

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

Гордукова М.А.¹, Оскорбин И.П.^{2,3}, Мишукова О.В.², Зимин С.Б.¹,
Зиновьева Н.В.¹, Давыдова Н.В.¹, Смирнова А.С.¹, Никитина И.А.¹,
Корсунский И.А.¹, Филипенко М.Л.^{2,3}, Продеус А.П.¹

¹ ГБУЗ «Детская городская клиническая больница № 9 им. Г.Н. Сперанского» ДЗ Москвы, Москва, Россия

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, Россия

³ Новосибирский государственный исследовательский университет, г. Новосибирск, Россия

Резюме. Первичные иммунодефициты (ПИД), тяжелый комбинированный иммунодефицит (ТКИН) и X-сцепленная агаммаглобулинемия, характеризуются отсутствием функциональных Т- и В-лимфоцитов соответственно. Без своевременной ранней диагностики и лечения дети с ПИД страдают от инфекционных заболеваний с тяжелым течением, что приводит к их инвалидизации или смерти.

Цель: разработать и апробировать на группе детей с верифицированными диагнозами ТКИН и X-сцепленной агаммаглобулинемией простую, недорогую, высокопропускную методику на основе количественного определения молекул ДНК TREC и KREC с помощью ПЦР в режиме реального времени.

В настоящем исследовании мы разработали и валидировали метод проведения мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени» для количественного анализа молекул ДНК TREC и KREC. Нами было показано, что в области концентраций от 10^9 коп/мл до 5×10^4 коп/мл для всех мишеней наблюдается линейный диапазон изменения Ct в зависимости от концентрации с коэффициентом корреляции R^2 не хуже 0,98. Наименьшее количество копий, надежно детектиру-

Адрес для переписки:

Гордукова Мария Александровна
ГБУЗ «Детская городская клиническая больница № 9
им. Г.Н. Сперанского
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.N. Speranskiy Children Hospital No 9
123317, Russian Federation, Moscow, Shmitovsky str., 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.П. Оскорбин, О.В. Мишукова, С.Б. Зимин, Н.В. Зиновьева, Н.В. Давыдова, А.С. Смирнова, И.А. Никитина, И.А. Корсунский, М.Л. Филипенко, А.П. Продеус, «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. doi: 10.15789/1563-0625-2015-5-467-478

© Гордукова М.А. и соавт., 2015

For citation:

M.A. Gordukova, I.P. Oskorbin, O.V. Mishukova, S.B. Zimin, N.V. Zinovieva, N.V. Davydova, A.S. Smirnova, I.A. Nikitina, I.A. Korsunsky, M.L. Filipenko, A.P. Prodeus, "Development of real-time multiplex PCR for the quantitative determination of TREC's and KREC's in whole blood and in dried blood spots", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2015, Vol. 17, no. 5, pp. 467-478. doi: 10.15789/1563-0625-2015-5-467-478

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-5-467-478>

емых в одной ПЦР реакции объемом 25 мкл, было: 10 для TREC, 5 для KREC и 5 для внутреннего контроля — локуса IL17RA. Нами определены референсные значения для количества TREC и KREC в цельной крови в зависимости от возраста в группе из 29 мальчиков и 27 девочек с нормальными иммунологическими параметрами. Были определены граничные значения для содержания TREC и KREC в сухих пятнах крови в зависимости от метода экстракции ДНК.

Предложенная методика показала 100% диагностическую чувствительность и специфичность на исследуемой выборке. Метод может быть предложен как скрининговый для диагностики ТКИИ и X-сцепленной агаммаглобулинемии как в цельной крови, так и в сухих пятнах крови. Требуется дальнейшая апробация методики на выборках большего объема.

Ключевые слова: первичный иммунодефицит, диагностика, TREC, KREC, количественная ПЦР

DEVELOPMENT OF REAL-TIME MULTIPLEX PCR FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF TREC'S AND KREC'S IN WHOLE BLOOD AND IN DRIED BLOOD SPOTS

Gordukova M.A.^a, Oskorbin I.P.^{b,c}, Mishukova O.V.^b, Zimin S.B.^a,
Zinovieva N.V.^a, Davydova N.V.^a, Smirnova A.S.^a, Nikitina I.A.^a,
Korsunsky I.A.^a, Filipenko M.L.^{b,c}, Prodeus A.P.^a

^a G.N. Speranskiy Children Hospital No 9, Moscow, Russian Federation

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

^c Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. Primary immunodeficiencies (PID) such as severe combined immunodeficiency (SCID) and X-linked agammaglobulinemia are characterized by the lack of functional T- and B-cells, respectively. Without early diagnosis and prompt treatment children with PID suffer from severe infectious diseases, leading to their death or disability. Our purpose was developing of simple, inexpensive, high throughput technique based on the quantitative determination of TREC and KREC molecules by real-time PCR, and its validation in a group of children with a verified diagnosis of SCID and X-linked agammaglobulinemia.

In this study, we developed and validated multiplex real-time PCR for the TREC's and KREC's quantitative analysis. We have shown that linear range of Ct changes depending on the concentrations of targets with a correlation coefficient R^2 not worse than 0.98 was observed at concentrations from 10^9 to 5×10^4 copies per ml. The lowest amount of targets reliably detected in a reaction volume was 10 TREC's copies, 5 KREC 's copies and 5 copies of internal control (IL17RA). We determined the age-depended reference values of TRECs and KRECs in whole blood in 29 boys and 27 girls with normal immunological parameters. The normal cut-offs for TRECs and KRECs were defined in dry blood spots depending on the method of extraction.

The proposed method showed 100% diagnostic sensitivity and specificity in the studied group. The method can be proposed as a screening tool for the diagnosis of SCID and X-linked agammaglobulinemia both in whole blood and in the dry blood spots. The further investigation is required with larger number of samples.

Keywords: primary immunodeficiency, diagnostics, TREC, KREC, real-time PCR

Сокращения: TRECs — T cell receptor (TCR) excision circles — эксцизионное кольцо Т-клеточного рецептора; KREC- kappa-deleting recombination excision circle — рекомбинационное кольцо каппа-делеционного элемента; ТКИИ — тяжелая комбинированная иммунная недостаточность; ОВИН — обшая вариабельная иммунная недостаточность.

Введение

Созревание функциональных Т- и В-клеток человека сопровождается рекомбинацией и перестройками в генах, кодирующих Т- (TCR) и В- (BCR) клеточные рецепторы [1, 2]. Так, для сборки полноценного Т-клеточного рецептора должна произойти перестройка локуса TCRB, в ходе которой происходит соединение D и J сегмента и последующее присоединение V сегмента, и также слияние V и J сегментов локуса TCRA. При этом образуется третий гипервариабельный домен (CDR3) бета- и альфа-цепи соответственно. Во время каждого из этих процессов вырезаемые участки образуют эксцизионные кольца ДНК, получившие название TRECs (TCR rearrangement excision circles). В соответствии с числом сегментов Va, Ja, Vb, Db и Jb могут образовываться разные типы TRECs: несколько сот различных TRECs при Va-Ja рекомбинации, десятки для Vb-Db и, по крайней мере, 13 для Db-Jb. Во время перестройки TCRA локуса в большинстве незрелых Т-лимфоцитов происходит делеция TCRD локуса, находящегося внутри и фланкированного V и J сегментами. Этот процесс является специфичным и проходит при участии делеционных последовательностей δ Rec и Ψ Ja. Генерируемая при этом кольцевая молекула была названа sjTREC (signal joint TCR rearrangement excision circle), она присутствует практически у всех $\alpha\beta^+$ Т-лимфоцитов, выходящих из тимуса, и, таким образом, может служить суррогатным маркером их количества [3].

Процесс формирования функционального рецептора в В-клетках начинается с рекомбинационных событий в IGH локусе, несущем набор различных Vh, D и Jh сегментов, в котором также генерируется большое количество эксцизионных колец ДНК [4]. Если перестройка прошла правильно, начинается рекомбинация в IGK локусе, кодирующем последовательности легкой каппа-цепи иммуноглобулинов. Она начинается слиянием Vk и Jk сегментов и в дальнейшем может сопровождаться рекомбинацией с участием интронной рекомбинационной последовательности (Jk-Ск intronRSS) и каппа-делеционным элементом (Kde), что делает каппа-локус нефункциональным, ввиду делеции энхансера и константного района [5]. Данная перестройка ведет к образованию рекомбинационного кольца каппа-делеционного элемента, или KREC (kappa-deleting recombination excision circle), ко-

торое присутствует в 30% $Ig\kappa^+$ и почти всех $Ig\lambda^+$ зрелых наивных В-лимфоцитах [5]. ДНК KREC также может быть суррогатным маркером зрелых наивных В-лимфоцитов, а также использоваться для оценки их пролиферативной истории [6].

Количество TREC и KREC может быть оценено с помощью количественной ПЦР с детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ) и, ввиду прямого маркирования зрелых наивных Т- и В-лимфоцитов, имеет высокий диагностический потенциал. Количественный анализ TREC активно применяется для оценки функции тимуса и неогенеза Т-клеток. Он был использован для диагностики иммунодефицитов [7], для неонатального скрининга ПИД у новорожденных [8], и как предиктор восстановления Т-клеточной функции после пересадки костного мозга [9].

Квантификация TREC с помощью ПЦР в режиме реального времени и конструирование плазмиды, несущей фрагмент TREC, необходимой для построения калибровочной кривой, была описана Douek с соавторами еще в 1998 году [3]. В дальнейшем были предложены другие варианты ПЦР-РВ (моноплексные и мультиплексные с мишенью, отражающей количество геном-эквивалентов в исследуемой ДНК), при этом для некоторых из них была проведена достаточно тщательная аналитическая и клиническая валидация.

Например, в работе [10] пытались оценить возможность применения количественного анализа TREC в ДНК, полученной из Guthrie-карточек, применяемых рутинно в скрининге новорожденных (примерно 3 мкл крови). Авторы показали, что тест адекватен для выявления новорожденных детей с ПИД, и в настоящее время он применяется для этих целей в штате Висконсин, США. Для анализа авторы использовали систему, предложенную в работе Douek et al., 1998 [3]. Sottini с соавторами предложили одновременное определение TREC и KREC, но в дуплексном варианте и только с использованием прибора 7500 FastReal-Time PCR (Applied Biosystems) [11]. Авторы декларировали аналитическую чувствительность не менее 10 молекул TREC и KREC в реакции. Borte et al. в 2012 использовали систему Sottini et al., 2010 в триплексном варианте [12]. Однако авторы не привели аналитических характеристик их варианта системы, выставляя довольно низкие уровни отсечения — 15 TRECs/мкл и 10 KRECs/мкл для скрининга врожденных иммунодефицитов. Они также использовали только

приборы ABI 7500 и ViiA7 от Applied Biosystems. Кроме этого, работа содержит явные ошибки и разночтения. Таким образом, описанная авторами система не может быть использована без дальнейшего ее улучшения и адаптации.

Задача, решаемая в нашей работе, заключалась в разработке высокочувствительного метода для одновременного определения концентрации TREC и KREC как в образцах ДНК из периферической крови, так и ДНК, полученной из сухих пятен крови, собираемых в ходе национальной программы скрининга новорожденных.

Материалы и методы

Образцы и экстракция ДНК

Исследование было одобрено этическим ДГКБ № 9 им. Г.Н. Сперанского в последней редакции 25 сентября 2014 года (протокол № 5). От родителей несовершеннолетних пациентов было получено информированное согласие.

Образцы от условно здоровых детей разного возраста без иммунодефицитных состояний были получены из поликлинического отделения ДГКБ №9. Все образцы цельной крови от этих детей были исследованы не только помощью ПЦР-РВ для определения количества TREC и KREC, но и с применением метода проточной цитометрии, а также у них были определены сывороточные иммуноглобулины для того, чтобы подтвердить, что все иммунологические параметры у них находятся в норме по возрасту. Всего было исследовано 29 образцов крови от мальчиков и 27 образцов крови от девочек для определения граничных значений нормы TREC и KREC в цельной крови в зависимости от возраста и метода экстракции ДНК.

Образцы от пациентов с ПИД — ТКИН и X-сцепленной агаммаглобулинемией — были собраны в период с 2007 по 2014 год в отделении иммунопатологии ДГКБ №9. Всего в исследование вошли 8 детей с диагнозом ПИД, ТКИН и 7 детей с X-сцепленной агаммаглобулинемией. При этом всем детям наряду с анализом TREC и KREC стандартно проводились общий анализ крови, иммунофенотипирование и определение сывороточных иммуноглобулинов. Дети с X-сцепленной агаммаглобулинемией получают терапию внутривенными иммуноглобулинами в отделении иммунопатологии ДГКБ № 9, в связи с чем были госпитализированы неоднократно. При каждой госпитализации уровень

IgM и IgA в сыворотке у таких больных не превышал 0,05 г/л. Повторная госпитализация детей с X-сцепленной агаммаглобулинемией дала возможность апробировать предложенный метод оценки копий TREC и KREC в динамике и продемонстрировать стабильность работы этой системы.

В связи с тем, что среди коммерчески доступных наборов реагентов для экстракции ДНК не так много тех, которые позволяют работать с сухими пятнами, с целью выбора набора реагентов и установления нормальных значений TREC и KREC в сухих пятнах были созданы искусственные сухие пятна крови, имитирующие реальные пятна, получаемые в ходе скрининга новорожденных. Для создания таких пятен была взята цельная кровь от условно здоровых детей первого года жизни с известными, нормальными значениями TREC и KREC. Кроме того, этим детям был проведен анализ клеточного иммунного статуса, который доказал, что все показатели у них находились в норме по возрасту. Вместе с тем, для того, чтобы можно было достоверно отличить норму от патологии, для создания сухих пятен крови также применялась кровь с различными количествами копий TREC с шагом в порядок: 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 и 0 копий TREC на 10^5 ДНК-содержащих клеток крови. Цельная кровь в объеме 50 мкл наносилась на чистые карты новорожденных 903 Wallac Russia CE Card (GE Healthcare Bio-Sciences Corp, США), и после высушивания и хранения таких карт в течение недели из карт с помощью дырокола Harris UNI-CORE (Qiagen GmbH, Германия) вырезались одинаковые диски. Из них была выделена ДНК с использованием рекомендованного в зарубежных работах [11, 13] набора QIAamp DNA Investigator Kit (Qiagen GmbH, Германия), а также комплектов реагентов для экстракции РНК/ДНК из клинического материала «АмплиПрайм РИБО-преп» и «АмплиПрайм РИБО-сорб» («НекстБио», Россия). Экстракцию проводили согласно инструкции производителя с некоторыми модификациями, а именно на стадии после лизиса и до стадии преципитации ДНК удаляли из раствора остатки бумаги. Это достигалось путем перенесения лизата на бумагой в другую пробирку, содержащую раствор для преципитации. Дальнейшая процедура экстракции не отличается от инструкции производителя. Объем элюции в случае сухих пятен крови составляет 50 мкл с целью концентрирования образца ввиду малого количества материала.

Нуклеиновые кислоты из образцов цельной крови выделяли «ручным» методом и с помощью автоматической станции. Для «ручной» экстракции использовали комплект реагентов «АмплиПрайм РИБО-преп» («НекстБио», Россия). Объем исследуемого материала составлял 100 мкл, ДНК элюировали также в 100 мкл РНК-буфера, входящего в состав набора реагентов. Для автоматической экстракции ДНК из 200 мкл цельной крови применяли комплект реагентов «Prepito viral NA/gDNA KIT» на станции Prepito (PerkinElmer, США), ДНК элюировали в 80 мкл буфера.

Фенотипическая характеристика пациентов методом проточной цитофлуориметрии

Иммунофенотипирование лимфоцитов (CD3⁺; CD4⁺; CD8⁺; CD16⁺CD56⁺; CD19⁺) осуществляли методом проточной лазерной цитометрии с использованием моноклональных антител фирмы BD Biosciences с помощью проточного цитометра BD FACSCanto™ II (BD Biosciences, Le Pont de Claix), данные анализированы с помощью BD FACSDiva software version 7.0 (BD Biosciences, San Jose, CA).

Получение стандартных плазмидных образцов

Фрагменты TREC, KREC и гена IL17RA для конструирования стандартных образцов амплифицировали с помощью праймеров, приведенных в таблице 1, в следующих условиях: реакционная смесь ПЦР объемом 50 мкл содержала: 1х буфер для Taq-полимеразы (65 mM Tris-HCl (pH 8,9); 16 mM (NH₄)₂SO₄; 0,05% Tween 20; 3,5 mM MgCl₂), 0,2 mM дНТФ, 50 нг геномной ДНК человека, 1 е.а. Taq-полимеразы (Биосан), 0,5 е.а. Pfu-полимеразы (Биосан). Амплификацию проводили в амплификаторе «Терцик» (ДНК-технология) согласно следующей программе: 3 мин при 95 °C начальной денатурации, 35 циклов: 10 с при 95 °C для денатурации, 10 с при 60 °C для гибридизации праймеров, 40 с при 72 °C для элонгации.

Продукты амплификации с праймерами TREC3/TREC4 длиной 1192 п.н., IL17Ra3/IL17-Ra4 длиной 455 п.н. и KREC3/KREC4 длиной 482 п.н. гидролизовали эндонуклеазой рестрикции HindIII (Сибэнзим, г. Новосибирск) и лигировали с вектором pBluscriptII SK(+), гидролизованным той же эндонуклеазой, в течение 3-х часов с 100 ед.акт. Т4 ДНК-лигазы (Биосан). Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* штамма XL1-Blue (Stratagene). У плазмидных клонов, отобранных по результатам рестрикционного анализа, для подтверж-

дения структуры определяли нуклеотидную последовательность вставки секвенированием по методу Сенгера. Секвенирование было выполнено на автоматическом секвенаторе ABI 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) с использованием набора Big dye 3.1 (Центр коллективного пользования «Геномика», ИХБФМ СО РАН). Плазмидные ДНК (pST-TREC, pST-KREC и pST-IL17RA) выделяли из 100 мл ночной культуры в среде LB с помощью QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN) согласно инструкции фирмы-производителя.

Получение калибраторов

Концентрацию полученных стандартных плазмидных ДНК определяли спектрофотометрически и флуориметрически (набор Qubit™ BR, Invitrogen). А именно – 2 мкг ДНК подвергали гидролизу эндонуклеазой рестрикции EcoRI для линейаризации. Полученные линейные стандарты разводили до концентрации 10⁷-10¹ копий плазмидной ДНК на мкл в стерильном буфере, содержащем 10 mM TrisHCl pH7.6 и ДНК фага лямбда 5 нг на мкл. Концентрацию ДНК в полученных стандартах уточняли с использованием цифровой ПЦР на платформе QX100™ Droplet Digital™ PCR System (Bio-Rad, США) согласно инструкциям фирмы-производителя. Для этого готовили 20 мкл ПЦР-смеси, содержащей исследуемую ДНК (< 66 нг на 20 мкл), 1х ПЦР-смесь (Bio-Rad), 300 нМ олигонуклеотидные праймеры и 100 нМ Taq-man зонд. Для получения микрокапель 20 мкл приготовленной ПЦР-смеси и 70 мкл масла для генерации капель помещали в соответствующие лунки картриджа DG8. 40 мкл полученных микрокапель переносили 96-луночную ПЦР плашку, запечатывали фольгой и помещали в амплификатор. Программа амплификации: 96 °C – 10 мин и далее 50 циклов 96 °C – 15 с, 60 °C – 40 с с финальным прогревом в течение 10 мин при 98 °C. После это микрокапли подвергали считыванию с помощью прибора Droplet Reader, полученные данные обрабатывали в программе QuantaSoft (Bio-Rad, США).

Количественный анализ TREC и KREC методом ПЦР-РВ

Для количественного анализа TREC и KREC проводили мультиплексную ПЦР-РВ. Смесь для ПЦР (объемом 25 мкл) содержала олигонуклеотидные праймеры (см. табл. 1) TREC2fo, TREC2re, KREC3 и KREC4 – 0,3 мкМ; IL17RA-U и IL17RA-R – 0,25 мкМ, флуоресцентно-меченные зонды TRECp2 и KREC4p – 0,2 мкМ,

IL17RA-P – 0,15 мкМ, а также 1х буфер для Taq-полимеразы (65 мМ Tris-HCl (pH 8,9); 16 мМ (NH₄)₂SO₄; 0,05% Tween 20; 3,5 мМ MgCl₂), 0,2 мМ дНТФ, 1 е.а. Taq-полимеразы («Биосинтек», Россия) и геномную ДНК человека. Реакцию амплификации проводили в амплификаторах CFX96 (Bio-Rad, США), Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Австралия) и ABI 7500 (Applied Biosystems, США) согласно следующей программе: 15 мин при 95 °С начальной денатурации для активации фермента, 4 цикла: 10 с при 95 °С для денатурации, 30 с при 61 °С для гибридизации праймеров, 15 с при 72 °С для элонгации, далее 39 циклов: 10 с при 95 °С, 30 с при 60 °С, съём флуоресцентного сигнала на каналах FAM/HEX/ROX, 15 с при 72 °С. Для каждого образца анализ проводили в трех повторах, для построения калибровочной кривой использовали стандартные образцы 10⁷, 10⁵, 5 × 10³ копий на мл. Количество копий анализируемых ДНК мишеней рассчитывали по формуле, выведенной из графика калибровочной кривой с помощью программного обеспечения к соответствующему прибору.

Клиническую интерпретацию количества копий TREC/KREC проводили с учетом определенных геном-эквивалентов ядродержащих клеток крови (копии IL17RA) по формуле: Кол-во TREC(KREC) = (кол-во копий TREC(KREC) на мл / кол-во копий IL17RA)*200000 (для экстракции с помощью комплекта реагентов «АмплиПрайм РИБО-преп»).

Результаты

Выбор олигонуклеотидных праймеров и зондов, оптимизация условий мультиплексной ПЦР

На первом этапе работы мы попытались использовать для квантификации TREC в образцах геномной ДНК человека последовательности олигонуклеотидных праймеров и зондов, описанные в работе Baker et al., 2009 [10] (табл. 1). Однако указанная система в нашем исполнении обладала недостаточной эффективностью амплификации (данные не приведены). Праймеры и зонды для ПЦР подобраны с учетом структур TREC и KREC таким образом, чтобы исключить отжиг на матрице геномной ДНК (перестроенной и не перестроенной в Т- и В-лимфоцитах и в любых других клетках человека не лимфоцитарного

ТАБЛИЦА 1. НУКЛЕОТИДНЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ПРАЙМЕРОВ И Taq-man ЗОНДОВ

№	Название	Последовательность
1	TREC2FO	5'-GTGATGCCACATCCCTTTCAA-3'
2	TREC2RE	5'-ACGGTGAATGAAGAGCAGACA-3'
3	TRECP2	5'-FAMCTCTGGTTTTTGTAAAGGTGCC-BHQ-3'
4	KREC3	5'-GTTCTCTTTCCCTTAGTGGA-3'
5	KREC4P	5' – R6G- CCAGCTCTTACCCTAGAGTTTCTG- BHQ-3'
6	KREC4	5'-CTGGGTGGGACTCCAGGA-3'
7	IL17RA-U	5'-CTTGATGCTCTCGCTCTTCG-3'
8	IL17RA-R	5'-TGTAGCCCTGGTCAGACTG-3'
9	IL17RA-P	5'-ROX-CTGCCGCTGCTCCTCCTCG-BHQ-3'
10	IL17-RA3	5'-CCAAAGCTTCTCTGACCCCATCGTGTC-3'
11	IL17-RA4	5'-CCGAAGCTTGAAATAGCGTCTCTTCCTC-3'
12	TREC3	5'-CCAAAGCTTCCTGGTTGACTATGTGTGAC-3'
13	TREC4	5'-GCAAAGCTTCAGAGGTTGGGACAGAAAAG-3'
		Baker et al., 2009
14	TREC1	5'-CACATCCCTTTCAACCATGCT-3'
15	TREC2	5'-GCCAGCTGCAGGGTTTAGG-3'
16	TRECP	5'-FAM-ACACCTCTGGTTTTTGTAAAGGTGCCCCACT-FQ-3'
17	B-ACTINU	5'-ATTTCCCTCTCAGGCATGGA-3'
18	B-ACTINR	5'-CGTCACACTTCATGATGGAGTTG-3'
19	B-ACTINP	5'-R6G-GTGGCATCCACGAAACTA-FQ-3'

ряда), а также с учетом минимизации образуемых в мультиплексной реакции праймер-димеров. При этом пары праймеров подбирались с учетом того, что желаемая длина ампликона лежала в пределах от 80 до 180 п.о.

В результате нами были разработаны 3 пары олигонуклеотидных праймеров (табл. 1) для количественного определения TREC, KREC и гена IL-17a (стандартный однокопийный геномный locus для определения количества геном-эквивалентов ДНК в образце), показывающие приемлемую эффективность амплификации (более 90%) как в моноплексном, так и в мультиплексном варианте проведения ПЦР. Оптимизация условий ПЦР-РВ включала подбор оптимальных концентраций олигонуклеотидных праймеров и зондов, параметров программы амплификации и концентрации ионов магния. Для повышения чувствительности и специфичности ПЦР был применен «горячий старт», который обеспечивается использованием химически модифицированной Taq-полимеразы. Оптимальные параметры разработанной системы приведены в разделе «Материалы и методы».

Аналитическая характеристика разработанной системы для количественного анализа TREC и KREC

Для проверки специфичности разработанной ПЦР использовали ДНК клеточных линий нелимфоидного происхождения, несущих неперестроенные Т- и В-клеточные рецепторы, а именно – HEK293, HeLa, H460, а также образцы гДНК из мочи и слюны. По результатам проведенного тестирования специфичность составила 100%.

Линейный диапазон количественного определения копийности TREC, KREC и IL17RA определяли с помощью ПЦР на разведениях стандартных плазмид от 10^9 коп/мл до 10^3 коп/мл, при этом обращали внимание на коэффициент R^2 и разброс значений St для повторов (рис. 1, см. 3-ю стр. обложки). Нами было показано, что в области концентраций от 10^9 коп/мл до 5×10^4 коп/мл для всех трех мишеней наблюдается линейный диапазон изменения St от концентрации с коэффициентом корреляции R^2 не хуже 0.98. Наименьшее количество копий, надежно детектируемых в одной ПЦР реакции объемом 25 мкл, было: 10 для TREC, 5 для KREC и 5 для IL17RA.

Далее мы оценивали чувствительность системы, моделируя весь процесс анализа крови пациента. Для этого была взята кровь от больного

с ТКИН (возраст 7 мес., фенотип Т-В⁺НК⁻, с содержанием CD3⁺ = 1,1%, абсолютное число – 5 клеток/мкл крови). Анализ ДНК этого пациента с помощью ПЦР не выявил TREC. Были подобраны образцы крови от детей с возрастом до 1 года с количеством CD3⁺ клеток от 60 до 70% (абс. число – 3800-5000 кл/мкл). Для нивелирования эффекта разброса, был приготовлен пулированный образец путем объединения 50 мкл крови от каждого условно здорового донора. Образцы пулированной крови были разбавлены кровью от больного с ТКИН в различных соотношениях от 1% до 100%, и из 100 мкл реконструированных образцов крови была выделена ДНК с использованием комплекта реагентов «АмплиПрайм РИБО-преп». Дальнейший ПЦР-анализ показал, что система может воспроизводимо оценивать количество молекул TREC в модельных образцах крови, содержащих всего 10% крови здоровых детей (табл. 2). Можно заключить, что 10 мкл крови достаточно для проведения подобного анализа.

Аналогичный эксперимент был проведен для мишени KREC. Пулированный образец крови от больных агаммаглобулинемией был получен путем объединения 100 мкл крови 4-х больных, у которых по результатам иммунного фенотипирования полностью отсутствовали В-клетки (CD19⁻) как в процентном, так и в абсолютном исчислении. Усредненный нормальный образец крови был получен путем объединения равных количеств крови от 4-х условно здоровых детей. Искусственно реконструированные образцы крови с разными концентрациями наивных В-лимфоцитов, в результате смешения в разных

ТАБЛИЦА 2. ОЦЕНКА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ РАЗРАБОТАННОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ НА МОДЕЛЬНЫХ ОБРАЗЦАХ КРОВИ, СОДЕРЖАЩИХ РАЗНОЕ ПРОЦЕНТНОЕ СОДЕРЖАНИЕ МОЛЕКУЛ TREC И KREC ОТ НОРМЫ

Кровь здоровые дети, %	100	50	40	30	20	10	5	1
TREC на 10^5 лейкоцитов	$6,15 \times 10^4$	$2,20 \times 10^4$	$1,10 \times 10^4$	$2,53 \times 10^3$	$7,83 \times 10^3$	$2,78 \times 10^3$	$3,09 \times 10^3$	$4,93 \times 10^2$
KREC на 10^5 лейкоцитов	$3,56 \times 10^3$	$4,47 \times 10^3$	$3,25 \times 10^3$	$1,22 \times 10^3$	$2,03 \times 10^3$	$7,25 \times 10^2$	$7,71 \times 10^2$	$1,10 \times 10^2$

пропорциях вышеописанных пулов, были использованы для экстракции ДНК и ПЦР анализа (табл. 2). Предложенная система надежно детектировала мишень KREC при содержании нормальной крови 1%.

Определение референсных значений для TREC и KREC в зависимости от возраста

Для определения референсных значений для TREC и KREC в зависимости от возраста использовали ДНК, полученную из образцов крови от 56 условно здоровых детей (29 мальчиков и 27 девочек) разного возраста с нормальными иммунологическими параметрами (табл. 3).

Нами не было получено статистически значимых различий значений TREC и KREC в зависимости от пола (критерий Краскела–Уоллиса и Джонкхиера–Терпстра, $p > 0,05$), что позволило объединить выборки девочек и мальчиков только по признаку возраста.

Полученные референсные значения приведены в таблицах 4 и 5.

ТАБЛИЦА 3. ОПИСАНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ДЕТЕЙ, ВЫБРАННЫХ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РЕФЕРЕНСНЫХ ЗНАЧЕНИЙ TREC И KREC

	Характеристика	Значения
1	Возраст детей	0-17 лет
2	CD3 ⁺	58-60% 1300-4800 кл/мкл
3	CD3 ⁺ CD4 ⁺	31-54% 700-3500 кл/мкл
4	CD3 ⁺ CD8 ⁺	16-38% 500-1040 кл/мкл
5	CD19 ⁺	16-27% 400-1600 кл/мкл

ТАБЛИЦА 4. ВОЗРАСТНЫЕ НОРМЫ TREC НА 10⁵ КЛЕТОК ЛЕЙКОЦИТОВ

TREC	0-1 год	1-6 лет	6-12 лет	12-18 лет
Макс.	$1,6 \times 10^5$	$3,2 \times 10^5$	$7,9 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4$
Мин.	$1,2 \times 10^5$	$1,4 \times 10^4$	$7,3 \times 10^3$	$2,3 \times 10^3$
Среднее	$1,40 \times 10^5$	$3,38 \times 10^4$	$3,86 \times 10^4$	$5,73 \times 10^3$

ТАБЛИЦА 5. ВОЗРАСТНЫЕ НОРМЫ KREC НА 10⁵ КЛЕТОК ЛЕЙКОЦИТОВ

KREC	0-17 лет
Макс.	$1,0 \times 10^5$
Мин.	$1,0 \times 10^3$
Среднее	$1,0 \times 10^4$

Диагностическая характеристика разработанной системы для количественного анализа TREC и KREC

В связи с отсутствием скрининговой программы в нашей стране, вероятно, большее количество недиагностированных детей с ТКИН погибает на первом году жизни от генерализованных вирусно-бактериальных инфекций ввиду отсутствия проведения специализированного лечения, поэтому, несмотря на описанную частоту встречаемости ТКИН от 1:50000 до 1:100000 новорожденных [8], в коллекции образцов крови от детей с ПИД, собранной с 2007 по 2014 год, было всего 8 образцов от детей с ТКИН. Результаты иммунофенотипирования для них приведены в таблице 7, а результаты количественного определения TREC и KREC — в таблице 8. Для 7 из 8 образцов не было получено сигнала амплификации по каналу TREC, и лишь у одного пациента ЦН были обнаружены TREC в количестве $9,40 \times 10^1$ копий на 10^5 клеток, при норме от $1,2 \times 10^5$ до $1,6 \times 10^5$ коп/10⁵ клеток. Такой результат может быть объяснен ненулевыми количествами CD3⁺CD4⁺, которых было 3%,

ТАБЛИЦА 6. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ TREC И KREC

Исследование и дифференциальная диагностика лимфопений, ТКИН ¹ , ОВИН ² , агаммаглобулинемии и других ИДС, например, синдрома ДиДжорджи, атаксии телеангиэктазии (синдром Луи–Бар), синдрома Оменна, синдрома Вискотта–Олдрича, синдрома Ниймеген
Скрининг новорожденных с использованием сухих пятен крови на ТКИН и агаммаглобулинемию
Изучение нормального развития Т- и В-лимфоцитов
Оценка восстановления иммунной системы после проведения процедуры трансплантации гемопоэтических стволовых клеток костного мозга
Оценка реактивных состояний организма при угрозе жизни пациента (сепсис, менингит)
Изучение ответа на ВААРТ при ВИЧ-инфекции
Оценка возрастных изменений организма и определение возраста (судебная медицина)
Оценка активности аутоиммунного заболевания

Примечание. ¹ – ТКИН – тяжелая комбинированная иммунная недостаточность. ² – ОВИН – общая вариационная иммунная недостаточность.

ТАБЛИЦА 7. ДАННЫЕ ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЯ У ДЕТЕЙ С ПИД, ТКН

Пациент	CD3 ⁺ CD4 ⁺		CD3 ⁺ CD8 ⁺		CD3 ⁺		CD19		CD16 ⁺ CD56 ⁺	
	%	кл/мкл	%	кл/мкл	%	кл/мкл	%	кл/мкл	%	кл/мкл
ДК	0	0	0	0	10	730	74	540	2	15
ЦН	3	85	2	57	5	142	57	1624	24	684
ДИ	0,82	4	0	0	1,1	5	83	378	0,8	4
ТА	0,15	0	0,05	0	0,6	0	73	621	0,7	0
НМ	1,9	4	0	0	2	5	50	113	15	34
ДД	36	673	1	17	40	748	0,5	10	49	916
НГ	0	0	0	1	1,3	2	3	5	77	131
ДН	16,6	161	1	7	17	165	80	775	2	19

ТАБЛИЦА 8. ДАННЫЕ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТРЕС И КРЕС У ДЕТЕЙ С ПИД, ТКН

Пациент	Возраст, лет	Пол	Фенотип	ТРЕС на 10 ⁵ лейкоцитов	КРЕС на 10 ⁵ лейкоцитов
ДК	0,6	м	T-B ⁺ NK ⁻	не обнаружено	2,35 × 10 ¹
ЦН	0,5	м	T-B ⁺ NK ⁺	9,40 × 10 ¹	3,71 × 10 ⁴
ДИ	0,6	м	T-B ⁺ NK ⁻	не обнаружено	1,46 × 10 ⁴
ТА	0,9	м	T-B ⁺ NK ⁺	не обнаружено	2,52 × 10 ³
НМ	2,5	м	T-B ⁺ NK ⁺	не обнаружено	2,58 × 10 ³
ДД	0,3	ж	CD8-B ⁺ NK ⁺	не обнаружено	не обнаружено
НГ	0,1	ж	T-B ⁺ NK ⁺	не обнаружено	1,07 × 10 ¹
ДН	0,4	ж	CD8-B ⁺ NK ⁺	не обнаружено	1,05 × 10 ⁴
Нормальные значения				1,2 × 10 ⁵ – 1,6 × 10 ⁵	1,0 × 10 ³ – 1,0 × 10 ⁵

ТАБЛИЦА 9. РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА ТРЕС И КРЕС В ДИНАМИКЕ У ПАЦИЕНТА ШД С Х-СЦЕПЛЕННОЙ АГАММАГЛОБУЛИНЕМИЕЙ

Дата забора крови	Возраст, лет	ТРЕС на 10 ⁵ лейкоцитов	КРЕС на 10 ⁵ лейкоцитов
13.11.2012	14,8	5,57 × 10 ⁴	не обнаружено
25.04.2013	15,2	2,22 × 10 ⁵	не обнаружено
06.06.2013	15,4	4,26 × 10 ⁴	не обнаружено
22.01.2014	15,9	2,21 × 10 ⁴	не обнаружено
23.12.2014	16,9	1,90 × 10 ⁴	не обнаружено
24.03.2015	17,1	4,19 × 10 ⁴	не обнаружено

ТАБЛИЦА 10. РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА ТРЕС И КРЕС В ДИНАМИКЕ У ПАЦИЕНТА СР С Х-СЦЕПЛЕННОЙ АГАММАГЛОБУЛИНЕМИЕЙ

Дата забора крови	Возраст, лет	ТРЕС на 10 ⁵ лейкоцитов	КРЕС на 10 ⁵ лейкоцитов
21.03.2013	12,7	4,85 × 10 ⁴	не обнаружено
12.11.2013	13,4	3,22 × 10 ⁴	не обнаружено
09.07.2014	14,0	1,75 × 10 ⁴	не обнаружено

что в абсолютном количестве составило 85 клеток на мкл. Из всех образцов ТКИН, у которых отсутствовали Т-хелперы, этот имел самое высокое их количество. В любом случае, выявленные в образце единичные копии TREC позволяли заподозрить серьезный дефицит Т-лимфоцитов у данного пациента. Таким образом, для мишени TREC в случае пациентов с диагнозом ПИД, ТКИН диагностическая чувствительность системы составила 100%. Из группы пациентов с ТКИН двое практически не имели В-лимфоцитов (0,5% и 3%) и имели фенотип CD8-B-NK⁺ и T-B-NK⁺ соответственно. В первом случае результаты амплификации по мишени KREC были отрицательными, а во втором были обнаружены KREC в количестве в 100 раз меньше нижней границы нормы — $1,07 \times 10^1$ копий/ 10^5 клеток при норме $1,0 \times 10^3$ — $1,0 \times 10^5$ копий/ 10^5 клеток.

Анализ количества TREC и KREC в образцах цельной крови от 7-ми детей с X-сцепленной агаммаглобулинемией подтвердил высокую диагностическую чувствительность системы для мишени KREC: ни в одном из случаев не было обнаружено неспецифического сигнала. Во всех случаях результат амплификации по мишени KREC был отрицательным, что полностью согласуется с результатами иммунофенотипирования и клиническими данными. В связи с тем, что мутация в гене ВТК блокирует дифференцировку В-лимфоцитов до этапа созревания функционального В-клеточного рецептора, результаты количественной ПЦР соответствуют ожидаемым. От двух пациентов с X-сцепленной агаммаглобулинемией образцы крови были получены в динамике: 6 образцов за период с 2012 по 2015 год от пациента ШД и 3 образца за 2013-2014 года от пациента СР (табл. 9 и 10). Рутинно проведенное иммунофенотипирование подтвердило отсутствие В-лимфоцитов в периферической крови во всех взятых в динамике образцах, при этом остальные показатели иммунного статуса изменялись согласно возрасту пациентов. Результат количественной ПЦР также во всех случаях не выявил молекул KREC вне зависимости от возраста пациента и даты взятия материала. Таким образом, на коллекционных образцах крови от пациентов с диагнозами ТКИН и X-сцепленная агаммаглобулинемия было показано, что предложенная система обладает высокой диагностической чувствительно-

стью как для мишени TREC, так и для мишени KREC.

Обсуждение

Целью нашей работы являлась разработка простого и производительного метода количественного анализа молекул ДНК TREC и KREC в образцах цельной крови человека и в сухих пятнах. Для этого нами была использована мультиплексная количественная ПЦР в режиме реального времени, в которой для нормировки количества TREC и KREC использовано измерение количества взятых в реакцию геном-эквивалентов ядродержащих клеток за счет измерения количества инвариантного локуса в гене IL17RA. Это также позволяет контролировать этапы экстракции ДНК и проведения ПЦР, отсутствие в образце ингибиторов ПЦР, оценивать адекватность взятия и количество материала.

Использование предложенной системы снижает стоимость анализа за счет мультиплексирования, а стандартизация методики уменьшает время получения результата. Данная методика может быть применима для потокового скрининга большого числа образцов одновременно.

Анализ может быть проведен как с использованием цельной крови, так и с ДНК, полученной из сухих пятен крови, собираемых в ходе национальной программы скрининга новорожденных. В результате амплификации в присутствии калибраторов и количественного подсчета копий TREC и KREC можно отличить Т- и В-клеточные лимфопении у пациентов с ТКИН и агаммаглобулинемией от здоровых новорожденных. Однако низкое число копий TREC и KREC также может быть результатом других иммунодефицитных заболеваний, таких как синдром DiGeorge, либо объясняться применением иммуносупрессивной терапии или незрелостью иммунной системы в случае недоношенных детей. Во всех случаях требуются подтверждающие тесты, а результат оценки копий TREC и KREC используется в комплексной диагностике описанных состояний.

Нормализованные значения TREC и KREC не имели статистически значимых различий по отношению к полу, что соответствует результатам, полученным и опубликованным другими исследователями [11, 14, 15]. Надо отметить, что полученные в нашей пилотной работе возраст-

ные нормы TREC и KREC требуют дальнейшего уточнения. В особенности этому должно быть уделено отдельное внимание при выборе метода выделения ДНК из образцов крови или суших пятен. Например, нами показано (данные не приведены), что нормированные значения TREC и KREC могут отличаться при использовании методов ДНК, основанных на различных физико-химических принципах: преципитации суммарной ДНК спиртами или ее селективной сорбции на силикагеле в растворах хаотропных солей.

Разработанная тест-система может быть использована для решения других клинических задач, в которых затрагиваются механизмы генерации наивных Т- и В- лимфоцитов (см. табл. 6). Однако требуется более тщательное исследование диагностических характеристик предложенной системы на выборках большего объема, в том

числе и для определения более четких границ нормальных значений TREC и KREC в зависимости от возраста.

Выводы

1. Нами разработана тест-система на основе количественной ПЦР в режиме реального времени для скрининга первичных иммунодефицитов у детей:

Чувствительность: 5×10^3 TREC/KREC на мл, специфичность: 100%.

2. Установлены границы нормы по содержанию TREC и KREC у условно здоровых детей.

3. Показана возможность применения данной системы в случае детей с ТКИН и Х-сцепленной агаммаглобулинемией и конкордантность результатов метода «золотого стандарта» — иммунного статуса и предлагаемой тест-системы.

Список литературы / References

1. Alt F.W., Oltz E.M., Young F., Gorman J., Taccioli G., Chen J. VDJ recombination. *Immunology Today*, 1992, Vol. 11, no. 8, pp. 306-214.
2. Blackwell T.K., Alt F.W. Mechanism and developmental program of immunoglobulin gene rearrangement in mammals. *Annual Review of Genetics*, 1989, Vol. 23, pp. 605-636.
3. Douek D.C., McFarland R.D., Keiser P.H., Gage E.A., Massey J.M., Haynes B.F., Polis M.A., Haase A.T., Feinberg M.B., Sullivan J.L., Jamieson B.D., Zack J.A., Picker L.J., Koup R.A. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature*, 1998, Vol. 17, no. 39, pp. 690-695.
4. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature*, 1983, Vol. 302, pp. 575-581.
5. van der Burg M., Tümkaya T., Boerma M., de Bruin-Versteeg S., Langerak A.W., van Dongen J.J. Ordered recombination of immunoglobulin light chain genes occurs at the IGK locus but seems less strict at the IGL locus. *Blood*, 2001, Vol. 97, pp. 1001-1008.
6. van Zelm M.C., Szczepanski T., van der Burg M., van Dongen J.J. Replication history of B lymphocytes reveals homeostatic proliferation and extensive antigen-induced B cell expansion. *The Journal of Experimental Medicine*, 2007, Vol. 204, pp. 645-655.
7. Amariglio N., Lev A., Simon A., Rosenthal E., Spier Z., Efrati O., Broides A., Rechavi G., Somech R. Molecular assessment of thymus capabilities in the evaluation of T-cell immunodeficiency. *Pediatric Research*, 2010, Vol. 67, no. 2, pp. 211-216.
8. Puck J.M., SCID Newborn Screening Working Group. Population-based newborn screening for severe combined immunodeficiency: steps toward implementation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2007, Vol. 120, no. 4, pp. 760-768.
9. Roifman C.M., Somech R., Grunebaum E. Matched unrelated bone marrow transplant for T⁺ combined immunodeficiency. *Bone Marrow Transplantation*, 2008, Vol. 41, pp. 947-952.
10. Baker M.W., Grossman W.J., Laessig R.H., Hoffman G.L., Brokopp C.D., Kurtycz D.F., Cogley M.F., Litsheim T.J., Katcher M.L., Routes J.M. Development of a routine newborn screening protocol for severe combined immunodeficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2009, Vol. 124, no. 3, pp. 522-527.
11. Sottini A., Ghidini C., Zanotti C., Chiarini M., Caimi L., Lanfranchi A., Moratto D., Porta F., Imberti L. Simultaneous quantification of recent thymic T-cell and bone marrow B-cell emigrants in patients with primary immunodeficiency undergone to stem cell transplantation. *Clinical Immunology*, 2010, Vol. 136, no 2, pp. 217-227.
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, no 11, pp. 2552-2555.

13. Lang P.O., Govind S., Dramé M., Aspinall R. Comparison of manual and automated DNA purification for measuring TREC in dried blood spot (DBS) samples with qPCR. *Journal of Immunological Methods*, 2012, Vol. 384, no. 1-2, pp. 118-127.
14. Ou X., Zhao H., Sun H., Yang Z., Xie B., Shi Y., Wu X. Detection and quantification of the age-related sjTREC decline in human peripheral blood. *International Journal of Legal Medicine*, 2011, Vol. 125, pp. 603-608.
15. Ou X.L., Gao J., Wang H., Wang H.S., Lu H.L., Sun H.Y. Predicting human age with bloodstains by sjTREC quantification. *PLoS ONE*, 2012, Vol. 7, no. 8, p. e42412.

Авторы:

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

Оскорбин И.П. — аспирант кафедры молекулярной биологии, Новосибирский государственный исследовательский университет, г. Новосибирск, Россия

Мишукова О.В. — младший научный сотрудник лаборатории фармакогеномики, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, Россия

Зимин С.Б. — заведующий отделением иммунопатологии ГБУЗ «Детская городская клиническая больница № 9 им. Г.Н. Сперанского» ДЗ Москвы, Москва, Россия

Зиновьева Н.В. — к.м.н., заведующая отделением аллергологии и иммунологии КДП ГБУЗ «Детская городская клиническая больница № 9 им. Г.Н. Сперанского» ДЗ Москвы, Москва, Россия

Давыдова Н.В. — к.м.н., врач клинической диагностической лаборатории ГБУЗ «Детская городская клиническая больница № 9 им. Г.Н. Сперанского» ДЗ Москвы, Москва, Россия

Смирнова А.С. — врач клинической диагностической лаборатории ГБУЗ «Детская городская клиническая больница № 9 им. Г.Н. Сперанского» ДЗ Москвы, Москва, Россия

Никитина И.А. — заведующая учебной лабораторией кафедры факультетской педиатрии № 2 педиатрического факультета РНИМУ им. Пирогова на базе ГБУЗ «Детская городская клиническая больница № 9 им. Г.Н. Сперанского» ДЗ Москвы, Москва, Россия

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

Филипенко М.Л. — к.б.н., заведующий лабораторией фармакогеномики, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; заведующий лабораторией палеогенетики, Новосибирский государственный исследовательский университет, г. Новосибирск, Россия

Продеус А.П. — д.м.н., профессор, заместитель главного врача по инфекционным болезням ГБУЗ «Детская городская клиническая больница № 9 им. Г.Н. Сперанского» ДЗ Москвы, Москва, Россия

Authors:

Gordukova M.A., Biologist, Clinical Diagnostic Laboratory, G.N. Speranskiy Children Hospital No 9, Moscow, Russian Federation

Oskorbin I.P., Graduate Student, Department of Molecular Biology, Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation

Mishukova O.V., Junior Research Associate, Pharmacogenomics Laboratory, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Zimin S.B., Head, Department of Immunopathology, G.N. Speranskiy Children Hospital No 9, Moscow, Russian Federation

Zinovieva N.V., PhD (Medicine), Head, Allergy and Immunology Department, G.N. Speranskiy Children Hospital No 9, Moscow, Russian Federation

Davydova N.V., PhD (Medicine), Doctor, Clinical Diagnostic Laboratory, G.N. Speranskiy Children Hospital No 9, Moscow, Russian Federation

Smirnova A.S., Doctor, Clinical Diagnostic Laboratory, G.N. Speranskiy Children Hospital No 9, Moscow, Russian Federation

Nikitina I.A., Head, Training Laboratory of Faculty of Pediatrics № 2 of Pirogov Russian National Research Medical University, G.N. Speranskiy Children Hospital No 9, Moscow, Russian Federation

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

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

Prodeus A.P., PhD, MD (Medicine), Professor, Deputy Chief of Infectious Diseases, G.N. Speranskiy Children Hospital No 9, Moscow, Russian Federation

Поступила 12.06.2015
Отправлена на доработку 29.06.2015
Принята к печати 06.07.2015

Received 12.06.2015
Revision received 29.06.2015
Accepted 06.07.2015