

## **ОСОБЕННОСТИ ПРЕАНАЛИТИЧЕСКОГО ЭТАПА ПРИ КОЛИЧЕСТВЕННОМ ОПРЕДЕЛЕНИИ TREC/KREC В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ**

**Сайтгалина М.А.<sup>1</sup>, Останкова Ю.В.<sup>1</sup>, Седых А.В.<sup>1</sup>, Тотолян Арег А.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», 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.** Использование сухих пятен крови (dried blood spots – DBS), полученных из пяток младенцев, имеет много преимуществ по сравнению со сбором образцов цельной крови. Экстрагированная из DBS ДНК может быть использована для выявления генетических заболеваний методом ПЦР, что способствовало развитию популяционного скрининга новорожденных во всем мире. С января 2023 г. в список выявляемых заболеваний входит группа первичных иммунодефицитов (ПИД), связанных с отсутствием или снижением уровней Т- и/или В-лимфоцитов, определяемых в рамках скрининга по уровням молекул TREC и KREC в периферической крови соответственно. Количественный анализ требует особого внимания к биологическому материалу. Цель – оценить влияние преаналитического этапа на количественный анализ уровней TREC/KREC в периферической крови.

Материалом служили 5219 образцов DBS, полученных от младенцев на 3–4-й день жизни, а также DBS, приготовленные из цельной крови 100 условно здоровых лиц в возрасте от 18 до 29 лет. Методом ПЦР-РВ, применяя тест-системы для оценки уровней TREC и KREC в периферической крови, проводили сравнительный анализ количества молекул TREC/KREC в корректно и не корректно взятых DBS от новорожденных и взрослых лиц, а также в зависимости от объема наносимого материала; качество DBS оценивали визуально.

В первые месяцы проекта выявлено значительное количество неправильно взятых образцов – свыше трети всех полученных за каждый соответствующий месяц ДНК-карт. В результате дополнительного обучения медперсонала количество некорректно взятого материала снизилось до уровня, не превышающего 1% от всех ежемесячно собираемых образцов. При использовании ДНК, выделенной из DBS с ошибками нанесения, у большей части образцов (для новорожденных 64%, для взрослых лиц 78%) не удавалось получить результат. В остальных случаях полученные результаты были значительно ниже нормальных уровней содержания TREC/KREC, определяемых в этих же образцах при корректном взятии DBS (во всех случаях  $p < 0,0001$ , 95% ДИ). Объем крови, используемый при корректном нанесении на карты Гатри, не влиял на получаемые результаты, уровни TREC и KREC были

---

### **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  
14 Mira St  
St. Petersburg  
197101 Russian Federation  
Phone: +7 (981) 834-66-32.  
E-mail: sajgalinam@mail.ru

---

### **Образец цитирования:**

М.А. Сайтгалина, Ю.В. Останкова, А.В. Седых,  
Арег А. Тотолян «Особенности преаналитического  
этапа при количественном определении TREC/KREC  
в периферической крови» // Медицинская иммунология,  
2023. Т. 25, № 6. С. 1441-1452.  
doi: 10.15789/1563-0625-FOT-2909

© Сайтгалина М.А. и соавт., 2023  
Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

### **For citation:**

M.A. Saitgalina, Yu.V. Ostankova, A.V. Sedykh,  
Areg A. Totolian “Features of the pre-analytical stage  
in quantitative determination of TREC/KREC in peripheral  
blood”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya  
Immunologiya*, 2023, Vol. 25, no. 6, pp. 1441-1452.  
doi: 10.15789/1563-0625-FOT-2909

© Saitgalina M.A. et al., 2023  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-FOT-2909

сопоставимы, при сравнении медиан, рассчитанных для каждой группы образцов, значимых различий не выявлено ( $p > 0,05$ ).

При количественном анализе уровней TREC/KREC в периферической крови корректно взятый материал имеет принципиальное значение для получения достоверных показателей, в первую очередь для исключения ложноположительных результатов. Чтобы свести к минимуму погрешности преаналитического этапа, для контроля и/или корректировки ошибок, необходимо дополнительное обучение медицинского персонала.

*Ключевые слова:* неонатальный скрининг, сухие пятна крови, преаналитический этап, ошибки взятия материала, TREC/KREC

## FEATURES OF THE PRE-ANALYTICAL STAGE IN QUANTITATIVE DETERMINATION OF TREC/KREC IN PERIPHERAL BLOOD

Saitgalina M.A.<sup>a</sup>, Ostankova Yu.V.<sup>a</sup>, Sedykh A.V.<sup>a</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.** The use of dried blood spots (DBS) obtained from the heels of infants has many advantages over the collection of whole blood samples. DNA extracted from DBS can be used to detect genetic diseases by PCR, which has contributed to the development of population-based newborn screening worldwide. Since January 2023, the list of identified diseases includes a group of primary immunodeficiencies (PIDs), associated with the absence or decrease in the levels of T and/or B lymphocytes, determined as part of screening by the levels of TREC and KREC molecules in peripheral blood, respectively. Quantitative analysis requires special attention to biological material. The aim is to evaluate the impact of the preanalytical step on the quantitative analysis of TREC/KREC levels in peripheral blood.

The material included 5219 DBS obtained from infants on days 3-4 of life, as well as DBS prepared from the whole blood of 100 apparently healthy individuals aged 18 to 29 years. A comparative analysis of the TREC/KREC molecules number in correctly and incorrectly collected DBS from newborns and adults, as well as depending on the volume of applied blood, was carried out by RT-PCR using test systems to assess the levels of TREC and KREC in peripheral blood. DBS quality was assessed visually.

In the first months of the project, a significant number of incorrectly taken samples were identified – over a third of all DNA maps received for each corresponding month. As a result of additional training of medical staff, the amount of incorrectly collected material decreased to a level not exceeding 1% of all monthly samples collected. When using DNA extracted from DBS with application errors, the majority of samples (64% for newborns, 78% for adults) failed to obtain a result. In the remaining cases, the results obtained were significantly lower than the normal levels of TREC/KREC determined in the same samples with correct DBS collection (all  $p < 0.0001$ , 95% CI). The volume of blood used when correctly applied to Guthrie cards did not affect the results obtained, TREC and KREC levels were comparable; when comparing the medians calculated for each group of samples, no significant differences were identified ( $p > 0.05$ ).

When quantitatively analyzing TREC/KREC levels in peripheral blood, correctly taken material is fundamental importance to obtain reliable indicators, primarily to exclude false-positive results. To minimize errors in the preanalytical stage, additional training of medical personnel is necessary to control and/or correct errors.

*Keywords:* neonatal screening, dried blood spots, preanalytical stage, material collection errors, TREC/KREC

### Введение

Первое применение сухих пятен крови (dried blood spots – DBS), полученных из пяток младенцев и нанесенных на фильтровальную бумагу, для сбора и анализа крови, относится к началу 1960-х годов, когда доктор Роберт Гатри использовал эти образцы для измерения фенилаланина

у новорожденных с целью выявления фенилкетонурии [8]. Использование DBS дает ряд преимуществ по сравнению с традиционным сбором образцов цельной крови. В том числе стабилизирует многие анализы при высыхании и обеспечивает более простое хранение и транспортировку, поскольку в большинстве случаев нет необходимости в морозильных камерах или сухом льде.

Кроме того, сбор DBS не требует центрифугирования, предполагает малоинвазивный способ взятия крови (прокол пятки вместо венозной канюли) и меньший объем крови, что в совокупности позволило значительно упростить сбор и обработку образцов крови новорожденных. Экстрагированная из сухой капли крови ДНК легко может быть использована для выявления генетических заболеваний у новорожденного методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) [10]. Этот подход способствовал развитию популяционного скрининга новорожденных во всем мире [13].

Основной целью неонатального скрининга является обнаружение новорожденных с серьезными, но поддающимися терапии заболеваниями, чтобы способствовать скорейшему началу адекватного лечения, снижению риска осложнений и неблагоприятного исхода, улучшению качества жизни пациента [1]. Впрочем, существуют аргументы в пользу выявления и неизлечимых заболеваний, главные из которых – психологическая помощь семье, когда смерть ребенка объяснима, а не наступает по неизвестной причине, а также возможность дальнейшего разумного планирования новой беременности. В настоящее время в Российской Федерации в рамках неонатального скрининга определяют 29 нозологий.

Точность диагностики во многом зависит не только от постановки ПЦР-анализа, но также от условий взятия, транспортирования и хранения клинического материала, экстракции ДНК. Так, например, несмотря на существующие критерии абсорбции крови на фильтровальной бумаге, ее различия от партии к партии карт Гатри может способствовать аналитической неточности результатов [9]. Большинство исследований, выполняемых молекулярно-генетическими методами, подразумевают качественную диагностику, т. е. выявление той или иной мутации. Однако с января 2023 года в список выявляемых заболеваний входит группа первичных иммунодефицитов (ПИД), связанных с отсутствием или снижением уровней Т- и/или В-лимфоцитов в периферической крови. Для определения ПИД осуществляют количественный мультиплексный ПЦР-анализ молекул Т-рецепторных эксцизионных колец (англ. T cell receptor excision circles – TREC) и Каппа-делеционных рекомбинационных эксцизионных колец (англ. kappa-deleting recombination excision circles – KREC), представляющих собой небольшие кольцевые фрагменты эписомальной ДНК, образующиеся при перестройке Т-клеточного и В-клеточного рецепторов соответственно [4]. Количественный анализ требует особого внимания к биологическому материалу.

Подробности сбора образцов крови, переноса крови на карту, а также требования хранения и транспортировки полученных DBS описаны в ряде международных рекомендаций, статьях, а также регламентируются внутренними документами каждой страны. В Российской Федерации это приказ министерства здравоохранения № 185 «О массовом обследовании новорожденных детей на наследственные заболевания» [2].

Несмотря на достаточно четко прописанные в приказе и многочисленных инструкциях правила взятия, нанесения и высушивания крови для получения DBS, младший медицинский персонал не всегда с надлежащим тщанием соблюдает рекомендации. Ошибки пробоподготовки сухой капли крови могут приводить к неверному результату анализа или невозможности осуществить исследование. Повторный сбор биологического материала подразумевает увеличение финансовых затрат, а также нередко затруднен физически, так как матери с новорожденными уже выписаны из род.домов.

**Целью нашей работы** было оценить влияние преаналитического этапа на количественный анализ уровней TREC/KREC в периферической крови.

## Материалы и методы

В работе использовали 5219 образцов сухой капли крови на картах Гатри, полученных от младенцев на 3-4-й день жизни в рамках программы скрининга новорожденных из родильных домов Санкт-Петербурга в период с 7 февраля 2020 г. по 30 июня 2021 г., а также цельную кровь от 100 условно здоровых человек в возрасте от 18 до 29 лет. Все процедуры соответствовали этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. Дизайн исследования был одобрен локальным этическим комитетом ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера». Исследования проводили при письменном согласии пациентов или родителей пациентов.

Для оценки частоты ошибочного взятия материала осуществляли визуальный мониторинг карт Гатри. Для сравнительной оценки результатов анализа корректно и не корректно взятых образцов случайным образом были выбраны 100 карт Гатри с сухими каплями крови, полученными от здоровых доношенных новорожденных, где одно пятно крови нанесено правильно, в то время как другое пятно имеет недостаточную пропитку, признаки неправильного высушивания или иные

ошибки взятия материала. С использованием цельной крови, полученной от взрослых условно здоровых лиц, были подготовлены парные сухие пятна крови, одно из которых наносили правильно, а другое с намеренными ошибками. Для оценки влияния объема крови были подготовлены сухие пятна крови из цельной крови взрослых лиц с различным объемом наносимого материала (50 мкл, 100 мкл, 150 мкл, 200 мкл, 250 мкл, 300 мкл).

Пробоподготовку осуществляли следующим способом: в реакцию выделения ДНК брали 6 выбитых из DBS дисков диаметром 3 мм, полученных с использованием панчера DBS Puncher (PerkinElmer, Финляндия). Для каждого образца пул дисков готовили в трех повторах. Экстрагировали ДНК с применением набора реагентов для выделения нуклеиновых кислот из сухой капли крови «Экстра-ДНК-Био» («Алкор-био», Россия).

Анализ проводили методом ПЦР в режиме реального времени с гибридизационно-флуоресцентной детекцией с использованием набора реагентов TREC/KREC-AMP PS (ФБУН НИИ Пастера, Россия) [4]. ПЦР проводили на амплификаторе планшетного типа с функцией детекции флуоресценции в режиме реального времени по каналам FAM/Green, HEX/Yellow, Cy5/Red, ROX/Orange (CFX96, США), согласно инструкции производителя. Для образцов, полученных от новорожденных, дополнительно проводили анализ с использованием наборов реагентов EnLite™ TREC-KREC kit (PerkinElmer, Финляндия) и «ИММУНО-БИТ» («АБВ-Тест», Россия).

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 5 и Microsoft Excel 2010. При множественном сравнении значений исследуемых аналитов в независимых выборках применяли критерий Краскела–Уоллиса и тест Данна. При попарном сравнении выборок применяли критерий Манна–Уитни.

## Результаты и обсуждение

Сбор образцов DBS обычно проводили путем прокалывания пятки новорожденного ланцетом, а затем капли крови наносили на предварительно напечатанные круги на специально изготовленной карте Гатри, в идеале одной каплей, нанесенной в центр, равномерно пропитывали обозначенную окружность. Предопределенный круг должен быть однородно и симметрично заполнен, а обе стороны карты должны иметь один и тот же красный цвет. При этом необходимо избегать свертывания и расслоения препарата крови. Младшему медицинскому персоналу, осуществляющему взятие образца, следовало избе-

гать прикосновений к области круга, особенно до того, как кровь будет нанесена и полностью высохнет. В некоторых случаях допускалось нанесение крови на карту Гатри с помощью пипетки/дозатора: наконечник пипетки при этом должен был находиться на несколько миллиметров выше поверхности нанесения, а непосредственно нанесение осуществлялось прикосновением капли крови к центру обозначенной окружности. Очень важно полностью высушить пятна крови перед хранением или транспортировкой. В целом рекомендовалась сушка в течение минимум 2-3 часов на открытом пространстве при комнатной температуре (15-22 °С), однако время высыхания зависит от типа бумаги и нанесенного объема крови [6]. Образцы нельзя нагревать, складывать друг на друга, допускать прикосновение к другим поверхностям, хранить в доступе прямых солнечных лучей. Избыточная влага в помещении может повлиять на качество образцов крови на бумаге, вызывая рост бактерий, изменяя эффективность экстракции нуклеиновых кислот во время анализа или способствуя разложению нестабильных аналитов. Таким образом, после высыхания образцы DBS следовало защитить от сырости, накрыв их бумажной накладкой и упаковав во влагонепроницаемые пакеты с zip-застежкой и пакетами с влагопоглотителем. На рисунке 1 (см. 2-ю стр. обложки) представлен результат правильного сбора DBS.

Наиболее частые ошибки пробоподготовки (нанесения крови и высушивания) представлены на рисунке 2 (см. 2-ю стр. обложки).

В мировой практике отмечают сходные ошибки пробоподготовки сухой капли крови: к пятнам крови низкого качества относят многоточечные образцы (несколько маленьких пятен крови используются для получения одного более крупного пятна крови), недостаточное количество крови на карте, кровь, нанесенная на обе стороны карты, слоистые пятна крови (последовательное наслаивание нескольких доз крови) и, так называемые, сдавленные пятна крови (compressed blood spots), когда небольшой объем крови за счет внешнего воздействия визуально занимает всю площадь отмеченной окружности [7]. Качество DBS может быть оценено субъективно путем визуального осмотра в скрининговой лаборатории, и для тех образцов, которые непригодны для анализа, должны быть запрошены повторные образцы. Однако отбраковка образцов не стандартизирована, поскольку не существует конкретных указаний по определению минимальных критериев приемлемости качества DBS. Отсутствие консенсуса приводит к большим различиям в практике: разные лаборатории принимают или отклоняют образцы разного качества, что приводит к путанице сре-



ди сборщиков проб относительно того, что представляет собой приемлемая проба, и затрудняет сравнение частот повторного забора материала, которого можно избежать.

При визуальной оценке качества материала на полученных в рамках настоящего исследования картах Гатри было выявлено значительное количество неправильно взятых образцов или образцов, для которых одно пятно крови нанесено правильно, в то время как другое пятно имеет недостаточную пропитку, признаки неправильного высушивания или иные ошибки взятия материала. Наибольшее количество некорректно взятых образцов приходилось на первые четыре месяца проекта (рис. 3).

Следует отметить, что количество некорректно взятых образцов в первые месяцы настоящей работы, фактически превышающее треть всех полученных за каждый соответствующий месяц ДНК-карт, было для нас неожиданностью. В связи с чем для медицинского персонала было проведено обучение по грамотному взятию, высушиванию и хранению материала, а затем на протяжении пяти месяцев еженедельно осуществляли контроль взятия сухой капли крови и при необходимости повторно демонстрировали последовательность верных манипуляций. В результате обучения количество некорректно взятого материала снизилось до уровня, не превышающего 1% от всех полученных образцов.

При параллельном анализе образцов, представленных двумя пятнами крови, одно из которых нанесено некорректно, было показано очевидное различие получаемых результатов. При использовании корректно взятого пятна крови младенцев уровни TREC и KREC превышали пороговые уровни и соответствовали нормам содержания эксцизионных колец у новорожденных, указанных для каждой используемой тест-системы. У взрослых обследованных при использовании ДНК, экстрагированной из корректно собранных образцов сухой капли крови, уровни TREC и KREC превышали 44,9 копий/ $10^5$  клеток и 49,9 копий/ $10^5$  клеток, соответственно, что согласуется с установленными граничными нормами для лиц 18-29 лет [3]. При использовании ДНК, выделенной из сухих пятен крови с ошибками нанесения материала на карту Гатри, у большей части образцов (для новорожденных  $n = 64$ , 64%, 95% ДИ: 53,79-73,36%; для взрослых лиц  $n = 78$ , 78%, 95% ДИ: 68,61-85,67%) не удавалось получить каких-либо результатов, так как выход продуктов амплификации отсутствовал: флуоресцентные сигналы целевых и/или нормировочных генов не нарастали в ходе реакции. Это может свидетельствовать о деградации

ДНК в таких образцах и, соответственно, ее недостаточном количестве для анализа.

В остальных случаях удавалось провести анализ ДНК, экстрагированной из таких образцов крови, и рассчитать уровень TREC/KREC в пробе, однако полученные результаты были значительно ниже нормальных уровней содержания TREC и KREC в периферической крови. На рисунке 4 представлена сравнительная оценка уровней TREC, рассчитанных для одних и тех же образцов крови новорожденных, нанесенных на карты Гатри с соблюдением протокола взятия биоматериала (корректно) и с допущением ошибок.

Во всех случаях уровень молекул TREC, определенный в образцах крови, взятых с нарушениями рекомендаций, значительно отличался от рассчитанного в корректно взятых образцах крови (во всех случаях  $p < 0,0001$ , 95% ДИ) и был близок к нулевому значению.

Уровни молекул TREC, определенных с использованием разных наборов реагентов для одного и того же образца крови, отличались по значению, поскольку разные тест-системы используют разные протоколы анализа, способы нормировки данных, единицы измерений. Однако была показана корреляция между значениями TREC, рассчитанными на разных тест-системах, для одного и того же набора образцов крови в том случае, если соблюдались условия нанесения капель крови на карту Гатри и их хранения. Корреляционная зависимость между данными отсутствовала, если при пробоподготовке были допущены грубые ошибки (рис. 5). На рисунке 5 отображены значения коэффициентов корреляции для уровней TREC в тех образцах крови, которые собирали с учетом рекомендаций (А и В). При сравнении значений, полученных с использованием тест-системы TREC/KREC-Amp PS с тест-системами «ИММУНО-БИТ» и EnLite™, значения коэффициентов корреляции в обоих случаях стремились к 0,9, что говорит о высокой силе связи между сравниваемыми выборками. В случае нарушений в процессе пробоподготовки корреляция между полученными значениями TREC отсутствовала (рис. 5Б, Г).

Аналогичные данные получены при оценке уровней KREC в описанных выше образцах крови новорожденных: при нарушении рекомендаций по сбору и хранению крови на картах Гатри уровни KREC оказывались значительно ниже ( $p < 0,0001$ , 95% ДИ) при сравнении с теми же образцами в условиях соблюдения всех рекомендаций пробоподготовки (рис. 6).

На рисунке 7 отображена корреляция уровней KREC, рассчитанных с использованием разных тест-систем, для одного и того же набора образ-

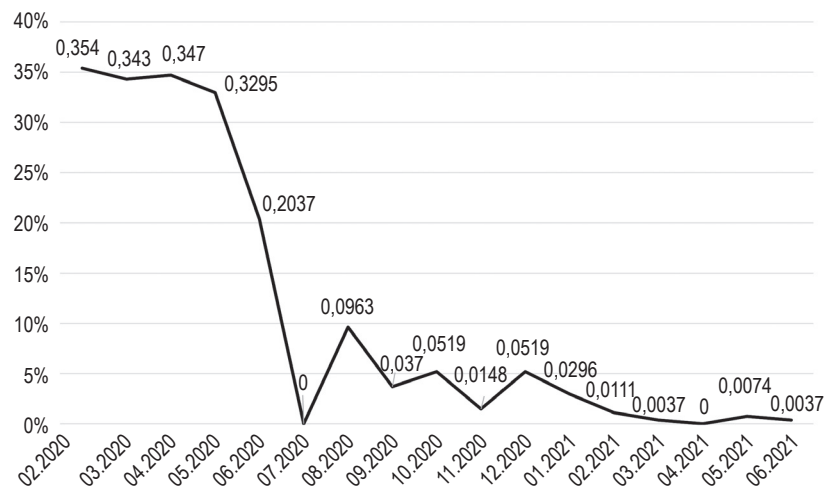


Рисунок 3. Динамика количества некорректно взятых образцов по месяцам

Figure 3. Dynamics of the incorrectly collected samples number by month

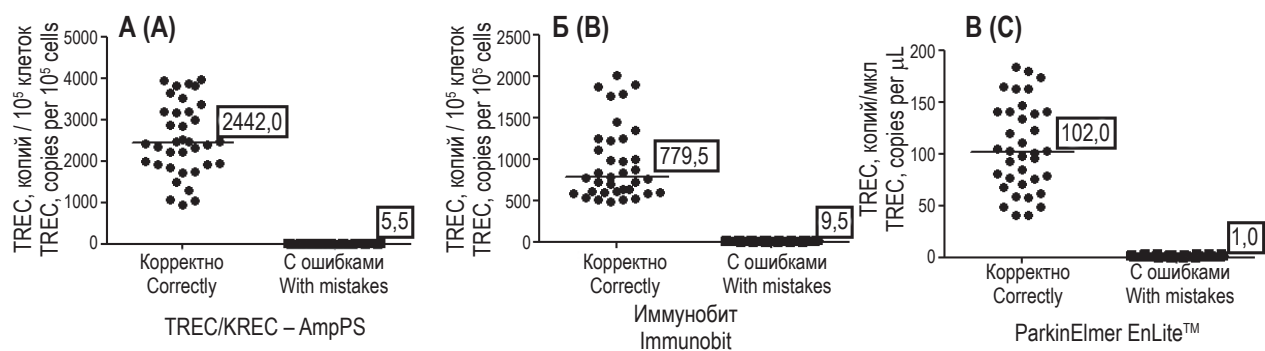


Рисунок 4. Сравнение уровней TREC, определенных с использованием разных тест-систем, в образцах крови новорожденных, нанесенных на карты Гатри с соблюдением рекомендаций (корректно) и с допущением ошибок  
Примечание. А – TREC/KREC-Amp PS (копий/10<sup>5</sup> клеток), НИИ им. Пастера. Б – «ИММУНО-БИТ» (копий/10<sup>5</sup> клеток), «АБВ-Тест». В – EnLite™ TREC-KREC kit (копий/мкл), PerkinElmer. Числами на диаграммах обозначены медианные значения анализа.

Figure 4. Comparison of TREC levels determined using different test systems in newborn blood samples plotted on Guthrie charts following recommendations (correctly) and with mistakes

Note. (A) "TREC/KREC-Amp PS" (copies per 10<sup>5</sup> cells), Saint Petersburg Pasteur Institute. (B) "IMMUNO-BIT" (copies per 10<sup>5</sup> cells), ABV-test. (C) "EnLite™ TREC-KREC kit" (copies per μL), PerkinElmer. The numbers in the diagrams indicate the median values of the analyte.

цов крови в случаях, когда соблюдались условия нанесения капель крови на карту Гатри и когда образцы были взяты некорректно.

При работе с образцами крови, полученными от лиц 18-29 лет, также наблюдали значительное снижение уровней и TREC ( $p < 0,0001$ ), и KREC ( $p < 0,0001$ ) в тех случаях, когда были допущены ошибки при нанесении крови на бумажный фильтр или при его высушивании (рис. 8).

Образцы низкого качества могут создать дополнительные проблемы в процессе проверки. В том числе повторное взятие крови у младенца, запоздалое сообщение результатов анализа из-за необходимости получения повторного образца и, соответственно, задержка направления пациентов с положительным результатом скрининга на диагностическое обследование и последующую терапию. Кроме того, с повторным взятием проб

увеличивается объем рабочей нагрузки и финансовых затрат как лабораторий, так и лиц, осуществляющих взятие материала. Отмечают также, что запрос повторного взятия материала может вызвать стресс у ребенка, беспокойство родителей и сопровождаться отказом родителей от предоставления дополнительного образца [5]. Некоторые исследователи считают, что для многих некорректно взятых образцов можно найти участок пятна с достаточной насыщенностью кровью, отсутствием царапин или иных повреждений поверхности бумаги. В этих случаях рекомендуют использовать для анализа доступный материал и не запрашивать образец повторно [12]. Однако это недопустимо, если образцы крови должны использоваться для целей диагностики или скрининговых тестов, где положительный результат определяется уровнем анализа ниже, а не выше,

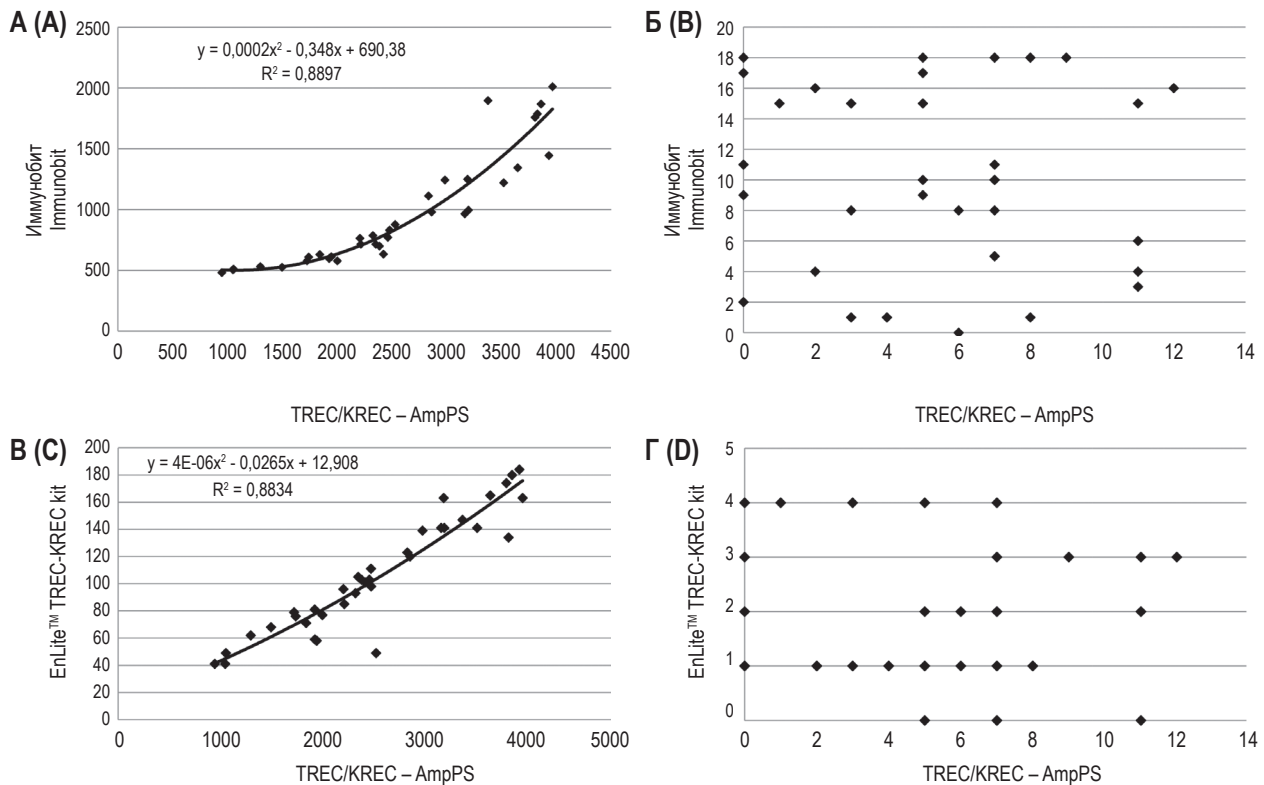


Рисунок 5. Корреляция уровней TREC, определенных с использованием разных тест-систем и разных условий подготовки проб

Примечание. А – TREC/KREC-Amp PS и «ИММУНО-БИТ», соблюдение рекомендаций пробоподготовки. Б – TREC/KREC-Amp PS и «ИММУНО-БИТ», некорректная пробоподготовка. В – TREC/KREC-Amp PS и EnLite™ TREC-KREC kit PerkinElmer, соблюдение рекомендаций пробоподготовки. Г – TREC/KREC-Amp PS и EnLite™ TREC-KREC kit PerkinElmer, некорректная пробоподготовка.

Figure 5. Correlation of TREC levels determined using different test systems and different sample preparation conditions  
Note. A, “TREC/KREC-Amp PS” and “IMMUNO-BIT”, compliance with sample preparation recommendations. B, “TREC/KREC-Amp PS” and «IMMUNO-BIT”, incorrect sample preparation. C, “TREC/KREC-Amp PS” and “EnLite™ TREC-KREC kit” PerkinElmer, compliance with sample preparation recommendations. D, “TREC/KREC-Amp PS” and “EnLite™ TREC-KREC kit” PerkinElmer, incorrect sample preparation.

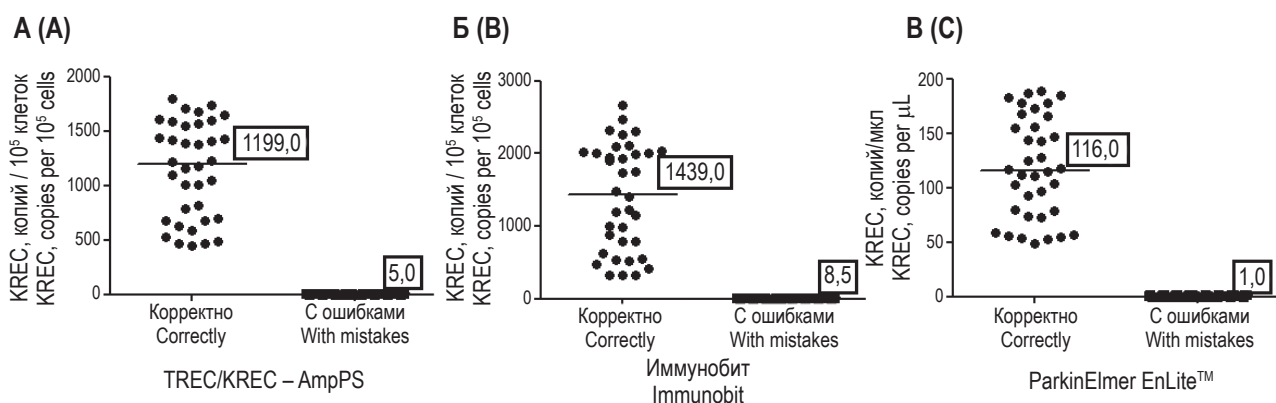
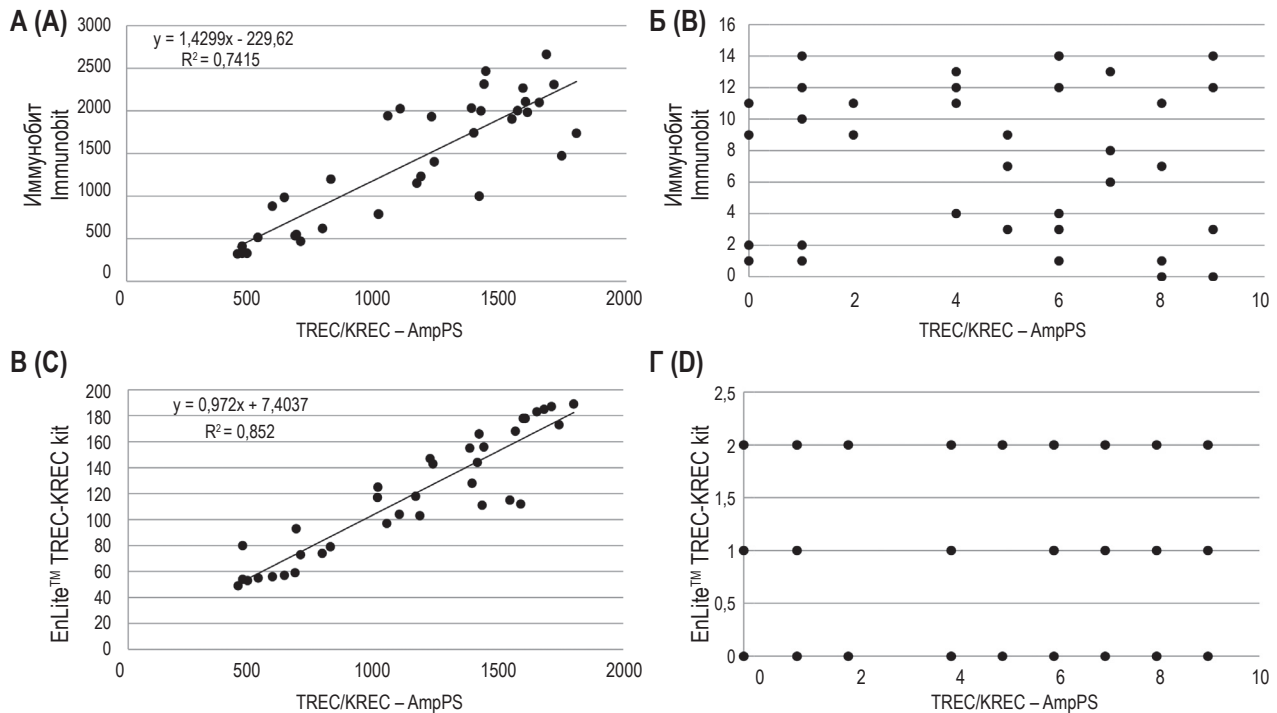


Рисунок 6. Сравнение уровней KREC, определенных с использованием разных тест-систем, в образцах крови новорожденных, нанесенных на карты Гатри с соблюдением рекомендаций (корректно) и с допущением ошибок

Примечание. А – TREC/KREC-Amp PS (копий/10<sup>5</sup> клеток), НИИ им. Пастера. Б – «ИММУНО-БИТ» (копий/10<sup>5</sup> клеток), «АБВ-Тест». В – EnLite™ TREC-KREC kit (копий/мкл), PerkinElmer. Числами на диаграммах обозначены медианные значения анализа.

Figure 6. Comparison of KREC levels determined using different test systems in newborn blood samples plotted on Guthrie charts following recommendations (correctly) and with mistakes

Note. A, “TREC/KREC-Amp PS” (copies per 10<sup>5</sup> cells), Saint Petersburg Pasteur Institute. B, “IMMUNO-BIT” (copies per 10<sup>5</sup> cells), ABV-test. C, “EnLite™ TREC-KREC kit” (copies per μL), PerkinElmer. The numbers in the diagrams indicate the median values of the analyte.

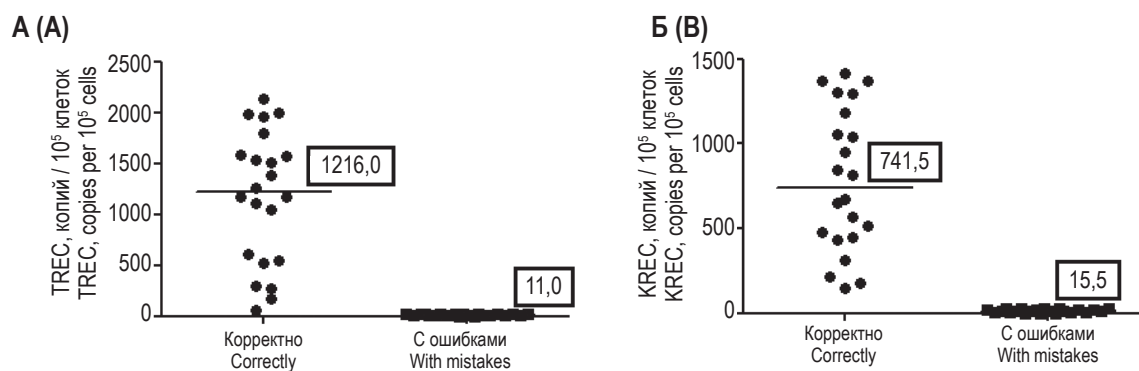


**Рисунок 7. Корреляция уровней KREC, определенных с использованием разных тест-систем и разных условий подготовки проб**

**Примечание.** А – TREC/KREC-Amp PS и «ИММУНО-БИТ», соблюдение рекомендаций пробоподготовки. Б – TREC/KREC-Amp PS и «ИММУНО-БИТ», некорректная пробоподготовка. В – TREC/KREC-Amp PS и EnLite™ PerkinElmer, соблюдение рекомендаций пробоподготовки. Г – TREC/KREC-Amp PS и EnLite™ PerkinElmer, некорректная пробоподготовка.

Figure 7. Correlation of KREC levels determined using different test systems and different sample preparation conditions

Note. A, “TREC/KREC-Amp PS” and “IMMUNO-BIT”, compliance with sample preparation recommendations. B, “TREC/KREC-Amp PS” and “IMMUNO-BIT”, incorrect sample preparation. C, “TREC/KREC-Amp PS” and “EnLite™ TREC-KREC kit” PerkinElmer, compliance with sample preparation recommendations. D, “TREC/KREC-Amp PS” and “EnLite™ TREC-KREC kit” PerkinElmer, incorrect sample preparation.



**Рисунок 8. Сравнение уровней TREC (А) и KREC (Б), определяемых в образцах крови людей старше 18 лет, собранных на карты Гатри с соблюдением всех рекомендаций и с ошибками при пробоподготовке**

**Примечание.** Анализ проведен с использованием тест-системы TREC/KREC-Amp PS, НИИ им. Пастера. Числами на диаграммах обозначены медианные значения аналитов.

Figure 8. Comparison of TREC (A) and KREC (B) levels determined in blood samples from people over 18 years old collected on Guthrie cards in compliance with all recommendations and with mistakes during sample preparation

Note. The analysis was carried out using the test system “TREC/KREC-Amp PS”, Saint Petersburg Pasteur Institute. The numbers in the diagrams indicate the median values of the analytes.



установленного порогового значения, например, при скрининге на дефицит биотинидазы, дефицит глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и ПИД [7].

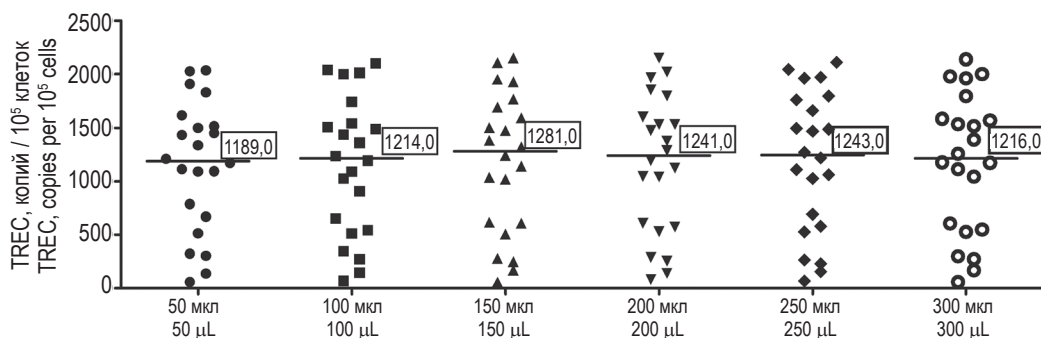
Несмотря на то, что DBS дает много преимуществ перед венепункцией, измерение биомаркеров в образцах DBS осложняется рядом проблем, в том числе малыми и переменными объемами крови. Для многих количественных показателей имеет значение объем пятна крови: исследователи наблюдали снижение уровней некоторых аналитов в сухой капле крови недостаточного объема, что может быть связано с большей миграцией образца после нанесения на фильтровальную бумагу и, следовательно, с меньшим количеством крови при взятии панча [11].

В настоящей работе были подготовлены сухие пятна крови из цельной крови взрослых лиц с различным объемом наносимого материала (рис. 9, см. 3-ю стр. обложки) и проведена оценка влияния объема цельной крови при подготовке

сухого пятна на определяемые уровни TREC и KREC.

На рисунке 10 представлено сравнение уровней молекул TREC в образцах крови взрослых людей, корректно нанесенной на карты Гатри в разных объемах с последующей экстракцией суммарной ДНК из сухих пятен крови. Вне зависимости от объема крови (одного и того же образца), наносимого на бумажный фильтр, получали сопоставимые результаты. При сравнении медиан, рассчитанных для каждой группы образцов, значимых различий не выявлено ( $p > 0,05$ ).

Показана достоверная корреляция между значениями TREC, определенными в пробах ДНК, экстрагированных из карт Гатри, пропитанных разными объемами крови, полученной от одного и того же индивидуума. Коэффициент корреляции  $R^2 = 0,99$  свидетельствует об очень высокой силе связи полученных данных (рис. 11, см. 3-ю стр. обложки).

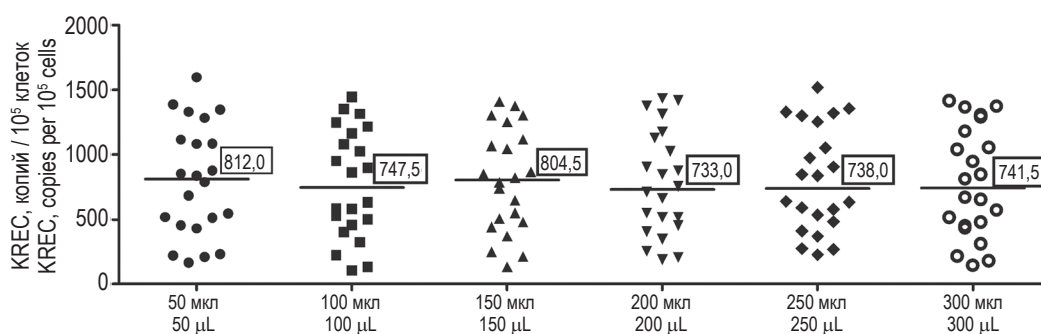


**Рисунок 10.** Сравнение уровней TREC в пробах крови, полученной от людей старше 18 лет, при ее корректном нанесении на карты Гатри в разных объемах и последующей экстракции суммарной ДНК из сухих капель крови

**Примечание.** Числами обозначены медианные значения для каждой группы образцов.

Figure 10. Comparison of TREC levels in blood samples obtained from people over 18 years old when correctly applied to Guthrie cards in different volumes and subsequent extraction of total DNA from dried blood spots

Note. The numbers indicate the median values for each group of samples.



**Рисунок 12.** Сравнение уровней KREC в пробах крови, полученной от людей старше 18 лет, при ее корректном нанесении на карты Гатри в разных объемах и последующей экстракции суммарной ДНК из сухих капель крови

**Примечание.** Числами обозначены медианные значения для каждой группы образцов.

Figure 12. Comparison of KREC levels in blood samples obtained from people over 18 years old when correctly applied to Guthrie cards in different volumes and subsequent extraction of total DNA from dried blood drops

Note. Numbers indicate median values for each group of samples.

Аналогичные результаты получены для уровней KREC: объем крови, нанесенный на карту Гатри с соблюдением рекомендаций, не влияет на определяемую концентрацию анализата при использовании тест-системы TREC/KREC-Amp PS. Между сухими каплями крови, полученными с использованием разных объемов одного и того же образца крови, установлена достоверная корреляция по уровням KREC (отображено на рисунках 12 и 13 (см. 3-ю стр. обложки) соответственно).

Вне зависимости от объема крови (для одного и того же образца), наносимого на бумажный фильтр, получали сопоставимые результаты уровня KREC. При сравнении медиан, рассчитанных для каждой группы образцов, значимых различий не выявлено ( $p > 0,05$ ). Коэффициент корреляции  $R^2 = 0,98$  свидетельствует об очень высокой силе связи полученных данных (рис. 13, см. 3-ю стр. обложки).

Таким образом, при корректном взятии и высушивании образца крови объем использованного материала не оказывает влияния на результаты анализа уровней TREC и KREC в периферической крови. По всей видимости, связано это с тем, что нормировка данных осуществляется с учетом количества клеток крови в исследуемом образце. Однако следует иметь в виду, что сухая капля крови, взятая у младенца в рамках скрининга, предназначена для выполнения большого

количества исследований, а значит, ограничение объема наносимой на карту Гатри крови нежелательно. Трудно точно контролировать размер пятен крови при сборе образцов крови из пятки у новорожденных, скрининговая лаборатория может применять согласованные критерии приемлемости пятен крови и предпочтительно отбирать для перфорации пятна крови соответствующего размера и качества.

## Заключение

Различия пробоподготовки сухих пятен крови, пропитки бумаги существенно влияют на измеряемые концентрации TREC и KREC, анализируемые в рамках программы скрининга новорожденных. При количественном анализе уровней TREC/KREC в периферической крови корректно взятый материал имеет принципиальное значение для получения достоверных показателей, в первую очередь для исключения ложноположительных результатов. Медицинский персонал должен внимательно следить за тем, чтобы все отмеченные окружности на фильтровальной бумаге карты Гатри были заполнены, равномерно пропитаны кровью и корректно высушены. Чтобы свести к минимуму погрешности преаналитического этапа, для контроля и/или корректировки ошибок необходимо дополнительное обучение медицинского персонала.

## Список литературы / References

1. Воронин С.В., Куцев С.И. Неонатальный скрининг на наследственные заболевания в России: вчера, сегодня, завтра // Неонатология: Новости. Мнения. Обучение, 2022. Т. 10, № 4. С. 34-39. [Voronin S.V., Kutsev S.I. Neonatal screening for hereditary diseases in Russia: yesterday, today, and tomorrow. *Neonatologiya: novosti, mneniya, obuchenie. Neonatologiya: Novosti. Mneniya. Obuchenie = Neonatology: News, Opinions, Training*, 2022, Vol. 10, no. 4, pp. 34-39 (In Russ.)]
2. Григорьев К.И., Харитонов Л.А., Радзинский В.Е., Папышева О.В., Котайш Г.А. Перинатальная медицина и проблемы неонатального скрининга // Медицинская сестра, 2017. № 4. С. 3-9. [Grigoryev K.I., Kharitonova L.A., Radzinsky V.E., Papysheva O.V., Kotaish G.A. Perinatal medicine and problems of newborn screening. *Meditsinskaya sestra = Nurse*, 2017, Vol. 4, pp. 3-9. (In Russ.)]
3. Сайтгалина М.А., Любимова Н.Е., Останкова Ю.В., Кузнецова Р.Н., Тотолян Арег А. 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. [Saitgalina M.A., Liubimova N.E., Ostankova Yu.V., Kuznetzova R.N., Totolian Areg A. Determination of reference values for TREC and KREC in circulating blood of the persons over 18 years. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2022, Vol. 24, no. 6, pp. 1227-1236. (In Russ.)] doi:10.15789/1563-0625-DOR-2587.
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 Y.V., Liubimova N.E., Semenov A.V., Kuznetzova R.N., Totolian A.A. Modified quantitative approach for assessing peripheral blood TREC and KREC levels in immunodeficient patients. *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. Bello S., Ferguson C., Wallis R. Improvements to the newborn bloodspot screening service are required to meet national standards. *J. Med. Screen.*, 2010, Vol. 17, no. 3, pp. 114-120.

6. Edelbroek P.M., van der Heijden J., Stolk L.M. Dried blood spot methods in therapeutic drug monitoring: methods, assays, and pitfalls. *Ther. Drug Monit.*, 2009, Vol. 31, no. 3, pp. 327-336.
7. George R.S., Moat S.J. Effect of dried blood spot quality on newborn screening analyte concentrations and recommendations for minimum acceptance criteria for sample analysis. *Clin. Chem.*, 2016, Vol. 62, no. 3, pp. 466-475.
8. Guthrie R., Susi A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics*, 1963, Vol. 32, pp. 338-343.
9. Lawson A.J., Bernstone L., Hall S.K. Newborn screening blood spot analysis in the UK: influence of spot size, punch location and haematocrit. *J. Med. Screen.*, 2016, Vol. 23, no. 1, pp. 7-16.
10. McCabe E.R., Huang S.Z., Seltzer W.K., Law M.L. DNA microextraction from dried blood spots on filter paper blotters: potential applications to newborn screening. *Hum. Genet.*, 1987, Vol. 75, pp. 213-216.
11. Mei J.V., Alexander J.R., Adam B.W., Hannon W.H. Use of filter paper for the collection and analysis of human whole blood specimens. *J. Nutr.*, 2001, Vol. 131, no. 5, pp. 1631S-1636S.
12. Shepherd A.J., Glenesk A., Niven C.A., Mackenzie J. A Scottish study of heel-prick blood sampling in newborn babies. *Midwifery*, 2006, Vol. 22, no. 2, pp. 158-168.
13. Wilcken B., Wiley V. Newborn screening. *Pathology*, 2008, Vol. 40, no. 2, pp. 104-115.

---

**Авторы:**

**Сайтгалина М.А.** — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», 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», Санкт-Петербург, Россия

---

**Authors:**

**Saitgalina M.A.**, Junior 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

**Седых А.В.** – младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», 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»; заведующий кафедрой иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Sedykh A.V.**, Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology Saint Petersburg Pasteur Institute, 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

---

Поступила 14.09.2023  
Принята к печати 15.09.2023

Received 14.09.2023  
Accepted 15.09.2023