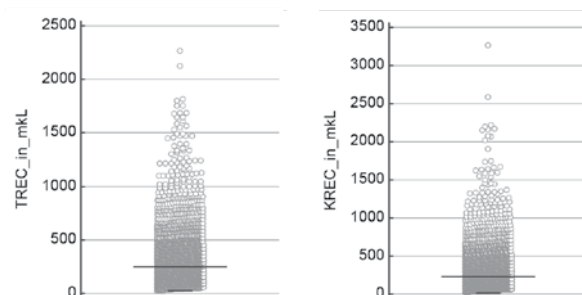


Рисунок 1. Диаграмма рассеивания нормированных значений TREC и KREC

Figure 1. Scatter diagram of the normalized values of TREC and KREC

А (А)



Б (Б)

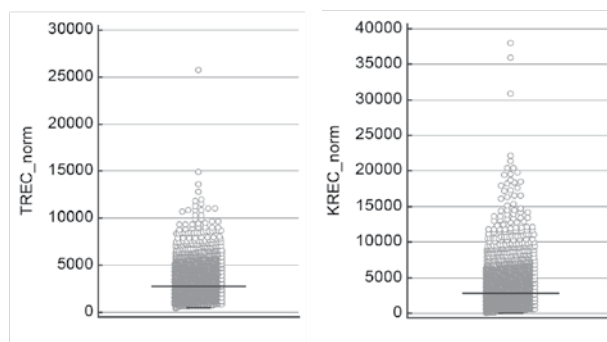


Рисунок 2. А – распределение абсолютных значений количества TREC и KREC на мкл анализируемой крови; Б – распределение нормированных значений количества TREC и KREC

Примечание. Длинная поперечная линия – медиана, короткая – значение 0,1 перцентиля для TREC и KREC на мкл крови (А) и нормированных значений TREC и KREC (Б).

Figure 2. A, distribution of the absolute values of TREC and KREC copies per μ l of blood; B, distribution of normalized TREC and KREC values

Note. The long transverse line is the median, the short line is the 0.1 percentile value for TREC and KREC per μ l of blood (A) and for the normalized values for TREC and KREC (B).

Для решения этой задачи были использованы карты Гатри (собранные в 2017-2018 годах и поступившие в ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского для проведения рутинного неонатального скрининга) для выделения ДНК и оценки нормированного на количество анализируемых ядерных клеток уровня TREC и KREC. В настоящее время для определения референсного интервала рекомендуется так называемый «прямой» подход, где субъекты отбираются из исследуемой популяции именно с этой целью и фильтруются по отсутствию целевых заболеваний [25]. В данном исследовании использован «непрямой» метод, где для определения референсных интервалов используют клинические образцы, уже собранные для скрининга, диагностики или мониторинга.

Частота ПИД варьирует от региона к региону и часто связана с наличием регистров данных заболеваний. Так, согласно Регистру Великобритании, частота ПИД составляет 6-7 случаев на 100 тыс. живых новорожденных [45], 2-4 случая/100 тыс. новорожденных согласно национальному регистру Швейцарии [36], 6,87 на 100 тыс. во Франции [35] и в целом 6 на 100 тыс. населения по европейскому региону [34]. В национальной программе скрининга на ТКИН в США к 2010 частота ТКИН составила 1 на 58 000 новорожденных [28]. Болезнь Брутона встречается с частотой 1 на 200 000 новорожденных [51]. Наиболее часто встречаемый врожденный синдром, также влияющий на количество наивных Т- и, возможно, В-клеток, синдром Ди Джоржи имеет распространенность 1:4000 [22].

Таким образом, так как встречаемость первичных иммунодефицитных состояний, при которых может наблюдаться патологически сниженный уровень TREC и KREC, в популяции не превышает 1:1000, использование неотобранной популяционной выборки пациентов оправдано (то есть без дополнительной диагностики именно здоровых детей). Этот факт также может служить основанием для вычисления референсного «левого» (нижнего) интервала на уровне 0,1 перцентиля, который был применен в нашей работе.

Большинство опубликованных к настоящему времени исследований определяют уровень TREC и KREC на мкл крови новорожденного (3 мкл крови в панче (диске) диаметром 3,2 мм или 1 мкл в панче диаметром 1,5 мм). Сравнение полученных нами абсолютных значений TREC и KREC на мкл крови, а также их нижних пограничных значений со значениями, полученными в ранее проведенных исследованиях, приведено на рисунках 3, 4, 5 и 6 (соответственно).

Полученные нами медианные значения TREC (195 копий на мкл цельной крови) наиболее близки к таковым, полученным с использованием моноплексных “in-house” тест-систем [13, 14, 26, 29, 31, 41, 44, 47]. Между тем значения TREC в исследованиях проведенных с использованием коммерческого набора Enlite™ Neonatal TREC kit (PerkinElmer, Turku, Finland), отличаются несколько меньшими значениями (96-112 копий на мкл) [6, 7, 8, 10, 42, 43].

Обращают на себя внимание низкие значения как TREC, так и KREC, полученные в работах [9, 17], выполненных с использованием коли-

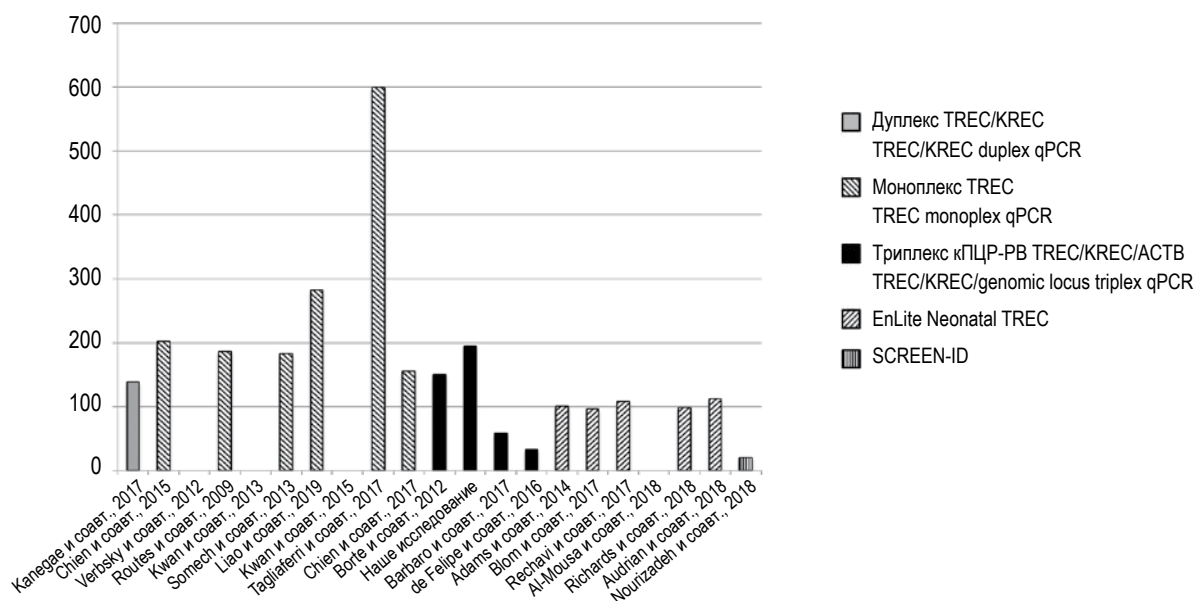


Рисунок 3. Медианы значений TREC на 1 мкл крови новорожденных

Figure 3. Median of TREC copies per 1 µl of neonatal blood

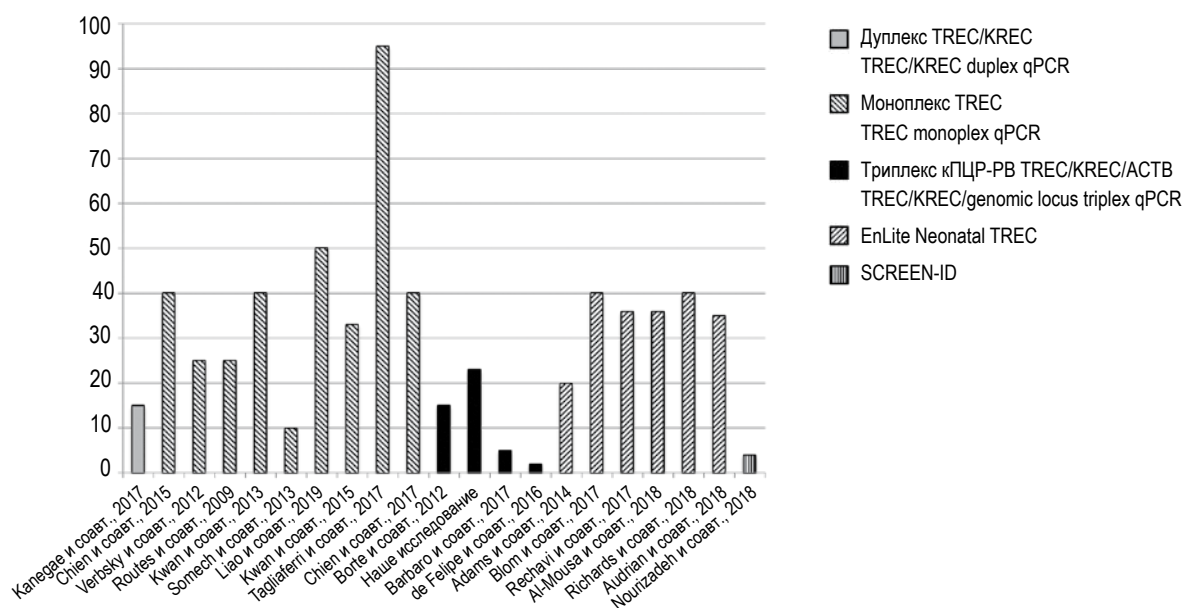


Рисунок 4. Выбранные пограничные нижние значения TREC на 1 мкл крови новорожденных

Figure 4. Cut-offs of TREC copies per 1 µl of neonatal blood

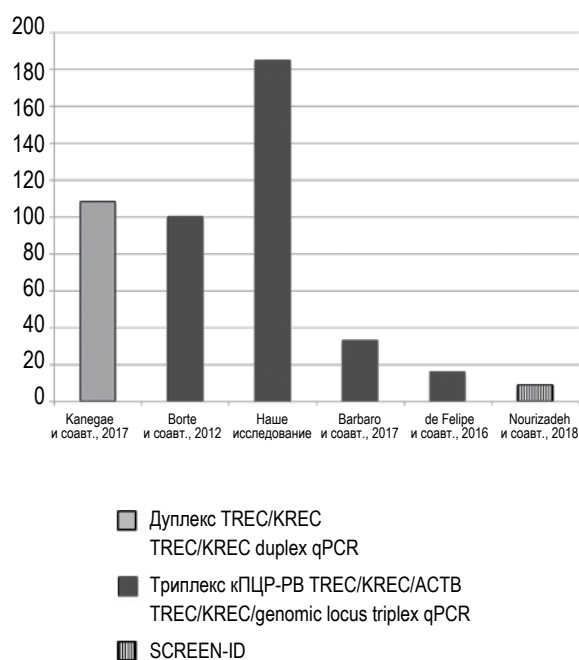


Рисунок 5. Медианы значений KREC на 1 мкл крови новорожденных

Figure 5. Median of KREC copies per 1 µl of neonatal blood

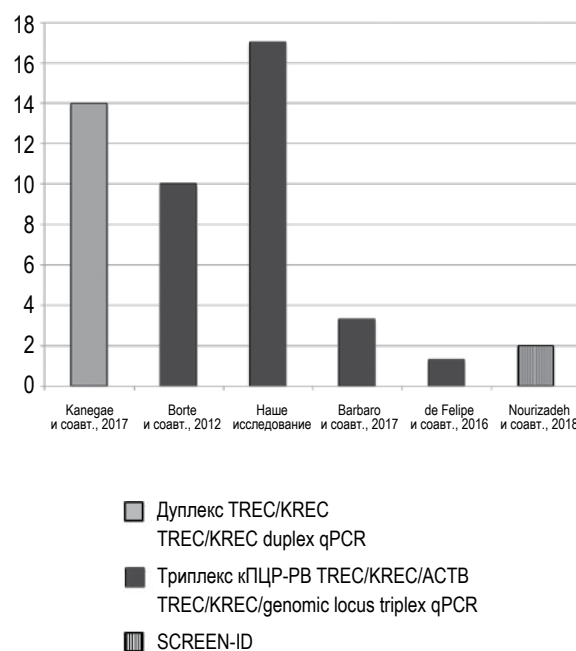


Рисунок 6. Выбранные пограничные нижние значения KREC на 1 мкл крови новорожденных

Figure 6. Cut-offs of KREC copies per 1 µl of neonatal blood

чественной триплексной ПЦР, описанной Borte и соавт. [12], а также Nourizadeh и соавт. [39], в которой также был использована триплексная ПЦР The SPOT-it™ kit, предложенная теми же автора-

ми (ImmunoID, Sweden, Stockholm). Возможное объяснение может быть связано с недостаточной эффективностью элюции ДНК из пятен крови с помощью гомогенного метода выделения без

использования сильных детергентов и хаотропных агентов. Например, в работе Nourizadeh и соавт. [39] медиана значений копий гена актина, используемого в качестве эндогенного контроля, составила 2201. В то же время один панч с диаметром 3,2 мм с 3 мкл крови должен содержать 30-60 тысяч геном-эквивалентов, в связи с тем, что в 1 мкл крови здоровых новорожденных содержится 8-15,4 тыс. лейкоцитов [37]. Кроме того, в определенной степени варибельность значений TREC и KREC при различных подходах разных авторов может быть связана с недостаточно точно определенной концентрацией калибраторов, так как в большинстве публикаций отсутствует указание на метод проверки их концентрации. В работе Somech и соавт. [47] концентрацию KREC рассчитывали по калибраторам для TREC, что не могло не повлиять на точность полученных значений.

Несмотря на то, что практически все авторы используют амплификацию однокопийного геномного локуса (например, гены альбумина, РНКазы Р или бета-актина) для контроля экстракции ДНК, среди этих исследований нет таких, в которых проводится количественная оценка этих генов для оценки эффективности (количества) выделения ДНК из карт Гатри для последующей корректировки значений TREC и KREC. В большинстве протоколов для количественного анализа TREC и KREC амплификация эндогенных контрольных локусов интерпретируется полуквантитативно: установлены лишь граничные значения по копийности или Ct, которые позволяют сделать вывод о валидности образца. Кроме того, в подавляющем числе исследований [например, 29, 44, 53] амплификацию локуса внутреннего контроля проводили отдельно в мультиплексном варианте и только в том случае, если полученное значение TREC оказывалось меньше граничного. При этом очевидно, что эффективность выделения ДНК из пятен крови может варьировать, что будет сказываться на абсолютных значениях TREC и KREC, рассчитанных на мкл крови на панч.

С целью коррекции возможных различий в количестве элюированной с карт Гатри ДНК нами была введена нормировка значений TREC и KREC на количество копий гена альбумина в образце (см. Материалы и методы). Полученные нормированные значения (см. табл. 1) демонстрируют лучшую стабильность, что может сокращать количество ретестов (данные не приведены).

Среди российских исследований на картах Гатри ранее была проведена работа Дерябиной и соавт., в которой были проанализированы образцы сухих пятен крови 26 девочек и 26 маль-

чиков, родившихся доношенными и не имевших тяжелых заболеваний, где была предпринята попытка расчета «нормальных» значений TREC и KREC с использованием RUO версии набора «БиТ-тест». Однако, в силу небольшого размера исследованной выборки, истинно референсные значения авторами не вычислялись [3].

Для расчета пограничных значений исследуемого анализата также может быть применен альтернативный подход, а именно исследование двух выборок: условно здоровых и пациентов с подтвержденным диагнозом. С помощью ROC-анализа, изменяя пограничное значение анализата (в данном случае это пограничное нижнее значение TREC или KREC), может быть рассчитано максимально возможное значение AUC (площадь под кривой), определяющее оптимальную чувствительность и специфичность анализа, и выбран оптимальный референсный порог. Данный подход доминирует в опубликованных исследованиях при расчете пограничных TREC для диагностики ТКИН. Тем временем определенные таким методом нормы не позволяют выявлять мягкие формы ПИД, а также ряд синдромов, при которых нарушается нормальная функция и количество наивных Т- или В-клеток, например синдром Ди Джоржи. Так, Катае и соавт. сообщали о возможности классификации пациентов с ОБИН (общая варибельная иммунная недостаточность) с помощью мультиплексного определения уровня KREC/TREC [25]. Им удалось разделить 40 пациентов на 4 группы (A = TREC⁺/KREC⁺, B = TREC⁺/KREC⁻, C = TREC⁻/KREC⁺, D = TREC⁻/KREC⁻) и выявить ассоциацию между тяжестью течения заболевания и уровнем KREC/TREC. Для проведения такого рода исследований референсные нижние значения при анализе KREC и TREC должны быть заданы именно нижней границей популяционных значений условно здоровых детей, а не значениями для ТКИН и агаммаглобулинемии.

Проведенное нами исследование имеет ряд очевидных ограничений. Далеко не во всех случаях нами была проведена повторная экстракция ДНК для оценки причин низких абсолютных значений (на мкл крови) KREC или TREC, в основе которых может лежать неэффективная экстракция ДНК из сухих пятен крови. Вопрос влияния метода экстракции ДНК вообще недостаточно изучен в приложении к таким малым кольцевым молекулам, как TREC или KREC, по сравнению с тотальной геномной ДНК.

Также наше исследование несколько проигрывает ввиду отсутствия панели Гатри карт с образцами крови от детей с подтвержденным в дальнейшем клиническим диагнозом ПИД

или рассматриваемых врожденных синдромов, при которых может уменьшаться количество TREC, KREC или TREC/KREC. Для полноты оценки адекватности полученных нами граничных значений KREC или TREC это является важным этапом, который должен быть пройден в ближайших работах, направленных на внедрение разработанного набора реагентов в систему неонатального скрининга ПИД в РФ.

В настоящий момент более 90% новорожденных в США проходят скрининг на ТКИН. Полученные результаты свидетельствуют, что анализ количества ДНК молекул TREC имеет чувствительность, близкую к 100%, для диагностики ТКИН и ее более мягких форм, например проявляющихся синдромом Оменна. При раннем выявлении эти дети имеют благоприятный прогноз после своевременной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток до манифестации

инфекционных заболеваний. Таким образом, полученные в настоящей работе данные способствуют развитию эффективного скрининга иммунодефицитных состояний в РФ и улучшению качества жизни пациентов с этим серьезным диагнозом.

Благодарности

Авторы публикации выражают благодарность медицинскому лабораторному технику Евгении Александровне Шершавиной за самоотверженность, проявленную на стадии экстракции большого количества образцов ДНК из карт Гатри.

Финансовая поддержка: Филипенко М.Л. и Оскорбин И.П. участвовали в представленной работе в рамках базового финансирования ИХБФМ СО РАН по Проекту базового бюджетного финансирования ПФНИ ГАН 2013-2020 № АААА-А17-117020210025-5.

Список литературы / References

1. 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.
2. ГОСТ Р 53022.3 – 2008 Национальный стандарт Российской Федерации. Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов. [GOST R 53022.3 – 2008 National Standard of Russian Federation. Clinical laboratory technologies. Requirements to the quality of clinical laboratory studies. Part 3. Rules for evaluating the clinical informativity of laboratory tests.
3. Дерябина С.С., Тузанкина И.А., Шершнева В.Н. 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. [Deryabina S.S., Tuzankina I.A., Shershnev V.N. Determination of reference values for TREC and KREC in dry blood spots of newborns from different gestation ages in Sverdlovsk Region. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018, Vol. 20, no. 1, pp. 85-98. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2018-1-85-98.
4. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 22.03.2006 N 185 «О массовом обследовании новорожденных детей на наследственные заболевания» [The Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation Order No. 185 issued 22 March 2006 on "Total screening of newborns for hereditary diseases".
5. Abdelhaleem M., Adeli K., Bamforth F., Callahan J., Chan A., Cheung Chan P., Delvin E., Dooley K., Fu L., Grey V., Kahr W., Lepage N., Lyon M., Meng Q., Potter M., Verjee Z. An editorial on behalf of the CALIPER investigators. Pediatric reference intervals: critical gap analysis and establishment of a national initiative. *Clinical Biochemistry*, 2006, Vol. 39, pp. 559-560.
6. 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, pp. 323-330.
7. Al-Mousa H., Al-Dakheel G., Jabr A., Elbadaoui F., Abouelhoda M., Baig M., Monies D., Meyer B., Hawwari A., Dasouki M. High incidence of severe combined immunodeficiency disease in Saudi Arabia detected through combined T cell receptor excision circle and next generation sequencing of newborn dried blood spots. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 782. doi: 10.3389/fimmu.2018.00782.
8. Audrain M.A.P., Léger A.J.C., Hémond C.A.F., Mirallié S.M., Cheillan D., Rimbart M.G.M., Le Thuaut A.M., Sébille-Rivain V.A., Prat A., Pinel E.M.Q., Divry E., Dert C.G.L., Fournier M.A.G., Thomas C.J.C. Newborn Screening for severe combined immunodeficiency: Analytic and clinical performance of the T cell receptor excision circle assay in France (DEPISTREC Study). *J. Clin. Immunol.*, 2018, Vol. 38, no. 7, pp. 778-786.

9. Barbaro M., Ohlsson A., Borte S., Jonsson S., Zetterström R.H., King J., Winiarski J., von Döbeln U., Hammarström L. Newborn screening for severe primary immunodeficiency diseases in Sweden – a 2-year pilot TREC and KREC screening study. *J. Clin. Immunol.*, 2017, Vol. 1, pp. 51-60.
10. Blom M., Pico-Knijnenburg I., Sijne-van Veen M., Boelen A., Bredius R.G.M., van der Burg M., Schielen P.C.J.I. An evaluation of the TREC assay with regard to the integration of SCID screening into the Dutch newborn screening program. *Clin. Immunol.*, 2017, Vol. 180, pp. 106-110.
11. Borte S., Meeths M., Liebscher I., Krist K., Nordenskjöld M., Hammarström L., von Döbeln U., Henter J.I., Bryceson Y.T. Combined newborn screening for familial hemophagocytic lymphohistiocytosis and severe T- and B-cell immunodeficiencies. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 134, no. 1, pp. 226-228.
12. 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, pp. 2552-2555.
13. Chien Y.H., Chiang S.C., Chang K.L., 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, pp. 12-16.
14. Chien Y.H., Yu H.H., Lee N.C., Ho H.C., Kao S.M., Lu M.Y., Jaing T.H., Lee W.I., Chang K.W., Shieh C.C., Chen J.S., Chiang S.C., Liu C.C., Hwu W.L. Newborn screening for severe combined immunodeficiency in Taiwan. *Int. J. Neonatal Screen.*, 2017, Vol. 3, no. 16, 12 p.
15. D'Agostino R.B., Belanger A., d'Agostino R.B. Jr. A suggestion for using powerful and informative tests of normality. *Am. Statistician*, 1990, Vol. 44, no. 4, pp. 316-321.
16. Dar N., Gothelf D., Korn D., Frisch A., Weizman A., Michaelovsky E., Carmel M., Yeshayahu Y., Dubnov-Raz G., Pessach I.M., Simon A.J., Lev A., Somech R. Thymic and bone marrow output in individuals with 22q11.2 deletion syndrome. *Pediatr Res.*, 2015, Vol. 77, no. 4, pp. 579-585.
17. de Felipe B., Olbrich P., Lucenas J.M., Delgado-Pecellin C., Pavon-Delgado A., Marquez J., Salamanca C., Soler-Palacin P., Gonzalez-Granado L.I., Antolin L.F., Borte S., Neth O. Prospective neonatal screening for severe T- and B-lymphocyte deficiencies in Seville. *Pediatr Allergy Immunol.*, 2016, Vol. 27, no. 1, pp. 70-77.
18. Dixon W.J. Processing data for outliers. *Biometrics*, 1953, Vol. 9, no. 1, pp. 74-89.
19. Ezzelle J., Rodriguez-Chavez I.R., Darden J.M., Stirewalt M., Kunwar N., Hitchcock R., Walter T., D'Souza M.P. Guidelines on good clinical laboratory practice: bridging operations between research and clinical research laboratories. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2008, Vol. 46, no. 1, pp. 18-29.
20. Froňková E., Klocperk A., Svatoň M., Nováková M., Kotrová M., Kayserová J., Kalina T., Keslová P., Votava F., Vinohradská H., Freiburger T., Mejstříková E., Trka J., Sedivá A. The TREC/KREC assay for the diagnosis and monitoring of patients with DiGeorge syndrome. *PLoS ONE*, 2014, Vol. 9, no. 12, e114514. doi: 10.1371/journal.pone.0114514.
21. Grasbeck R., Saris N.E. Establishment and use of normal values. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1969, Vol. 26, pp. 62-63.
22. Gul K.A., Øverland T., Osnes L., Baumbusch L.O., Pettersen R.D., Lima K., Abrahamsen T.G. Neonatal levels of T-cell receptor excision circles (TREC) in patients with 22q11.2 deletion syndrome and later disease features. *J. Clin. Immunol.*, 2015, Vol. 35, pp. 408-415.
23. Horn P.S., Pesce A.J. Reference intervals: an update. *Clinica Chimica Acta*, 2003, Vol. 334, iss. 1-2, pp. 5-23.
24. Horowitz G.L., Altaie S., Boyd J.C., Ceriotti F., Garg U., Horn P., Pesce A., Harrison E. Sine H.E., Zakowski J. National Committee for Clinical Laboratory Standards EP28-A3c defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory; Approved guideline. Third Edition. Vol. 28, no. 30.
25. Kamae C., Nakagawa N., Sato H., Honma K., Mitsui N., Ohara O. Common variable immunodeficiency classification by quantifying T-cell receptor and immunoglobulin κ -deleting recombination excision circles. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2013, Vol. 131, pp. 1437-1440.e5.
26. Kanegae M.P.P., Barreiros L.A., Sousa J.L., Brito M.A.S., Oliveira E.B. Jr., Soares L.P., Mazzucchelli J.T.L., Fernandes D.Q., Hadachi S.M., Holanda S.M., Guimarães F.A.T.M., Boacnin M.A.P.V.V., Pereira M.A.L., Bueno J.M.C., Grumach A.S., Gesu R.S.W.D., Santos A.M.N.D., Bellesi N., Costa-Carvalho B.T., Condino-Neto A. Screening for severe combined immunodeficiencies using trecs and krecks: second pilot study in brazil. *Rev. Paul Pediatr.*, 2017, Vol. 35, no. 1, pp. 25-32.
27. Kraus M., Lev A., Simon A.J., Levran I., Nissenkorn A., Levi Y.B., Berkun Y., Efrati O., Amariglio N., Rechavi G., Somech R. Disturbed B and T cell homeostasis and neogenesis in patients with ataxia telangiectasia. *J. Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 34, no. 5, pp. 561-572.
28. 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.

29. Kwan A., Church J.A., Cowan M.J., Agarwal R., Kapoor N., Kohn D.B., Lewis D.B., McGhee S.A., Moore T.B., Stiehm E.R., Porteus M., Aznar C.P., Currier R., Lorey F., Puck J.M. Newborn screening for severe combined immunodeficiency and T-cell lymphopenia in California: results of the first 2 years. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2013, Vol. 132, pp. 140-150.

30. Ia Marca G., Canessa C., Giocaliere E., Romano F., Malvagia S., Funghini S., Moriondo M., Valleriani C., Lippi F., Ombrone D., Della Bona M.L., Speckmann C., Borte S., Brodski N., Gennery A.R., Weinacht K., Celmeli F., Pagel J., de Martino M., Guerrini R., Wittkowski H., Santisteban I., Bali P., Ikinciogullari A., Herschfield M., Notarangelo L.D., Resti M., Azzari C. Diagnosis of immunodeficiency caused by a purine nucleoside phosphorylase defect by using tandem mass spectrometry on dried blood spots. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 134, no. 1, pp. 155-159.

31. Liao H.C., Liao C.H., Kao S.M., Chiang C.C., Chen Y.J. Detecting 22q11.2 deletion syndrome in newborns with low T Cell receptor excision circles from severe combined immunodeficiency screening. *J. Pediatr.*, 2019, Vol. 204, pp. 219-224.e1.

32. Lingman Framme J., Borte S., von Döbeln U., Hammarström L., Oskarsdóttir S. Retrospective analysis of TREC based newborn screening results and clinical phenotypes in infants with the 22q11 deletion syndrome. *J. Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 34, no. 4, pp. 514-519.

33. Linnet K. Two-stage transformations for normalization of reference distributions evaluated. *Clin. Chem.*, 1987, Vol. 33, pp. 381-386.

34. Mahlaoui N., Gathmann B., Kindle G., Ehl S., on behalf of the ESID Registry Working Party Steering Committee (Quinti I., Grimbacher B., Buckland M., Seidel M., van Montfrans J., and the ESID Society. The European Society for Immunodeficiencies (ESID) Registry: recent advancements in the epidemiology of Primary Immunodeficiencies and how does that translate in clinical care. *Rare Dis. Orph. Drugs*, 2014, Vol. 1, no. 4, Suppl. 4.

35. Mahlaoui N., Jais J.P., Brosselin P., Mignot C., Beaurain B., Brito C., Costes L., Courteille V., de Vergnes N., Alcaïa A., Fischer A.; CEREDIH Prevalence Study Collaborators. Prevalence of primary immunodeficiencies in France is underestimated. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2017, Vol. 140, no. 6, pp. 1731-1733.

36. Marschall K., Hoernes M., Bitzenhofer-Grüber M., Jandus P., Duppenhaler A., Willemin W.A., Rischewski J., Boyman O., Heininger U., Hauser T., Steiner U., Posfay-Barbe K., Seebach J., Recher M., Hess C., Helbling A., Reichenbach J.; Swiss PID Registry Working Group. The Swiss National Registry for Primary Immunodeficiencies: report on the first 6 years' activity from 2008 to 2014. *Clin. Exp. Immunol.*, 2015, Vol. 182, no. 1, pp. 45-50.

37. Mayo Foundation for Medical Education and Research, Test ID: CBC. [Electronic resource]. Access mode: <https://www.mayocliniclabs.com/test-catalog/Clinical+and+Interpretive/9109>.

38. National Committee for Clinical Laboratory Standards. NCCLS. How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory; Approved guideline. Second Edition. NCCLS document C28-A2, 2000, Vol. 20, no. 13.

39. Nourizadeh M., Shakerian L., Borte S., Fazlollahi M., Badalzadeh M., Houshmand M., Alizadeh Z., Dalili H., Rashidi-Nezhad A., Kazemnejad A., Moin M., Hammarström L., Pourpak Z. Newborn screening using TREC/KREC assay for severe T and B cell lymphopenia in Iran. *Scand. J. Immunol.*, 2018, Vol. 6, e12699. doi: 10.1111/sji.12699.

40. Poole S., Schroeder L.F., Shah N. An unsupervised learning method to identify reference intervals from a clinical database. *J. Biomed. Inform.*, 2016, Vol. 59, pp. 276-284.

41. Puck J.M. Newborn screening for severe combined immunodeficiency and T-cell lymphopenia. *Immunol. Rev.*, 2019, Vol. 287, no. 1, pp. 241-252.

42. Rechavi E., Lev A., Simon A.J., Stauber T., Daas S., Saraf-Levy T., Broides A., Nahum A., Marcus N., Hanna S., Stepensky P., Toker O., Dalal I., Etzioni A., Almashanu S., Somech R. First year of Israeli newborn screening for severe combined immunodeficiency – clinical achievements and insights. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 6, no. 8, 1448. doi: 10.3389/fimmu.2017.01448.

43. Richards S., Pitt J., Choo S. Newborn screening for severe combined immunodeficiency: Evaluation of a commercial T-cell receptor excision circle-based method in Victorian dried blood spots. *J. Paediatr. Child Health.*, 2018, Vol. 54, no. 1, pp. 14-19.

44. Routes J.M., Grossman W.J., Verbsky J., Laessig R.H., Hoffman G.L., Brokopp C.D., Baker M.W. Statewide newborn screening for severe T-cell lymphopenia. *JAMA*, 2009, Vol. 302, no. 22, pp. 2465-2470.

45. Shillitoe B., Bangs C., Guzman D., Gennery A.R., Longhurst H.J., Slatter M., Edgar D.M., Thomas M., Worth A., Huissoon A., Arkwright P.D., Jolles S., Bourne H., Alachkar H., Savic S., Kumararatne D.S., Patel S., Baxendale H., Noorani S., Yong P.F.K., Waruiru C., Pavaladurai V., Kelleher P., Herriot R., Bernatonienne J., Bhole M., Steele C., Hayman G., Richter A., Gompels M., Chopra C., Garcez T., Buckland M. The United Kingdom Primary Immune Deficiency (UKPID) registry 2012 to 2017. *Clin. Exp. Immunol.*, 2018, Vol. 192, no. 3, pp. 284-291.

46. Solberg H.E.. The IFCC recommendation on estimation of reference intervals. The RefVal program. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2004, Vol. 42, no. 7, pp. 710-714.

47. 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, pp. 404-409.

48. Speckmann C., Neumann C., Borte S., la Marca G., Sass J.O., Wiech E., Fisch P., Schwarz K., Buchholz B., Schlesier M., Felgentreff K., Grimbacher B., Santisteban I., Bali P., Herschfeld M.S., Ehl S. Delayed-onset adenosine deaminase deficiency: strategies for an early diagnosis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2012, Vol. 130, no. 4, pp. 991-994.
49. Tagliaferri L., Kunz J.B., Happich M., Esposito S., Bruckner T., Hübschmann D., Okun J.G., Hoffmann G.F., Schulz A., Kappe J., Speckmann C., Muckenthaler M.U., Kulozik A.E. Newborn screening for severe combined immunodeficiency using a novel and simplified method to measure T-cell excision circles (TREC). *Clin. Immunol.*, 2017, Vol. 175, pp. 51-55.
50. Tamura S., Higuchi K., Tamaki M., Inoue C., Awazawa R., Mitsuki N., Nakazawa Y., Mishima H., Takahashi K., Kondo O., Imai K., Morio T., Ohara O., Ogi T., Furukawa F., Inoue M., Yoshiura K., Kanazawa N. Novel compound heterozygous DNA ligase IV mutations in an adolescent with a slowly-progressing radiosensitive-severe combined immunodeficiency. *Clin. Immunol.*, 2015, Vol. 160, no. 2, pp. 255-260.
51. Taneja A., Chhabra A. Bruton Agammaglobulinemia. StatPearls [Internet], 2018. [Electronic resource]. Access mode: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK448170/>.
52. Tukey J.W. Exploratory Data Analysis. Addison Wesley, 1977.
53. Verbsky J.W., Baker M.W., Grossman W.J., Hintermeyer M., Dasu T., Bonacci B., Reddy S., Margolis D., Casper J., Gries M., Desantes K., Hoffman G.L., Brokopp C.D., Seroogy C.M., Routes J.M. Newborn screening for severe combined immunodeficiency; the Wisconsin experience (2008-2011). *J. Clin. Immunol.*, 2012, Vol. 32, pp. 82-88.
54. Verstegen R.H., Borte S., Bok L.A., van Zwieten P.H., von Döbeln U., Hammarström L., de Vries E. Impact of Down syndrome on the performance of neonatal screening assays for severe primary immunodeficiency diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 133, no. 4, pp. 1208-1211.

Авторы:

Гордукова М.А. — биолог клинической диагностической лаборатории ГБУЗ «Детская городская клиническая больница № 9 имени Г.Н. Сперанского ДЗМ», Москва, Россия

Корсунский И.А. — к.м.н., заведующий Московским городским центром детской иммунологии и аллергологии ГБУЗ «Детская городская клиническая больница № 9 имени Г.Н. Сперанского ДЗМ», Москва, Россия

Чурсинова Ю.В. — заведующая отделением организации и сопровождения клинических исследований, ассистент кафедры клинической лабораторной диагностики факультета усовершенствования врачей ГБУЗ «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского», Москва, Россия

Бяхова М.М. — к.м.н., старший научный сотрудник патологоанатомического отделения ГБУЗ «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского», Москва, Россия

Осборбин И.П. — к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории фармакогеномики ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН», г. Новосибирск, Россия

Продеус А.П. — д.м.н., профессор, заместитель главного врача по инфекционным болезням ГБУЗ «Детская городская клиническая больница № 9 имени Г.Н. Сперанского ДЗМ», Москва; профессор-консультант ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», г. Калининград, Россия

Филипенко М.Л. — к.б.н., заведующий лабораторией фармакогеномики ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН»; заведующий лабораторией молекулярной диагностики ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», г. Новосибирск, Россия

Authors:

Gordukova M.A., Clinical Biologist, Clinical Diagnostic Laboratory, G. Speransky Children's Hospital No. 9, Moscow, Russian Federation

Korsunsky I.A., PhD (Medicine), Head, Moscow City Center for Pediatric Immunology and Allergy, G. Speransky Children's Hospital No. 9, Moscow, Russian Federation

Chursinova Yu.V., Head, Department of Arrangement and Management of Clinical Studies, Assistant Professor, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Faculty of Postgraduate Education, M. Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI), Moscow, Russian Federation

Byakhova M.M., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Pathology Department, M. Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI), Moscow, Russian Federation

Oscorbin I.P., PhD (Biology), Junior Research Associate, Laboratory of Pharmacogenomics, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Prodeus A.P., PhD, MD (Medicine), Professor, Deputy Medical Director for Infectious Diseases, G. Speransky Children's Hospital No. 9, Moscow; Consulting Professor, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Filipenko M.L., PhD (Biology), Head, Laboratory of Pharmacogenomics Laboratory, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences; Head, Laboratory of Molecular Diagnostics, Novosibirsk State University (NSU), Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 01.02.2019

Отправлена на доработку 05.03.2019

Принята к печати 15.03.2019

Received 01.02.2019

Revision received 05.03.2019

Accepted 15.03.2019