

## **ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕФЕРЕНТНЫХ ИНТЕРВАЛОВ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В КРОВИ ЭКСЦИЗИОННЫХ КОЛЕЦ TREC И KREC У ЛИЦ СТАРШЕ 18 ЛЕТ**

**Сайтгалина М.А.<sup>1</sup>, Любимова Н.Е.<sup>1</sup>, Останкова Ю.В.<sup>1</sup>,  
Кузнецова Р.Н.<sup>1,2</sup>, Тотолян Арег А.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** Все большее внимание обращают на себя способы выявления первичных и вторичных Т- и/или В-клеточных иммунодефицитов, внедрение которых в лабораторную диагностику способствовало бы скорейшему выявлению иммунодефицитных состояний. В настоящее время неуклонно увеличивается количество выявленных взрослых больных с иммунодефицитами различного генеза. Поскольку пол, возраст и раса пациентов могут являться значимыми факторами состояния иммунитета, определение популяционных референтных интервалов содержания молекул TREC и KREC в периферической крови взрослой популяции для дальнейшего выявления и углубленного обследования сложных случаев как врожденных, так и приобретенных иммунодефицитных состояний является актуальной задачей современной молекулярно-генетической лабораторной диагностики. Цель — определить референтные интервалы количественного содержания фрагментов ДНК TREC и KREC в периферической крови среди взрослого населения Санкт-Петербурга.

Использовали образцы цельной крови, полученные от 717 условно здоровых добровольцев в возрасте от 18 до 108 лет в рамках программы оценки популяционного иммунитета жителей Санкт-Петербурга. Критерием исключения добровольца из исследования являлось наличие диагноза иммунодефицит любого генеза, вирусный гепатит А, В, С, ВИЧ-инфекция. Определение количественного содержания целевых фрагментов ДНК TREC и KREC проводили с использованием набора реагентов для количественного определения эксцизионных колец TREC и KREC методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени (TREC/KREC-AMP PS). Определение референтных интервалов прямым методом проводили согласно рекомендациям Международной федерации клинической химии и Государственного стандарта (ГОСТ) Р 53022.3-2008.

В рамках исследования добровольцы были разделены на шесть возрастных групп: 18-29 лет, 30-39 лет, 40-49 лет, 50-59 лет, 60-69 лет и лица старше 70 лет. Определено количественное содержание молекул TREC и KREC в каждом образце крови для всех групп. Корреляционный анализ позволил

---

### **Адрес для переписки:**

Сайтгалина Мария Александровна  
ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»  
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14.  
Тел.: 8 (981) 834-66-32.  
E-mail: Sajgalinam@mail.ru

### **Address for correspondence:**

Maria A. Saitgalina  
Saint Petersburg Pasteur Institute  
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14.  
Phone: +7 (981) 834-66-32.  
E-mail: Sajgalinam@mail.ru

---

### **Образец цитирования:**

М.А. Сайтгалина, Н.Е. Любимова, Ю.В. Останкова, Р.Н. Кузнецова, Арег А. Тотолян «Определение референтных интервалов циркулирующих в крови эксцизионных колец TREC и KREC у лиц старше 18 лет» // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 6. С. 1227-1236. doi: 10.15789/1563-0625-DOR-2587

© Сайтгалина М.А. и соавт., 2022  
Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

### **For citation:**

M.A. Saitgalina, N.E. Liubimova, Yu.V. Ostankova, R.N. Kuznetsova, Areg A. Totolian "Determination of reference values for TREC and KREC in circulating blood of the persons over 18 years", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2022, Vol. 24, no. 6, pp. 1227-1236. doi: 10.15789/1563-0625-DOR-2587

© Saitgalina M.A. et al., 2022  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License  
DOI: 10.15789/1563-0625-DOR-2587

установить отрицательную зависимость концентрации молекул TREC в образцах крови с возрастом участников исследования (коэффициент корреляции Спирмена  $r = -0,80$  ( $p$ -value  $< 0,0001$ )). Выявлены достоверные различия в уровнях TREC между разными возрастными группами. Корреляционной зависимости содержания молекул KREC в образцах крови от возраста и различий между возрастными группами не установлено. Определены референсные интервалы уровня TREC для каждой выделенной возрастной группы. Для всех групп установлен единый референсный интервал уровней молекул KREC. Определенные РИ TREC и KREC у взрослых людей значительно ниже, чем у новорожденных.

Полученные результаты, позволившие определить референсные интервалы уровней TREC и KREC для взрослых людей, будут способствовать эффективной персонифицированной лабораторной диагностике иммунодефицитных состояний различного генеза.

*Ключевые слова: иммунный статус, иммунодефицит, TREC, KREC, метод диагностики, референсный интервал*

## DETERMINATION OF REFERENCE VALUES FOR TREC AND KREC IN CIRCULATING BLOOD OF THE PERSONS OVER 18 YEARS

Saitgalina M.A.<sup>a</sup>, Liubimova N.E.<sup>a</sup>, Ostankova Yu.V.<sup>a</sup>,  
Kuznetsova R.N.<sup>a, b</sup>, Totolian Areg A.<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup> Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>b</sup> First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Abstract.** Increasing attention is being paid to methods for detecting primary and secondary T and/or B cell immunodeficiencies. Their implementation into laboratory diagnostics would contribute to the early diagnostics of immunodeficiencies. Currently, the number of identified adult patients with immunodeficiencies of various origins is steadily increasing. Age, gender and ethnicity of patients may be significant factors of immunity. Hence, determination of the population reference intervals for TREC and KREC DNA excision rings in peripheral blood of adult persons is an urgent laboratory task for in-depth examination of both congenital and acquired immunodeficiency conditions. Our purpose was to determine the reference intervals for the quantitative assay of TREC and KREC fragments in peripheral blood among the adult population of St. Petersburg.

We studied whole blood samples obtained from 717 apparently healthy volunteers aged 18 to 108 years within the program of population immunity assessment among residents of St. Petersburg. The exclusion criterion included immunodeficiency of any origin, viral hepatitis A, B, C, HIV infection. Quantitation of the target TREC and KREC DNA fragments was carried out using a set of reagents for the quantitative determination of excisional rings TREC and KREC by Real-time PCR (TREC/KREC-AMP PS). The reference intervals were determined by the direct method according to the recommendations of the International Federation of Clinical Chemistry and the Russian State Standard (GOST) R 53022.3-2008.

The volunteers were divided into six age groups: 18-29, 30-39, 40-49, 50-59, 60-69 years old, and the persons over 70. The amounts of TREC and KREC in each blood sample were determined for all age groups. Upon correlation analysis, we have revealed a negative relationship between the concentration of TREC molecules in blood samples, and the age of study participants (Spearman correlation coefficient  $r = -0.80$  ( $p$ -value  $< 0.0001$ )). Significant differences in TREC levels between different age groups were revealed. No correlations were detected between KREC contents in blood samples and age as well as any differences between age groups. Reference intervals of the TREC level were determined for each mentioned age group. A unified reference range was established for the KREC levels. The established reference intervals for TREC and KREC molecules in adults are significantly lower than in newborns.

The obtained results enable determination of reference intervals for TREC and KREC levels among adults, thus contributing to effective personalized laboratory diagnosis of immunodeficiency states of various origins.

*Keywords: immune status, immunodeficiency, TREC, KREC, diagnostic method, reference interval*

## Введение

Иммунодефицит является результатом недостаточности или отсутствия элементов иммунной системы, включая лимфоциты, фагоциты и систему комплемента [5]. Иммунодефициты представляют собой широкий спектр наследственных (первичных) и приобретенных (вторичных) состояний, характеризующихся специфическими аномалиями, затрагивающими множество гуморальных, клеточных и фагоцитарных иммунологических путей. Первичные иммунодефициты (ПИД) обусловлены генетическими дефектами, в то время как вторичные могут быть следствием развития заболевания (синдром приобретенного иммунодефицита – СПИД), вызванного инфекцией вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), а также могут быть связаны с иммуносупрессивной терапией или лечением глюкокортикоидами, например, у пациентов с онкологическими заболеваниями или после трансплантации паренхиматозных органов, стволовых клеток. Вторичные иммунодефициты могут быть следствием операций, травм, экстремальных условий окружающей среды, недоедания, что в конечном итоге неблагоприятно влияет на иммунные реакции организма и повышает риск инфекций [27].

На сегодняшний день известно более 450 форм генетически подтвержденных ПИД, среди которых выделяют заболевания с дефицитом Т-клеток, дефицитом В-клеток (преобладающая группа), комбинированным дефицитом Т- и В-клеток [25]. Клиническая тяжесть колеблется от легкой до потенциально опасной для жизни. Учитывая, что симптомы ПИД не являются специфичными, значимой проблемой данной группы заболеваний остается гиподиагностика – большинство ПИД скрыты под маской других диагнозов [22]. Данное обстоятельство приводит к несвоевременному и неадекватному лечению, а у пациентов с тяжелыми формами ПИД к 100%-ной летальности. Однако из-за разнообразия клинической картины ПИД с относительно легким течением заболевания могут оставаться не выявленными в детском возрасте. При первичном выявлении заболеваний у взрослых пациентов определяют разнообразную и преимущественно сглаженную клиническую картину, например селективный IgA-дефицит, общая вариабельная иммунная недостаточность (ОВИН), являющиеся наиболее частыми формами ПИД у лиц старше 18 лет. Согласно некоторым исследованиям, из-за задержки диагностики, ОВИН впервые может быть установлен в возрасте 35 лет и старше. Характер клинических проявлений патологии у пациентов индивидуален и отличается вариабельностью течения даже в рамках одной нозологической формы [4]. Несмотря на то,

что состояния, связанные с гипогаммаглобулинемией, можно определить после исключения, согласно возрасту, транзиторной младенческой гипогаммаглобулинемии [3]. Однако в редких случаях у взрослых пациентов могут быть выявлены более тяжелые формы ПИД, например синдром Ди Джорджи [4]. Диагностика таких ПИД, которые впервые дебютируют или выявляются в подростковом и взрослом возрасте, в основном строится на исследовании клинической картины, анамнеза и исключении вторичной причины снижения уровней сывороточных иммуноглобулинов, оценке их количества в крови и проведении проточной цитометрии для количественной оценки имеющих поверхностно-мембранные Ig субпопуляции В-лимфоцитов в периферической крови.

В связи с вышесказанным, все большее внимание обращают на себя способы выявления первичных и вторичных Т- и/или В-клеточных иммунодефицитов, внедрение которых в лабораторную диагностику способствовало бы скорейшему выявлению иммунодефицитных состояний и при этом не требовало бы дополнительного оборудования помимо рутинно используемого в лабораторной практике.

Как известно, Т- и В-лимфоциты берут свое начало в костном мозге от гемопоэтических стволовых клеток. И Т-, и В-клеточное звено характеризуются двухэтапным процессом дифференцировки, включающим антиген-независимую и антиген-зависимую фазы. В результате антиген-независимой дифференциации В-клеток в костном мозге и Т-клеток в тимусе образуются лимфоциты, несущие сформированный В- и Т-клеточный рецепторы соответственно. Изначально пул генов, кодирующих эти рецепторы, состоит из повторяющихся сегментов, принадлежащих трем классам: V (variable)-, D (diversity), J (joining), и не содержит функционально активного первого экзона, с которого могла бы осуществляться транскрипция мРНК рецептора. В ходе антиген-независимой дифференцировки происходит поэтапная перестройка указанных генов – процесс, называемый V(D)J-реаранжировкой или V(D)J-рекомбинацией. В результате часть генетического материала удаляется, а оставшиеся генные сегменты (по одному из каждого класса) соединяются вместе и формируют последовательность с функционально активным экзоном. С такой объединенной последовательности сегментов V(D)J в дальнейшем будет транскрибироваться мРНК Т-клеточного рецептора/вариабельных доменов В-клеточного рецептора или антитела [13, 14, 17]. ДНК-последовательность, которая удаляется из генома в ходе V(D)J-рекомбинации как побоч-

ный продукт, замыкается и существует в виде небольших колец эписомальной ДНК. Эти кольцевые молекулы ДНК носят название Т-клеточные рецепторные эксцизионные кольца TREC (T-cell receptor excision circles) и каппа рекомбинационные эксцизионные кольца (по названию каппа-цепи В-клеточного рецептора) KREC (Kappa-deleting recombination excision circles) [17]. Молекулы TREC и KREC являются стабильными и не деградируют в периферической крови, кроме того TREC не реплицируются с последующим делением Т-лимфоцитов. Таким образом, кольцевые ДНК-молекулы TREC и KREC являются маркерами зрелых наивных Т- и В-лимфоцитов соответственно, удачно завершивших процессы перестройки генетических кластеров своих рецепторов и недавно мигрировавших из тимуса и костного мозга [30]. Таким образом, уровни молекул TREC и KREC в периферической крови могут позволить определить иммунный статус пациента. Так, дефицит молекул TREC и KREC в периферической крови наблюдается при достаточно обширном перечне заболеваний и состояний и может служить прогностическим маркером не только для ряда первичных, но и для вторичных иммунодефицитов [28, 29, 31, 33]. Исходя из этого, при диагностически сложных случаях, затрагивающих дефицит Т- и В-клеток, информативным методом молекулярной диагностики является количественная оценка циркулирующих в кровотоке пациента кольцевых ДНК-молекул TREC и KREC. Описано применение анализа уровней TREC и KREC у взрослых пациентов с ОВИН и выявление его связи с тяжестью течения заболевания [16]. Уровни TREC достоверно снижены у взрослых больных с синдромом Ди Джорджи при нормальных уровнях KREC [9]. Показана диагностическая значимость определения уровней TREC и KREC с тяжелыми заболеваниями инфекционной природы [7, 10, 12, 18, 20].

В настоящее время неуклонно увеличивается количество выявленных взрослых больных с иммунодефицитными состояниями различного генеза. Во-первых, это связано с тем, что усовершенствование методов лабораторной диагностики и постоянное развитие материально-технического оснащения медицинских центров позволяют диагностировать взрослых пациентов. Во-вторых, современные подходы к терапии существенно увеличивают продолжительность жизни больных [32].

Поскольку пол, возраст и раса пациентов могут являться значимыми факторами состояния иммунитета, определение популяционных референтных интервалов содержания молекул TREC и KREC в периферической крови взрослой популяции для дальнейшего выявления и углубленно-

го обследования сложных случаев как врожденных, так и приобретенных иммунодефицитных состояний и своевременного назначения адекватной терапии, является актуальной задачей современной молекулярно-генетической лабораторной диагностики.

**Цель настоящей работы** – определить референтные интервалы количественного содержания фрагментов ДНК TREC и KREC в периферической крови среди взрослого населения Санкт-Петербурга.

## Материалы и методы

В работе использовали образцы цельной крови, полученные от 717 условно здоровых добровольцев в возрасте от 18 до 108 лет в медицинском центре ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» в рамках программы оценки популяционного иммунитета жителей Санкт-Петербурга. Критерием исключения добровольца из исследования являлось наличие диагноза иммунодефицит любого генеза, вирусный гепатит А, В, С, ВИЧ-инфекция.

Взятие крови осуществляли из локтевой вены одноразовой иглой в вакуумные одноразовые пробирки, содержащие антикоагулянт этилендиаминтетрауксусная дикалиевая или трикалиевая соль (6% ЭДТА). Пробирку с закрытой крышкой аккуратно переворачивали несколько раз вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась с антикоагулянтом. Образец центрифугировали 5 минут при ускорении 1200 об/мин для разделения цельной крови на фракции: плазму (верхний слой), красный осадок (нижний слой) и лейкоцитарное кольцо на границе двух фаз. Лейкоцитарное кольцо отбирали и проводили экстракцию ДНК с помощью набора «РИБО-преп» (ЦНИИ эпидемиологии, Москва).

Определение количественного содержания целевых фрагментов ДНК TREC и KREC в образцах тотальной ДНК проводили с использованием набора реагентов для количественного определения эксцизионных колец TREC и KREC методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени (TREC/KREC-AMP PS). ПЦР проводили на амплификаторах с функцией детекции флуоресценции в режиме реального времени по каналам HEX, FAM, ROX и Cy5 планшетного типа (CFX96). Уровни ДНК TREC и KREC рассчитывали с помощью калибровочных графиков, относительно эталонных генов эндогенного внутреннего контроля RPP30 и HPRT [4].

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prizm 5 и Microsoft Excel 2010. Нормальность

распределения полученных числовых данных проверяли с помощью двух критериев: Колмогорова–Смирнова и Шапиро–Уилка. Корреляционный анализ проводили с расчетом коэффициента Спирмена, значение которого оценивали по шкале Чеддока. Для оценки статистически значимых различий между отдельными выборками применяли критерий Манна–Уитни, а также ROC-анализ.

Определение референтных интервалов прямым методом проводили согласно рекомендациям Международной федерации клинической химии (International Federation of Clinical Chemistry – IFCC) и Государственного стандарта (ГОСТ) Р 53022.3-2008 [1, 8, 23].

## Результаты

Перед началом исследования все добровольцы были разделены на шесть возрастных групп: 18-29 лет (n = 120), 30-39 лет (n = 118), 40-49 лет (n = 132), 50-59 лет (n = 135), 60-69 лет (n = 111), и лица старше 70 лет (n = 101), где n – количество человек в группе.

С помощью описанного метода ПЦР в режиме реального времени было определено количественное содержание молекул TREC и KREC в каждом образце крови для всех групп.

Нормальность распределения полученных числовых значений в каждой возрастной группе, как было сказано выше, проверяли с помощью двух критериев: Колмогорова–Смирнова и Шапиро–Уилка. Согласно проведенному анализу, ни в одной из выборок распределение числовых данных не подчинялось закону нормального рас-

пределения. Все последующие статистические расчеты были выполнены с применением инструментов непараметрической статистики.

Корреляционный анализ позволил установить отрицательную зависимость концентрации молекул TREC в образцах крови с возрастом участников исследования (рис. 1А). При этом коэффициент корреляции Спирмена  $r = -0,80$  ( $p$ -value < 0,0001), что говорит о высокой значимой отрицательной корреляции значений TREC с возрастом (согласно шкале Чеддока).

Кроме того, попарное сравнение возрастных групп с применением критерия Манна–Уитни позволило выявить достоверные различия в количественном содержании молекул TREC в образцах между разными возрастными группами (рис. 1Б).

На рисунке 1Б обозначены сравниваемые возрастные группы. Для каждого попарного сравнения указано  $p$ -value, которое всегда принимало значение < 0,05, что свидетельствует о статистически значимой разнице значений аналита в указанных выборках.

При этом корреляционная зависимость содержания молекул KREC в образцах крови от возраста не установлена (рис. 2А). Коэффициент корреляции Спирмена  $r = -0,007$  ( $p$ -value = 0,9530), что свидетельствует об отсутствии значимой корреляции значений KREC с возрастом.

Статистически значимые различия между возрастными группами по критерию KREC также не выявлены (рис. 2Б).

При попарном сравнении возрастных групп по критерию KREC  $p$ -value всегда принимало

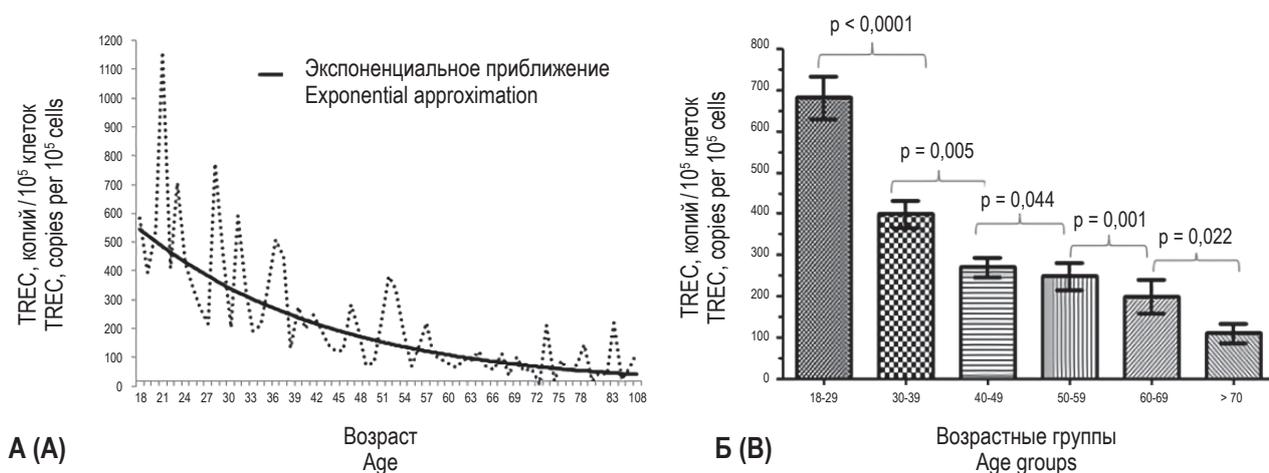


Рисунок 1. А – обратная зависимость концентрации молекул TREC в образцах крови от возраста. Б – количественное содержание молекул TREC в образцах крови разных возрастных групп

Figure 1. (A), inverse relationship between number of TREC molecules in the blood samples and the age groups of population. (B), the diagram of the quantitative content of TREC molecules in samples of the different age groups

значения, превышающие 0,05 (на рисунке не отобрано).

Для каждого описанного попарного сравнения возрастных групп был проведен ROC-анализ. Он позволяет оценить качество бинарной классификации путем построения графика (ROC-кривой) зависимости чувствительности от значения «1 минус специфичность». Важным статистическим показателем является величина площади под ROC-кривой. Чем больше эта площадь, тем качественнее классификатор. Величина площади, принимающая значения больше 0,5, говорит о применимости выбранного метода классификации (в данном случае о применимости обособления двух сравниваемых возрастных групп относительно заданного критерия).

Площадь под ROC-кривой при оценке возрастных групп по параметру TREC во всех случаях принимала значение, превышающее значение 0,5: от 0,57 до 0,70. При этом наибольшее значение площади было установлено при сравнении возрастных групп 18-29 лет и 30-39 лет (0,70), что говорит о наиболее значимых различиях по параметру TREC между этими группами (рис. 3А). Нужно отметить, что результаты ROC-анализа совпали с результатами сравнения возрастных групп по уровню TREC с применением критерия Манна–Уитни.

В случае сравнения выделенных возрастных групп по уровню KREC при построении ROC-кривых, площадь под кривой всегда принимала значение, близкое к 0,5 (0,50-0,52), за исключением сравнения самых старших возрастных групп 60-69 и > 70 лет, где это значение достигло 0,58 (рис. 3Б). Полученные значения площадей, близкие к значению 0,5, говорят об отсутствии статистически значимых различий между воз-

растными группами по критерию KREC, за исключением двух самых старших возрастных выборок.

Для прямого установления референтных интервалов (РИ), согласно рекомендациям Международной федерации клинической химии (International Federation of Clinical Chemistry – IFCC) и Государственного стандарта (ГОСТ) Р 53022.3-2008, статистически достаточной является выборка, включающая 120 практически здоровых человек, по результатам исследования которых рассчитывают 95% доверительный интервал [2].

Поскольку анализируемые числовые данные не подчиняются закону нормального распределения, РИ были рассчитаны непараметрическим методом согласно рекомендациям IFCC. Для этого все полученные числовые данные исследуемого параметра были ранжированы от меньшего к большему и определены выбросы – значения анализа, существенно отличающиеся от общего массива данных (для каждой возрастной группы при анализе значений TREC и для всего массива данных при анализе значений KREC). Для принятия решения об исключении значения применяли правило Dixon/Reed. Согласно этому правилу вычисляли отношение разницы значений между предположительно выпадающим значением и соседним к нему референтным значением (P3) к разнице между крайними значениями всего полученного диапазона. Если полученное значение превышало или равнялось 0,3, то данное выпадающее значение подлежало исключению из референтной выборки. После исключения всех выбросов определяли 95% доверительный интервал [2].

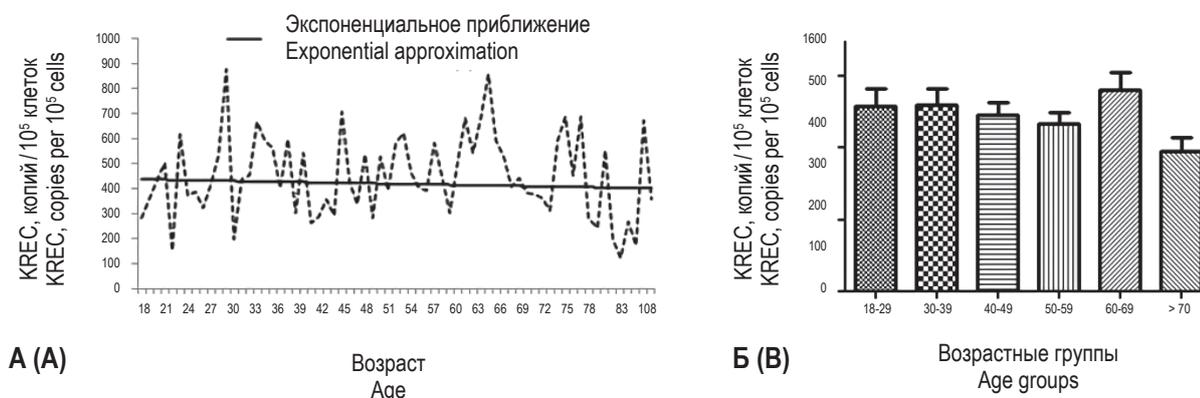


Рисунок 2. А – зависимость концентрации молекул KREC в образцах крови от возраста. Б – количественное содержание молекул KREC в образцах крови разных возрастных групп

Figure 2. (A), relationship between number of KREC molecules in the blood samples and the age groups of population. (B), the diagram of the quantitative content of KREC molecules in samples of the different age groups

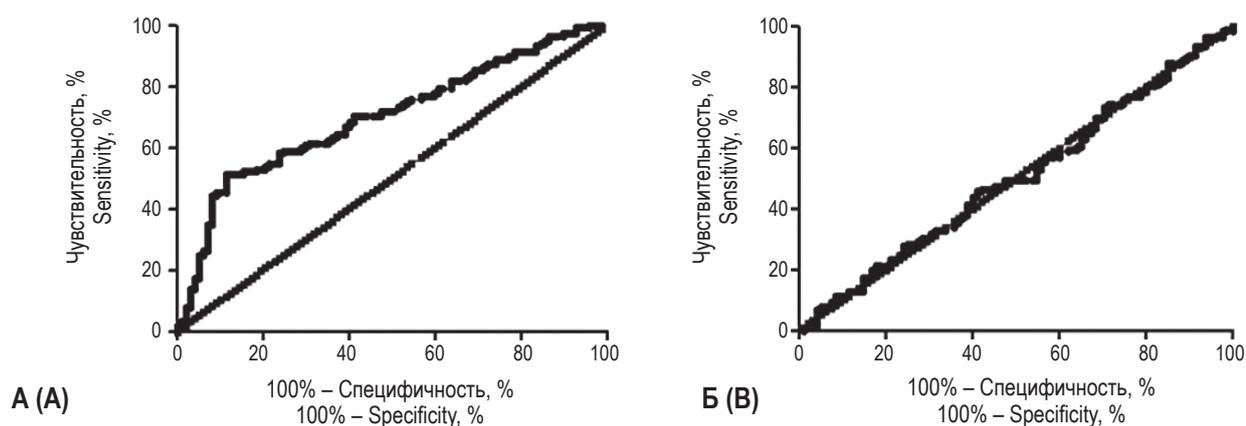


Рисунок 3. ROC-кривые, построенные при сравнении возрастных групп 18-29 лет и 30-39 лет: А – по параметру TREC; Б – по параметру KREC

Примечание. ROC-кривая на рисунке 3Б практически сливается с диагональной линией идентичности.

Figure 3. ROC-curves constructed when comparing the age groups of 18-29 years and 30-39 years: (A), according to the TREC parameter; (B) according to the KREC parameter

Note. ROC-curve is almost the same as the diagonal line of identity in figure 3B.

ТАБЛИЦА 1. РЕФЕРЕНТНЫЕ ИНТЕРВАЛЫ КОЛИЧЕСТВА МОЛЕКУЛ TREC ДЛЯ КАЖДОЙ ВОЗРАСТНОЙ ГРУППЫ (ЗНАЧЕНИЯ УКАЗАНЫ В КОПИЯХ TREC НА  $10^5$  КЛЕТОК)

TABLE 1. REFERENCE RANGE FOR THE NUMBER OF TREC MOLECULES FOR THE EACH AGE GROUP (VALUES ARE GIVEN IN COPIES OF TREC PER  $10^5$  CELLS)

	18-29 лет 18-29 years old	30-39 лет 30-39 years old	40-49 лет 40-49 years old	50-59 лет 50-59 years old	60-69 лет 60-69 years old	> 70 лет over 70 years old
<b>Медиана</b> Median	553,30	252,70	191,30	131,10	74,87	44,71
<b>Нижняя граница</b> Lower bound of the range	44,91	23,60	18,27	13,98	12,54	11,43
<b>Верхняя граница</b> Upper bound of the range	2135,00	1597,00	1098,00	1543,00	1715,00	683,10

Для значений аналита TREC были установлены РИ для каждой возрастной группы (табл. 1).

Поскольку статистически значимой разницы в числовых значениях аналита KREC между возрастными группами не выявлено, для этого параметра рассчитан единый РИ: 49,90-1478,00 копий/ $10^5$  клеток (медиана 385,7 копий/ $10^5$  клеток).

Надо отметить, что для новорожденных нижняя граница нормы уровней TREC принимает значение 892,6 копий/ $10^5$  клеток, а уровней KREC – 400,4 копий/ $10^5$  клеток (рассчитаны аналогичным образом).

## Обсуждение

Полученные нами данные о снижении уровня TREC с возрастом не противоречат результатам зарубежных исследователей, согласно которым возраст обратно коррелирует с количеством

TREC [19]. Сходные данные были показаны в исследовании Kwok и соавт. [17]. Однако мы не выявили корреляции уровней KREC с возрастом у взрослых людей, в то время как Kwok и соавт. указывали на сравнительно более низкие уровни KREC для одних возрастных групп (19-30 лет и старше 61 года) и более высокие для других (31-60 лет). Впрочем, выявленные отличия могли быть связаны с ограниченным объемом (31-43 человека) ранжированных по возрастам выборок. Отметим, что исследовательские группы в Дании и Швеции также выявляли снижение уровней TREC с возрастом. [15, 26]. Выявленное снижение уровней KREC с возрастом может быть связано с особенностью обследуемой популяции, но также возможно, что на полученные результаты оказал влияние ограниченный объем выборок и возрастное ранжирование взрослых доноров

на две группы: 15-35 лет и старше 35 лет. В то же время мы не можем отрицать вероятности, что отсутствие в полученных нами результатах свидетельства о снижении уровня KREC с возрастом может быть связано с особенностью обследуемой популяции, ограниченного объема анализируемых выборок и возрастным ранжированием.

В нашей работе не было выявлено достоверных различий в уровнях TREC и KREC между мужчинами и женщинами как в рамках возрастных категорий, так и независимо от возраста, хотя ранее сообщалось о более высоком уровне TREC у девочек-подростков и о замедленном снижении уровня TREC с возрастом у взрослых женщин по сравнению с мужчинами [21, 24]. Однако другие исследователи сообщают об отсутствии разницы уровней TREC и KREC в зависимости от пола [11] или о некоторой тенденции к более высоким уровням TREC у девочек по сравнению с мальчиками в возрасте до одного года, но отсутствию различий в старшем возрасте [34].

По всей видимости, популяционные различия и отличающиеся объемы исследуемых выборок могут быть причиной расхождений результатов.

Особого внимания заслуживает рекомендация международных сообществ непрерывно продолжать сбор материала от условно здоровых лиц и анализ результатов с последующим регулярным пересмотром и обновлением референсных интер-

валов. Так, для новорожденных в странах Европы при скрининге с использованием набора "EnLite Neonatal TREC" (Perkin Elmer, Турку, Финляндия) в настоящее время установлено более высокое пороговое значение TREC для повторного тестирования: первоначальное пороговое значение для повторного тестирования составляло 34 копии/мкл (3-й перцентиль), которое было изменено на 24 копии/мкл (1-й перцентиль) в 2018 г., так как большинство детей с начальными значениями TREC от 34 до 25 копий/мкл были здоровы [6].

## Заключение

Проведенный анализ позволил установить невозможность определения единого РИ концентраций молекул TREC в периферической крови взрослых представителей популяции (старше 18 лет). Нижняя и верхняя границы референтных значений данного анализа были определены для каждой выделенной возрастной группы. В то же время определение РИ концентраций молекул KREC для каждой возрастной группы является нецелесообразным, поскольку отсутствует корреляция концентрации данных фрагментов ДНК с возрастом представителей популяции. Для данного параметра определен единый РИ для взрослого населения в целом.

## Список литературы / References

1. ГОСТ Р 53022.3-2008. Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов. Введ. 2010-01-01. М.: Стандарт информ, 2009. 19 с. [GOST R 53022.3-2008. Clinical laboratory technologies. Requirements for the quality of clinical laboratory research. Part 3. Rules for assessing the clinical informativeness of laboratory tests. Introduction 2010-01-01]. Moscow: Standart inform, 2009. 19 p.
2. Евгина С.А., Савельев Л.И. Современные теория и практика референтных интервалов // Лабораторная служба, 2019. Т. 8, № 2. С. 36-44. [Evgina S.A., Saveliev L.I. Current theory and practice of reference interval. *Laboratornaya sluzhba = Laboratory Service*, 2019, Vol. 8, no. 2, pp. 36-44. (In Russ.)]
3. Клинические рекомендации. Первичные иммунодефициты преимущественно с недостаточностью антител (D80- D 80.9; D83 – D83.2; D83.8; D83.9). 2018. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://nrcii.ru/specialistam/klinrecommend/pid.pdf>. [Clinical guidelines. Primary immunodeficiencies predominantly with antibody deficiency (D80- D 80.9; D83 – D83.2; D83.8; D83.9). 2018. [Electronic resource]. Access mode: <https://nrcii.ru/specialistam/klinrecommend/pid.pdf>.
4. Сайтгалина М.А., Останкова Ю.В., Любимова Н.Е., Семенов А.В., Кузнецова Р.Н., Тотолян А.А. Модифицированный метод количественного определения уровней TREC и KREC в периферической крови у больных с иммунодефицитными состояниями // Инфекция и иммунитет, 2022, Т. 12, № 5. С. 981-996. [Saitgalina M.A., Ostankova Yu.V., Liubimova N.E., Semenov A.V., Kuznetsova R.N., Totolian Areg A. Modified method for quantitative determination of TREC and KREC levels in peripheral blood in patients with immunodeficiency states. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2022, Vol. 12, no. 5, pp. 981-996. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-MMF-2039.
5. Тузанкина И.А., Каракина М.Л., Власова Е.В. Анализ клинических проявлений дебюта первичных иммунодефицитов у взрослых // Медицинская иммунология, 2014. Т. 4, № 16. С. 367-374. [Tuzankina I.A., Karakina M.L., Vlasova E.V. Analysis of the clinical manifestations of the onset of primary immunodeficiencies in adults. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2014, Vol. 4, no. 16, pp. 367-374. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2014-4-367-374.
6. Ярилин А.А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. С. 251-260. [Yarilin A.A. *Immunology*]. Moscow: GEOTAR-Media, 2010, pp. 251-260.

7. Argudo-Ramírez A., Martín-Nalda A., Marín-Soria J.L., López-Galera R.M., Pajares-García S., González de Aledo-Castillo J.M., Martínez-Gallo M., García-Prat M., Colobran R., Riviere J.G., Quintero Y., Collado T., García-Villoria J., Ribes A., Soler-Palacín P. First Universal Newborn Screening Program for Severe Combined Immunodeficiency in Europe. Two-Years' Experience in Catalonia (Spain). *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 2406. doi:10.3389/fimmu.2019.02406.
8. Brown J.J., Datta V., Browning M.J., Swift P.G.F. Graves' disease in DiGeorge syndrome: patient report with a review of endocrine autoimmunity associated with 22q11.2 deletion. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.*, 2004, Vol. 17, pp. 1575-1579.
9. CLSI Document C28-A3c. Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory. Approved guideline. Third edition. Wayne, Pa. USA: CLSI. 2010. Available at: [https://clsi.org/media/1421/ep28a3c\\_sample.pdf](https://clsi.org/media/1421/ep28a3c_sample.pdf).
10. 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. 4, no. 7, pp. 579-585.
11. di Renzo M., Pasqui A.L., Auteri A. Common variable immunodeficiency: a review. *Clin. Exp. Med.*, 2004, Vol. 3, no. 4, pp. 211-217.
12. García-Prat M., Álvarez-Sierra D., Aguiló-Cucurull A., Salgado-Perandrés S., Briongos-Sebastian S., Franco-Jarava C., Martín-Nalda A., Colobran R., Montserrat I., Hernández-González M., Pujol-Borrell R., Soler-Palacín P., Martínez-Gallo M. Extended immunophenotyping reference values in a healthy pediatric population. *Cytometry B Clin. Cytom.*, 2019, Vol. 96, no. 3, pp. 223-233.
13. Gathmann B. The European internet-based patient and research database for primary immunodeficiencies: update 2011. *Clin. Exp. Immunol.*, 2012, Vol. 167, no. 3, pp. 479-491.
14. Hazenberg M.D., Verschuren M.C., Hamann D., Miedema F., van Dongen J.J. T cell receptor excision circles as markers for recent thymic emigrants: basic aspects, technical approach, and guidelines for interpretation. *J. Mol. Med.*, 2001, Vol. 79, no. 11, pp. 631-640.
15. Jung D., Alt F.W. Unraveling V(D)J recombination; insights into gene regulation. *Cell*, 2004, Vol. 116, no. 2, pp. 299-311.
16. Just H.L., Deleuran M., Vestergaard C., Deleuran B., Thestrup-Pedersen K. T-cell receptor excision circles (TREC) in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell subpopulations in atopic dermatitis and psoriasis show major differences in the emission of recent thymic emigrants. *Acta Derm. Venereol.*, 2008, Vol. 88, no. 6, pp. 566-572.
17. Kamae C., Nakagawa N., Sato H., Honma K., Mitsui N., Ohara O., Kanegane H., Pasic S., Pan-Hammarström Q., van Zelm M.C., Morio T., Imai K., Nonoyama S. Common variable immunodeficiency classification by quantifying T-cell receptor and immunoglobulin κ-deleting recombination excision circles. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2013, Vol. 131, no. 5, pp. 1437-1440.
18. Kwok J.S.Y., Cheung S.K.F., Ho J.C.Y., Tang I.W.H., Chu P.W.K., Leung E.Y.S. Establishing simultaneous T Cell Receptor Excision Circles (TREC) and K-Deleting Recombination Excision Circles (KREC) quantification assays and laboratory reference intervals in healthy individuals of different age groups in Hong Kong. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 1411. doi: 10.3389/fimmu.2020.01411.
19. Lucas M., Lee M., Lortan J., Lopez-Granados E., Misbah S., Chapel H. J. Infection outcomes in patients with common variable immunodeficiency disorders: relationship to immunoglobulin therapy over 22 years. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2010, Vol. 125, no. 6, pp. 1354-1360.
20. Naylor K., Li G., Vallejo A.N., Lee W.W., Koetz K., Bryl E. The influence of age on T cell generation and TCR diversity. *J. Immunol.*, 2005, Vol. 174, no. 11, pp. 7446-7452.
21. Peyvandi S., Lupo P.J., Garbarini J. 22q11.2 deletion in patients with conotruncal defects: data from 1610 consecutive cases. *Pediatr. Cardiol.*, 2013, Vol. 34, no. 7, pp. 1687-1694.
22. Pido-Lopez J., Imami N., Aspinall R. Both age and gender affect thymic output: more recent thymic migrants in females than males as they age. *Clin. Exp. Immunol.*, 2001, Vol. 125, no. 3, pp. 409-413.
23. Quinti I., Soresina A., Spadaro G., Martino S., Donnanno S., Agostini C. Long-term follow-up and outcome of a large cohort of patients with common variable immunodeficiency. *J. Clin. Immunol.*, 2007, Vol. 27, no. 3, pp. 308-316.
24. Siest G., Henny J., Grasbeck R., Wilding P., Petitclerc C., Queraltó J., Petersen P. The theory of reference values: an unfinished symphony. *CCLM*, 2013, Vol. 51, no. 1, pp. 47-64.
25. Sottini A., Serana F., Bertoli D., Chiarini M., Valotti M., Vaglio Tessoro M., Lmberti L. Simultaneous quantification of T-cell receptor excision circles (TRECs) and K-deleting recombination excision circles (KRECs) by real-time PCR. *J. Vis. Exp.*, 2014, Vol. 94, 52184. doi: 10.3791/52184.
26. Tangye S.G., Al-Herz W., Bousfiha A., Chatila T., Cunningham-Rundles C., Etzioni A. Human inborn errors of immunity: 2019 update on the classification from the international union of immunological societies expert committee. *J. Clin. Immunol.*, 2020, Vol. 40, no. 1, pp. 24-64.
27. Törlén J., Gaballa A., Remberger M., Mörk L.M., Sundberg B., Mattsson J., Uhlin M. Effect of graft-versus-host disease prophylaxis regimens on T and B cell reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 2019, Vol. 25, no. 6, pp. 1260-1268.
28. Tuano K.S., Seth N., Chinen J. Secondary immunodeficiencies: An overview. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 2021, Vol. 127, no. 6, pp. 617-626.

29. Urm S.H. Asthma and risk of selective IgA deficiency or common variable immunodeficiency: a population based case control study. *Mayo Clin. Proc.*, 2013, Vol. 88, no. 8, pp. 813-821.
30. Vadamalai K. Screening for humoral immunodeficiency in patients with community-acquired pneumonia. *J. Hosp. Med.*, 2019, Vol. 14, no. 1, pp. 33-37.
31. van Zelm M.C., van der Burg M., Langerak A.W., van Dongen J.J. PID comes full circle: applications of V(D) J recombination excision circles in research, diagnostics and newborn screening of primary immunodeficiency disorders. *Front Immunol.*, 2011, Vol. 2, 12. doi: 10.3389/fimmu.2011.00012.
32. Verbsky J.W. Newborn screening for severe combined immunodeficiency; The wisconsin experience (2008-2011). *J. Clin. Immunol.*, 2012, Vol. 32, no. 1, pp. 82-88.
33. Verma N. Therapeutic management of primary immunodeficiency in older patients. *Drugs Aging*, 2013, Vol. 30, no. 7, pp. 503-512.
34. Verstegen R.H.J. 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.
35. Zhao Q., Dai R., Li Y., Wang Y., Chen X., Shu Z., Zhou L., Ding Y., Tang X., Zhao X. Trends in TREC values according to age and gender in Chinese children and their clinical applications. *Eur. J. Pediatr.*, 2022, Vol. 181, no. 2, pp. 529-538.

**Авторы:**

**Сайтгалина М.А.** — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Санкт-Петербург, Россия

**Любимова Н.Е.** — к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Санкт-Петербург, Россия

**Останкова Ю.В.** — к.б.н., заведующая лабораторией иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Санкт-Петербург, Россия

**Кузнецова Р.Н.** — к.м.н., врач-иммунолог ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; доцент кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Тотолян Арег А.** — д.м.н., профессор, академик РАН, заведующий лабораторией молекулярной иммунологии, директор ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; заведующий кафедрой иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Authors:**

**Saitgalina M.A.**, Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

**Liubimova N.E.**, PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

**Ostankova Yu.V.**, PhD (Biology), Head, Laboratory of Immunology and Virology HIV, Senior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

**Kuznetsova R.N.**, PhD (Medicine), Clinical Immunologist, Saint Petersburg Pasteur Institute; Associate Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Totolian Areg A.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Molecular Immunology, Director, Saint Petersburg Pasteur Institute; Head, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation