

МОДИФИЦИРОВАННЫЙ МЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЕЙ TREC И KREC В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ С ИММУНОДЕФИЦИТНЫМИ СОСТОЯНИЯМИ

М.А. Сайтгалина¹, Ю.В. Останкова¹, Н.Е. Любимова¹, А.В. Семенов²,
Р.Н. Кузнецова^{1,3}, А.А. Тотолян^{1,3}

¹ ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

² Екатеринбургский НИИ вирусных инфекций ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, г. Екатеринбург, Россия

³ ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Введение. Иммунный статус представляет собой комплексный показатель состояния иммунной системы, это количественная и качественная характеристика состояния функциональной активности органов иммунной системы и некоторых неспецифических механизмов противомикробной защиты. В качестве суррогатных маркеров созревания Т- и В-клеток может служить содержание в периферической крови, соответственно, Т-рецепторных эксцизионных колец (TREC) и В-клеточных эксцизионных колец (KREC). В настоящее время к недостаткам представленных на рынке диагностических наборов следует отнести два фактора: направленность наборов на диагностику иммунодефицитных состояний только у новорожденных и детей, в то время как взрослые пациенты остаются не охвачены; существенным недостатком является использование для нормирования данных одного эталонного нормировочного гена, в результате чего повышается вариабельность и снижается чувствительность результатов анализа. Цель: разработать высокочувствительный метод лабораторной оценки состояния иммунитета пациентов с использованием ПЦР в режиме реального времени на основе определения концентрации TREC и KREC у детей и взрослых. *Материалы и методы.* В работе использованы образцы цельной крови и сухой капли крови, полученные от новорожденных и взрослых людей, в том числе от условно здоровых лиц, а также от пациентов с диагностированными ПИД и ВИЧ-инфицированных больных. Общий объем выборки — 2577 человек. В качестве методов сравнения использовали коммерческие наборы. *Результаты.* Проводили мультиплексную ПЦР, анализируя количество целевых молекул TREC и KREC, а также фрагментов нормировочных генов HPRT и RPP30 с использованием разработанной серии плазмидных калибраторов. Аналитический диапазон измерений ДНК TREC/KREC составил от 10³ до 10⁹ копий/мл. Точность измерений на приборе планшетного типа (CFX) составила

Адрес для переписки:

Останкова Юлия Владимировна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.
Тел.: 8 921 353-81-73.
E-mail: shenna1@yandex.ru

Contacts:

Yuliia V. Ostankova
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 921 353-81-73.
E-mail: shenna1@yandex.ru

Для цитирования:

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. doi: 10.15789/2220-7619-MMF-2039

Citation:

Saitgalina M.A., Ostankova Yu.V., Liubimova N.E., Semenov A.V.,
Kuznetsova R.N., Totolian A.A. Modified quantitative approach for assessing
peripheral blood TREC and KREC levels in immunodeficient patients //
Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022,
vol. 12, no. 5, pp. 981–996. doi: 10.15789/2220-7619-MMF-2039

Отраслевая НИР «Изучение механизмов формирования иммунного ответа на новую коронавирусную инфекцию, вызванную SARS-CoV-2
у населения Северо-Западного Федерального округа» № АААА-А21-121030200299-3.

Research project "Study of mechanisms of formation of immune response to new coronavirus infection caused by SARS-CoV-2
in population of North-West Federal District" No. АААА21-121030200299-3.

95,84%, на приборе роторного типа (Rotor-Gene 3000) — 95,11%, что соответствует нормативному показателю. Показана эквивалентность получаемых результатов при работе с цельной кровью и сухими каплями крови. Анализ результатов исследуемой выборки позволил определить 100%-ную диагностическую специфичность и чувствительность метода. *Заключение.* Метод позволяет диагностировать снижение Т- и/или В-клеточного иммунитета у детей и взрослых, и может быть применен для детекции молекул TREC и KREC как в образцах цельной периферической крови, так и в сухой капле крови с использованием карт Гатри. При этом возможно применение единых значений референсных норм, независимо от анализируемого клинического материала. Результаты испытаний свидетельствуют о возможности эффективного использования мультиплексной ПЦР-диагностики как для комплексного первичного тестирования/скрининга новорожденных, так и для оценки состояния иммунитета в целях выявления взрослых больных ПИД и в рамках диагностики пациентов со вторичными иммунодефицитами, например, с инфекцией ВИЧ.

Ключевые слова: иммунный статус, иммунодефицит, TREC, KREC, метод диагностики.

MODIFIED QUANTITATIVE APPROACH FOR ASSESSING PERIPHERAL BLOOD TREC AND KREC LEVELS IN IMMUNODEFICIENT PATIENTS

Saitgalina M.A.^a, Ostankova Yu.V.^a, Liubimova N.E.^a, Semenov A.V.^b, Kuznetsova R.N.^{a,c}, Totolian A.A.^{a,c}

^a St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

^b Ekaterinburg Research Institute of Viral Infections of SRC VB Vector of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Ekaterinburg, Russian Federation

^c I.P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University of the Ministry of Healthcare of Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. *Introduction.* The immune status is a multifaceted parameter quantitatively and qualitatively analyzing functional activity immune system state in immune organs as well as some non-specific mechanisms of antimicrobial protection. Peripheral blood level of T-receptor excision rings (TREC) and B-cell excision rings (KREC), respectively, can serve as surrogate markers of T- and B-cell maturation. Currently, the diagnostic kits available on the market have two significant disadvantages: i) the kits are aimed at diagnosing immunodeficiency conditions only in newborns and children, while keeping adult patients uncovered; ii) essentially, use solely single reference normalization gene for data normalization resulting in increased variability and decreased sensitivity of the assay data. The aim: to develop a highly sensitive method for laboratory assessment of the state of immunity in immunodeficient patients by using real-time PCR for assessing TREC and KREC level in children and adults. *Materials and methods.* There were used whole blood and dry blood spot samples obtained from newborns and adults, apparently healthy individuals as well as patients with verified PID and HIV-infection. A total of 2577 samples were examined. Commercial kits were used as comparison methods. *Results.* Multiplex PCR was carried out, analyzing the number of target molecules TREC and KREC, as well as fragments of the HPRT and RPP30 normalization genes analyzed with the developed series of plasmid calibrators. The established analytical range of TREC/KREC DNA measurements comprised 10^3 to 10^9 copies/mL. The accuracy of measurements on a tablet-type instrument (CFX) was 95.84%, on a rotary-type instrument (Rotor-Gene 3000) — 95.11%, which corresponds to the standard indicator. The equivalence between the data obtained after assessing whole blood samples and dry blood drops was shown. The data analysis allowed to find out 100%-diagnostic specificity and sensitivity of the method proposed. *Conclusion.* The method developed by us allows to diagnose decline in T- and/or B-cell immunity in children and adults and can be used to detect TREC and KREC molecules both in peripheral whole blood samples and dry blood spots using Guthrie cards. Moreover, the uniform values of reference norms can be used regardless of the type of analyzed clinical material. The study data evidence about potential for effective use of multiplex PCR diagnostics both for complex primary testing/screening of newborns and assessing state of immunity to identify adult patients with PID and as a part of the diagnostic monitoring of patients with secondary immunodeficiencies, e.g., HIV infection.

Key words: immune status, immunodeficiency, TREC, KREC, diagnostic method.

Введение

Иммунный статус представляет собой комплексный показатель состояния иммунной системы, это количественная и качественная характеристика состояния функциональной активности органов иммунной системы и некоторых неспецифических механизмов противомикробной защиты.

Иммунодефицитные состояния характеризуются полным или частичным отсутствием Т- или В-клеток, а также натуральных киллеров, или ослаблением функций этих клеток [27]. В качестве суррогатных маркеров созревания Т- и В-клеток и функциональной активности соответствующих звеньев иммунной системы может служить содержание в периферической крови, соответственно, Т-рецепторных эксци-

зионных колец (T-cell receptor excision circles — TREC) и В-клеточных эксцизионных колец (kappa-deleting recombination excision circles — KREC), формирующихся в процессе V(D)J-реарранжировки, в результате которой часть генетического материала вырезается и замыкается в кольцо [27, 23]. TREC служат маркерами созревания Т-клеток, недавно эмигрировавших из тимуса и слабо вовлекавшихся в процесс пролиферации или не делившихся совсем. В связи с этим концентрацию TREC в периферической крови рассматривают как показатель функциональной активности тимуса — его способности продуцировать Т-лимфоциты. В ходе пролиферации клеток иммунной системы эксцизионные кольца остаются в одной из дочерних клеток, что позволяет использовать их в качестве показателя пролиферации лимфоцитов и сурrogатный маркер нормального развития иммунной системы. Содержание KREC в периферической крови является маркером эффективности развития В-клеточного звена иммунной системы в процессе эмбриогенеза.

Полное или частичное отсутствие (снижение уровня) Т- и/или В-клеток у новорожденных определяется при первичных иммунодефицитах (ПИД), трисомиях по 21 и 18 хромосомам, различных цитогенетических мутациях, а также при недоношенности младенцев, в том числе при плановом кесаревом сечении (КС). Врожденные аномалии, включая пороки сердца, пороки развития ЖКТ, множественные врожденные пороки развития, а также преждевременные роды могут быть связаны со вторичной лимфопенией младенцев. Современная стратегия развития скрининга новорожденных связана с максимально ранним, в идеале сразу после рождения, выявлением иммунодефицитов, связанных с нарушением пролиферации Т- и В-клеток. В случае генетически обусловленных заболеваний, таких как ПИД, отсутствие функциональных Т- и/или В-лимфоцитов служит диагностическим критерием, в случае преждевременных родов и КС оценка содержания Т- и/или В-лимфоцитов может служить прогностическим маркером. И в том, и в другом случае выявление и оценка уровня TREC и KREC может применяться для скрининга новорожденных.

У взрослых пациентов снижение уровней Т- и/или В-клеток может быть определено при выявлении ПИД, поздняя диагностика которых связана с разнообразной и преимущественно сглаженной клинической картиной заболевания, например при селективном IgA-дефиците, общей вариабельной иммунной недостаточности (ОВИН), являющихся наиболее частыми впервые выявляемыми формами ПИД у лиц старше 18 лет [7]. Так, например, описано применение анализа уровней TREC и KREC у взрослых па-

циентов с ОВИН и выявление его ассоциации с тяжестью течения заболевания; показано, что у взрослых больных с синдромом Ди Джорджи при нормальных уровнях KREC уровни TREC достоверно снижены [10, 14]. Кроме того, полное или частичное отсутствие Т- и/или В-клеток у взрослых может быть связано с развитием СПИД у инфицированных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), развитием злокачественных заболеваний кроветворной системы, а также показано при трансплантации стволовых клеток [13, 22, 26].

Таким образом, определение уровней TREC и KREC для ранней диагностики первичных и вторичных иммунодефицитных состояний в клинической практике может дать ценную диагностическую и прогностическую информацию в отношении широкого спектра заболеваний, связанных с нарушением Т- и/или В-клеточного звена иммунитета как у детей, так и у взрослых людей, позволяя выявлять пациентов нуждающихся в углубленном обследовании и своевременно назначать адекватную терапию [4]. Количественная оценка уровней TREC и KREC высокоинформативна и может быть легко внедрена в рутинную лабораторную практику [16].

В настоящее время к недостаткам представленных на рынке диагностических наборов следует отнести два фактора. Во-первых, направленность наборов на диагностику иммунодефицитных состояний только у новорожденных и детей, в то время как взрослые пациенты остаются не охвачены [2]. Во-вторых, существенным недостатком является использование для нормирования данных одного эталонного нормировочного гена, в результате чего повышается вариабельность и снижается чувствительность результатов анализа, так как не существует идеального нормировочного гена, постоянного в независимости от ткани и состояния клеток в анализируемом образце. В связи с этим выбор эталонного гена является одним из самых ответственных этапов при разработке анализа. Оптимальным можно считать подход, при котором одновременно используются два и более эталонных гена [9].

Целью настоящей нашей работы была разработка высокочувствительного метода лабораторной оценки состояния иммунитета пациентов с использованием ПЦР в режиме реального времени на основе определения концентрации TREC и KREC у детей и взрослых.

Материалы и методы

Материалы

В работе были использованы следующие образцы от лиц, проживающих на территории Санкт-Петербурга и Ленинградской области:

157 образцов пуповинной крови новорожденных, 2000 образцов сухой капли крови на картах Гатри, полученных от здоровых доношенных новорожденных на 3–4 день жизни, 300 образцов, полученных от условно здоровых лиц старше 18 лет в виде цельной крови и сухой капли крови на картах Гатри одновременно. Были проанализированы также образцы от пациентов с диагностированными первичными иммунодефицитами: 10 образцов сухой капли крови от детей и 10 образцов в виде цельной крови и сухой капли крови на картах Гатри одновременно от больных старше 18 лет.

Среди детей с установленными первичными иммунодефицитами присутствовали пациенты с тяжелой комбинированной иммунной недостаточностью (ТКИН), транзиторной гипогаммаглобулинемией детского возраста, синдромом CHARGE, а также с недифференцированными ПИД, сопровождающимися пневмониями, неонатальными сепсисами, лимфоцитопениями. Все исследованные пациенты старше 18 лет имели установленный диагноз ОВИН.

Дополнительно исследовали образцы цельной крови, полученные от ВИЧ-инфицированных лиц. Представлены 100 образцов от пациентов 18–65 лет, проживающих в Северо-Западном федеральном округе, в том числе от 25 мужчин и 25 женщин с впервые выявленным ВИЧ и подтвержденным сроком инфицирования менее одного года, а также от 25 мужчин и 25 женщин, инфицированных ВИЧ не менее пяти лет, с высокой вирусной нагрузкой и вирусологически неэффективной антиретровирусной терапией (АРТ).

Методы

Методы сравнения

В качестве сравнительных методов использовали две диагностические системы: коммерческий набор «EnLite™ TREC-KREC kit» (PerkinElmer, Финляндия) и зарегистрированный в РФ диагностический набор «ИММУНО-БИТ» (АБВ-Тест, Москва).

Набор реагентов «EnLite™ TREC-KREC kit» (PerkinElmer, Финляндия). Набор предназначен для полуколичественного определения ДНК TREC и KREC у новорожденных в образцах крови, высушенной на фильтровальной бумаге. Определение уровней TREC и KREC осуществляется методом ПЦР в режиме реального времени с гибридационно-флуоресцентной детекцией с последующим пересчетом абсолютных количеств целевых молекул на нормировочный ген бета-актина (BetaActin), с использованием специального термоциклера «VICTOR™ EnLite» (PerkinElmer, Финляндия). Полученные результаты представляют в копи-

ях на мкл. Определены нижние границы для TREC и KREC при использовании набора — 33 и 46 копий/мкл соответственно. Указанный набор не зарегистрирован в Российской Федерации в качестве медицинского изделия, однако широко применяется в странах Европы и в США [12, 17].

Набор реагентов «ИММУНО-БИТ» (АБВ-Тест, Москва). Набор зарегистрирован в РФ в качестве медицинского изделия, предназначен для определения уровней TREC и KREC у новорожденных и детей в цельной крови и сухой капле крови. Определение уровней TREC и KREC осуществляется методом ПЦР в режиме реального времени с гибридационно-флуоресцентной детекцией с последующим пересчетом абсолютных количеств целевых молекул на нормировочный ген сывороточного альбумина (ALB). Полученные результаты представляют в копиях на 10^5 клеток.

Указанные нижние границы нормы целевых молекул при использовании набора различаются для образцов ДНК, экстрагированных из цельной крови (TREC — 200 копий/ 10^5 клеток для детей в возрасте от 0 до 1 года, 80 копий/ 10^5 клеток — от 1 года до 6 лет, 30 копий/ 10^5 клеток от 6 до 18 лет; KREC — 250 копий/ 10^5 клеток для детей в возрасте от 0 до 1 года, 100 копий/ 10^5 клеток — от 1 года до 6 лет, 40 копий/ 10^5 клеток от 6 до 18 лет) и из сухой капли крови (TREC — 450 копий/ 10^5 клеток, KREC — 250 копий/ 10^5 клеток для новорожденных) [1].

Модифицированный метод

Выделение нуклеиновых кислот. Экстракцию ДНК проводили с помощью двух коммерческих комплектов реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала: «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия) и «Экстра-ДНК-Био» (Алкор-Био, Россия), согласно инструкциям производителей.

Аmplификация целевых и нормировочных генов. В образце ДНК, выделенном из цельной крови или из капли сухой крови, определяли количество целевых молекул ДНК TREC, KREC и двух эталонных нормировочных генов «домашнего хозяйства» — ген гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы человека (HPRT) и ген белковой субъединицы р30 рибонуклеазы Р (RPP30) с использованием олигонуклеотидов и соответствующих олигонуклеотидных флуоресцентно меченых зондов (табл. 1).

Для ПЦР в общем виде использовали следующий состав амплификационной смеси: буферный раствор, содержащий Трис-НСl pH 8,8 (при 25°C), KCl, 6–7 мМ MgCl₂, дезоксинуклеозидтрифосфаты, глицерол, Tween 20, SynTaq ДНК-полимераза с ингибирующими активностью фермента антителами (или 1 ед. рекомбинантной Taq ДНК-полимераза или Hot-start

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров и зондов, использованные для выявления ДНК TREC, KREC и двух эталонных нормировочных генов HPRT и RPP30 методом ПЦР в режиме реального времени

Table 1. Primer and probe nucleotide sequences used to detect the DNA TREC, KREC as well as two reference normalization genes HPRT and RPP30 using real-time PCR

Праймер Primer	Нуклеотидная последовательность Nucleotide sequence
TRECF	5'-CACATCCCTTTCAACCATGCT-3'
TRECR	5'-TGCAGGTGCCTATGCATCA-3'
TRECzondFAM	5'-FAM-CACCTCTGGTTTTGTAAAGGTGCCC-RTQ1/BHQ1-3'
KRECF	5'-TCCCTTAGTGGCATTATTTGTATCACT-3'
KRECR	5'-AGGAGCCAGCTCTTACCCTAGAGT-3'
KRECzondHEX	5'-HEX-TCTGCACGGGCAGCAGGTTGG-BHQ1-3'
HPRTF	5'-CTTGCTCGAGATGTGATGAAGG-3'
HPRTR	5'-CAGCAGGTCAGCAAAGAATTTATAG-3'
HPRT-zondCy5	5'-Cy5-ATCACATTGTAGCCCTCTGTGTGCTCAAGG-RTQ2/BHQ2-3'
RPP30F	5'-TTTGGACCTGCGAGCG-3'
RPP30R	5'-GAGCGGCTGTCTCCACAAGT-3'
RPP30-zondROX	5'-ROX-TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG-RTQ2/BHQ2-3'

Тaq ДНК-полимеразы), вода без нуклеаз до конечного объема 15 мкл.

ПЦР проводили на амплификаторах с функцией детекции флуоресценции в режиме реального времени по каналам HEX/Yellow, FAM/Green, ROX/Orange и Cy5/Red планшетного типа (например, CFX96) или роторного типа (например, Rotor-Gene 3000/6000) при указанных в табл. 2 условиях. Регистрировали полученные результаты посредством гибридно-флуоресцентной детекции с помощью программного обеспечения используемых приборов.

Оценка результатов амплификации. Анализировали кривые накопления флуоресцентного сигнала по четырем каналам: по каналу для флуорофора FAM/Green — сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК TREC; по каналу для флуорофора HEX/Yellow — сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК KREC; по каналу для флуорофора ROX/Orange сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК RPP30; по каналу для флуорофора Cy5/Red сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК HPRT. Результаты интерпретировали на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (устанавливается в середине линейного участка прироста флуоресценции положительного контроля в логарифмической шкале), что определяло наличие (или отсутствие) для данной пробы значения порогового цикла C_t в соответствующей графе в таблице результатов.

Подготовка калибраторов. Для получения калибраторов и последующего определения уровней TREC и KREC использовали плазмиду, несущую синтетическую последовательность, соответствующую выявляемым фрагментам целевых молекул ДНК TREC, KREC и двух эталонных нормировочных генов HPRT и RPP30 со спейсерами между ними.

Полученную от производителя навеску плазмидной ДНК разводили ТЕ-буфером, ис-

Таблица 2. Параметры программы амплификации на приборах CFX96 (Bio-Rad, США) и Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия)

Table 2. Amplification setup parameters for CFX96 cycler (Bio-Rad, USA) and Rotor-Gene 3000/6000 cycler (Corbett Research, Australia)

Цикл Cycle	Температура, °C Temperature, °C	Время Time	Измерение флуоресценции Fluorescence measurement	Количество циклов Number of cycles
1	95	15 мин/15 min		1
2	95	10 с/10 s		5
	61	30 с/30 s		
	72	15 с/15 s		
3	95	10 с/10 s	HEX/Yellow, FAM/Green, Cy5/Red, ROX/Orange	40
	60	30 с/30 s		
	72	15 с/15 s		

ходя из указанной в паспорте производителем концентрации плазмиды и ее протяженности, составляющей 3370 нуклеотидов, получая препарат плазмиды с приблизительной концентрацией 10^{10} копий/мл. Готовили последовательные десятикратные разведения препарата плазмиды с концентрациями 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 копий/мл в ТЕ буферном растворе. Для предварительной оценки концентрации образцов плазмидной ДНК использовали цифровую ПЦР, позволяющую провести точную (вплоть до 1 копии на 100 000) количественную оценку представленности того или иного участка ДНК в образце без использования калибровочных кривых. При этом в ходе работы реакционная смесь распрыскивалась на множество мельчайших капель (более 20 тысяч), в каждой из которых протекала индивидуальная ПЦР. Интересующую мишень амплифицировали, после чего подсчитывали положительные (присутствовала представляющая интерес последовательность мишени) и отрицательные (отсутствовала представляющая интерес последовательность мишени) реакции для абсолютного количественного определения интересующих молекулярных мишеней. Методом цифровой ПЦР определяли точную концентрацию (копий/мл) в препаратах плазмиды с предположительными концентрациями 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 и относительно данных образцов проводили калибровку серии разведений плазмиды. Из серии разведений отбирали препараты плазмид с концентрациями $1-9 \times 10^8$, $1-9 \times 10^7$, $1-9 \times 10^6$, $1-9 \times 10^5$, $1-9 \times 10^4$ копий/мл и присваивали полученным разведениям наименования, соответственно, — Калибратор К1, Калибратор К2, Калибратор К3, Калибратор К4, Калибратор К5.

Количественная оценка уровней TREC и KREC. Для количественной оценки уровней TREC и KREC параллельно постановке ПЦР в анализируемых образцах проводили постановку ПЦР для калибраторов с известными концентрациями.

Уровень ДНК TREC и KREC определяли в копиях на миллилитр и в копиях на 10^5 клеток. Расчет уровней целевых молекул осуществляли с использованием следующих формул.

Эффективность ПЦР:

$$E = 10^{\frac{1}{\alpha}},$$

где E — эффективность, α — коэффициент из уравнения $y = \alpha x + b$, получаемого при аппроксимации зависимости порогового цикла от концентрации матрицы в образце.

Коэффициент пропорциональности:

$$\alpha = \frac{F_{Ct}}{C_0 \times E^{Ct}},$$

где α — коэффициент пропорциональности, C_t — пороговый цикл, C_0 — исходная концентра-

ция, F_{Ct} — уровень пороговой линии (флуоресценция в пороговом цикле), E — эффективность.

$$\alpha_m = \frac{\alpha_1 + \alpha_2 + \alpha_3 + \alpha_4 + \alpha_5}{5},$$

где α_m — α средняя для флуорофора, α_{1-5} — α для каждого калибратора.

Концентрация целевых молекул в копиях на мл:

$$C_0 = \frac{F_{Ct}}{\alpha_m \times E^{Ct}},$$

где C_0 — исходная концентрация, α_m — α средняя для флуорофора, C_t — пороговый цикл, F_{Ct} — уровень пороговой линии (флуоресценция в пороговом цикле), E — эффективность.

Концентрация целевых молекул в копиях на 100 тыс. клеток: $C_{10^5} = ((4 \times C_0)/C_{HPRT} + C_{RPP30}) \times 10^5$ для женского пола и $C_{10^5} = ((4 \times C_0)/2C_{HPRT} + C_{RPP30}) \times 10^5$ для мужского пола, соответственно, где C_{10^5} — количество TREC или KREC на 100 тыс. ядросодержащих клеток, C_0 — исходная концентрация TREC или KREC в миллилитре образца, C_{HPRT} — исходная концентрация HPRT в миллилитре образца, C_{RPP30} — исходная концентрация RPP30 в миллилитре образца.

Аналитическая специфичность. Оценку аналитической специфичности проводили в ходе анализа *in silico* с помощью алгоритма BLASTn специфических нуклеотидных последовательностей фрагментов целевых генов TREC и KREC, а также RPP30 и HPRT, используемых в качестве внутреннего контроля, являющихся генетическими мишенями для ПЦР, с представленными в международной базе данных GenBank нуклеотидными последовательностями.

Аналитическая чувствительность. Аналитическую чувствительность (предел обнаружения) определяли на основе данных о пороговых циклах флуоресценции в серийных разведениях Калибратора К1 при постановке ПЦР, при ее эффективности $100 \pm 10\%$. Для этого готовили серию десятикратных разведений Калибратора К1 следующим образом: аликвоту объемом 10 мкл вносили в микропробирку объемом 1,5 мл, добавляли 90 мкл ТЕ-буфера, тщательно пипетировали и переносили 10 мкл полученного пула в новую микропробирку, куда снова добавляли 90 мкл ТЕ-буфера и т. д. до получения серии последовательных десятикратных разведений. С каждой пробой проводили ПЦР в 3-х повторях. Вычисляли средние значения концентрации образца в каждом разведении (копий/мл). Наименьшую концентрацию принимали за предел обнаружения. Об аналитическом диапазоне измерений судили по результатам анализа предела обнаруже-

ния. За нижнее значение диапазона принимали предел обнаружения, а за верхнее — концентрацию Калибратора К1.

Точность измерений. Оценку точности (правильности) измерений (ТИ) проводили, используя метод добавок (тест на «открытие»), заключающийся в постановке в восьми повторах ПЦР суммарной пробы, представляющей собой смесь двух Калибраторов наименьшей концентрации, и анализе отклонения практического значения концентрации ДНК TREC и KREC в суммарной пробе от теоретического. При этом значение ТИ должно находиться в пределах от 90 до 110%. Для получения суммарной пробы смешивали в равных объемах Калибраторы К4 и К5 с концентрациями $3,13 \times 10^5$ и $3,34 \times 10^4$ копий/мл соответственно. Анализ проводили по формуле: $ТИ [\%] = (Спр/Ст) \times 100$, где Спр [копий/мл] — рассчитанное по калибровочному графику среднее (практическое) значение концентрации ДНК в исследуемой суммарной пробе при $n = 8$; Ст [копий/мл] — расчетное (теоретическое) значение концентрации ДНК в исследуемой пробе, рассчитываемое по формуле: $Ст [копий/мл] = (СК4 + СК5)/2$, где СК4 и СК5 [копий/мл] — значения концентраций ДНК TREC/KREC в Калибраторах К4 и К5.

Эквивалентность результатов при использовании цельной крови и сухой капли крови. Оценку эквивалентности образцов цельной крови с гемостабилизатором (ЭДТА) и сухих капель крови проводили с использованием ДНК, экстрагированной из цельной крови и сухой капли крови 300 условно здоровых лиц и 10 пациентов старше 18 лет с диагностированным ПИД. Полученные данные сравнивали по наличию позитивности или негативности в отношении Т- и В-клеточного иммунодефицита, опираясь на значения нижней границы нормы для концентрации TREC и KREC в различных возрастных группах. В случае совпадения результатов (положительных или отрицательных) в различных типах клинических образцов делали вывод об эквивалентности образцов цельной крови и сухих капель крови.

Диагностическая чувствительность и специфичность. Оценку диагностической чувствительности и диагностической специфичности проводили с использованием образцов сухих капель крови, полученных от 2000 новорожденных без иммунодефицитов, 300 условно здоровых взрослых лиц, а также от пациентов с диагностированными ПИД (10 детей и 10 взрослых человек).

Границы нормы уровней TREC и KREC у новорожденных. Для определения границ нормы уровней TREC и KREC у новорожденных результаты исследуемых аналитов в группе условно здоровых детей были ранжированы,

после чего из общего массива данных удаляли так называемые выбросы, согласно методу Диксона—Рида, и определяли 95% доверительный интервал [3].

Статистический анализ. Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prizm 5 и Microsoft Exel 2010. Нормальность распределения полученных числовых данных проверяли с помощью двух критериев: Колмогорова—Смирнова и Шапиро—Уилка. Для оценки статистически значимых различий между отдельными выборками применяли критерий Манна—Уитни, а также ROC-анализ. Корреляционный анализ проводили с расчетом коэффициента Спирмена, значение которого оценивали по шкале Чеддока.

Результаты

Для определения уровней TREC и KREC в цельной крови или в сухой капле крови пациентов был разработан способ на базе ранее предложенной нами методики [6].

В рамках настоящей работы для оценки и корректировки эффективности экстракции ДНК и последующей ПЦР, а также в качестве основы для нормирования и расчетов результатов анализа целевых аналитов нами были выбраны два референсных гена: ген гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы человека (HPRT) и ген белковой субъединицы р30 рибонуклеазы Р (RPP30). Было продемонстрировано, что эти гены в цельной крови и в сухой капле крови имеют постоянный уровень, зависящий только от количества клеток, во всех образцах вне зависимости от группы пациентов.

Согласно модифицированному нами методу, выделенную ДНК использовали для одновременной амплификации в одной емкости участков целевых молекул ДНК TREC, KREC и эталонных нормировочных генов RPP30 и HPRT с использованием четырех пар олигонуклеотидных праймеров и соответствующих им олигонуклеотидных флуоресцентно меченых зондов, несущих на 5'-конце флуорофоры, а на 3'-конце нефлуоресцентные тушители (см. табл.1). Основой для возникновения флуоресценции является амплификация целевых и эталонных фрагментов ДНК на специфических олигонуклеотидах. Для детекции накопления специфических продуктов ПЦР используются флуоресцентно меченые олигонуклеотидные зонды. В ходе реакции происходит гибридизация олигонуклеотидов и зондов с комплементарными участками ДНК-мишеней. Образование специфического продукта амплификации в присутствии фермента Taq-полимеразы сопровождается отщеплением флуоресцентной

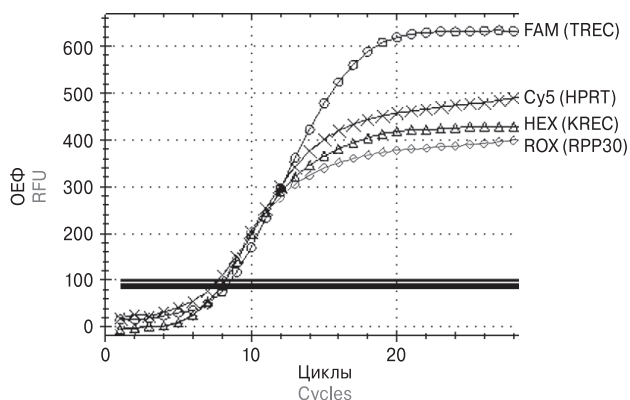


Рисунок 1. Кривые флуоресценции, отражающие динамику образования продуктов реакции в ходе амплификации

Figure 1. Fluorescence curves reflecting dynamic reaction products formation during amplification

Примечание. ОЕФ — относительные единицы флуоресценции. Кружками и треугольниками обозначены сигналы флуорофоров FAM и HEX, свидетельствующие о накоплении продуктов амплификации целевых молекул TREC и KREC соответственно. Ромбами и крестами обозначены сигналы флуорофоров ROX и Cy5, представляющие собой результат амплификации эталонных нормировочных генов RPP30 и HPRT соответственно, свидетельствующие об успешности экстракции ДНК и амплификации в целом.

Note. RFU — relative fluorescence units. The circles and triangles indicate the signals of the FAM and HEX fluorophores pointing at accumulation of amplification products of the target TREC and KREC molecules, respectively. Diamond and cross symbols indicate the signals of the ROX and Cy5 fluorophores resulting from amplification of the reference normalization genes RPP30 and HPRT in the genome of a human, respectively, evidencing about successful DNA extraction and overall amplification.

метки от зондов благодаря наличию у Taq-полимеразы 5'-экзонуклеазной активности. Олигонуклеотидные зонды, используемые для детекции ДНК целевых молекул и детекции фрагментов ДНК эталонных нормировочных генов, имеют флуоресцентные метки с разными спектрами поглощения и испускания, что позволяет проводить одновременную регистрацию флуоресценции по четырем каналам амплификатора с функцией детекции флуоресценции в режиме реального времени. По каналам, соответствующим флуорофорам FAM и HEX, детектировали фрагменты ДНК TREC и KREC, а по каналам, соответствующим флуорофорам Cy5 и ROX, — фрагменты ДНК генов HPRT и RPP30 соответственно (рис. 1).

Выделение и амплификацию ДНК образца считали успешными, если на каналах Cy5 и ROX получены значения порогового цикла C_t .

Анализ результатов проводили с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с гибридиза-

ционно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» с использованием калибровочных графиков, построенных при амплификации калибраторов с известными концентрациями искомым продуктам (TREC, KREC) и эталонных генов (HPRT, RPP30). Наличие калибраторов с известной концентрацией и негативного контроля (К-) позволяет контролировать все этапы анализа для каждого образца и оценивать влияние ингибиторов на результаты амплификации.

При оценке предела обнаружения аналитическая чувствительность составила 10^3 копий ДНК TREC/KREC на 1 мл анализируемого образца, аналитический диапазон измерений ДНК TREC/KREC составил от 10^3 до 10^9 копий/мл. На основании вышесказанного в качестве калибраторов определили препараты плазмид с концентрациями $1-9 \times 10^8$, $1-9 \times 10^7$, $1-9 \times 10^6$, $1-9 \times 10^5$, $1-9 \times 10^4$ копий/мл (рис. 2).

При оценке аналитической специфичности *in silico* установлено, что искомые последовательности имеют сходство только с последовательностями соответствующих генов TREC, KREC, RPP30 и HPRT в геноме человека (рис. 3).

При оценке точности (правильности) измерений в 8 повторях с использованием амплификаторов различных модификаций, ТИ на приборе планшетного типа (CFX) составила 95,84%, а на приборе роторного типа (Rotor-Gene 3000) — 95,11%, что соответствует нормальному показателю (90–110%).

При оценке эквивалентности образцов цельной крови и сухих капель крови во всех проанализированных случаях при параллельных тестированиях условно здоровых лиц и в цельной крови, и в сухой капле крови не выявлено снижения уровней TREC и KREC. При анализе образцов, полученных от больных с ПИД, показано параллельное снижение уровней TREC и KREC в цельной крови и в сухой капле крови.

Ни в одной из выборок (уровни TREC и KREC в цельной и сухой крови) распределение числовых данных не подчинялось закону нормального распределения. В связи с вышесказанным, для расчета коэффициента корреляции использовали критерий Спирмена. При оценке ранговой корреляции Спирмена результатов уровней TREC, полученных при анализе образцов ДНК, экстрагированных из цельной крови и сухого пятна крови, показано: $r_s = 0,7265$, $p < 0,0001$ (95% ДИ: 0,6674–0,7765), теснота связи по шкале Чеддока — высокая. При анализе уровней KREC — $r_s = 0,7349$, $p < 0,0001$ (95% ДИ: 0,6773–0,7836), теснота связи по шкале Чеддока — высокая. Таким образом, модифицированный нами способ позволяет использовать в качестве клинического материала как цельную кровь, так и сухую каплю крови.

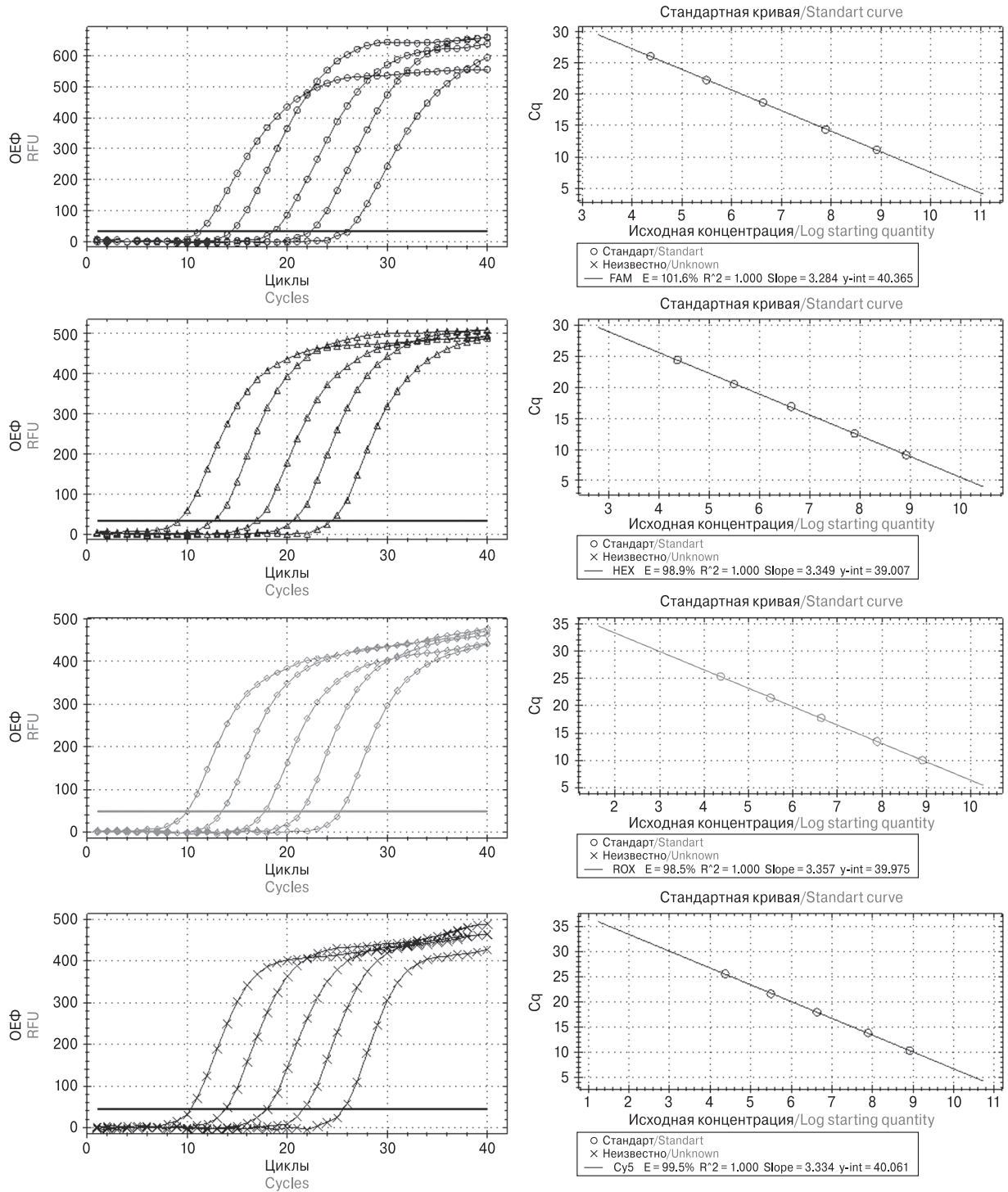


Рисунок 2. Кривые флуоресценции и калибровочные графики, отражающие динамику образования продуктов реакции амплификации при анализе серии разведений калибраторов

Figure 2. Fluorescence curves and calibration graphs reflecting dynamic formation of amplification reaction products in the analysis of calibrator dilutions series

Примечание. ОЕФ — относительные единицы флуоресценции. Кружками и треугольниками обозначены сигналы флуорофоров FAM и HEX, свидетельствующие о накоплении продуктов амплификации целевых молекул TREC и KREC соответственно. Ромбами и крестами обозначены сигналы флуорофоров ROX и Cy5, представляющие собой результат амплификации эталонных нормировочных генов RPP30 и HPRT соответственно.

Note. RFU — relative fluorescence units. The circles and triangles indicate the signals of the FAM and HEX fluorophores, indicating accumulation of amplification products of the target TREC and KREC molecules, respectively. Diamond and cross symbols indicate the signals of the ROX and Cy5 fluorophores after amplification of the reference normalization genes RPP30 and HPRT, respectively.

В ходе работы были определены нижние границы нормы целевых аналитов у новорожденных в группе, образцы которой представлены цельной пуповинной кровью и в группе, образцы которой представлены сухой каплей крови на картах Гатри. Достоверных различий между группами не выявлено ($p > 0,05$), в связи с чем группы были объединены и определены общие для цельной крови и сухой капли крови границы норм новорожденных. Нижняя граница нормы уровней TREC для новорожденных составила $892,6$ копий/ 10^5 клеток, уровней KREC — $400,4$ копий/ 10^5 клеток.

В рамках оценки диагностической чувствительности и диагностической специфичности при сравнении выборок условно здоровых новорожденных и детей с диагностированными первичными иммунодефицитами на основании результатов анализа, полученных с использованием модифицированного нами метода, площадь под кривой для уровней TREC и KREC

достигла единицы при 95% ДИ: $1,000-1,000$, $p < 0,0001$ (рис. 4).

В качестве тестов сравнения использовали диагностический коммерческий набор реагентов для количественного определения ДНК TREC и KREC методом ПЦР в режиме реального времени «ИММУНО-БИТ» (АББ-Тест, Москва) и «EnLite™ TREC-KREC kit» (PerkinElmer, Финляндия).

Согласно проведенному анализу, ни в одной из выборок распределение числовых данных не подчинялось закону нормального распределения. Для расчета коэффициентов корреляции использовали критерий Спирмена. При оценке ранговой корреляции Спирмена результатов уровней TREC, полученных при анализе образцов ДНК условно здоровых новорожденных и детей с диагностированными первичными иммунодефицитами, экстрагированных из сухого пятна крови, проанализированных с использованием модифицированного нами мето-

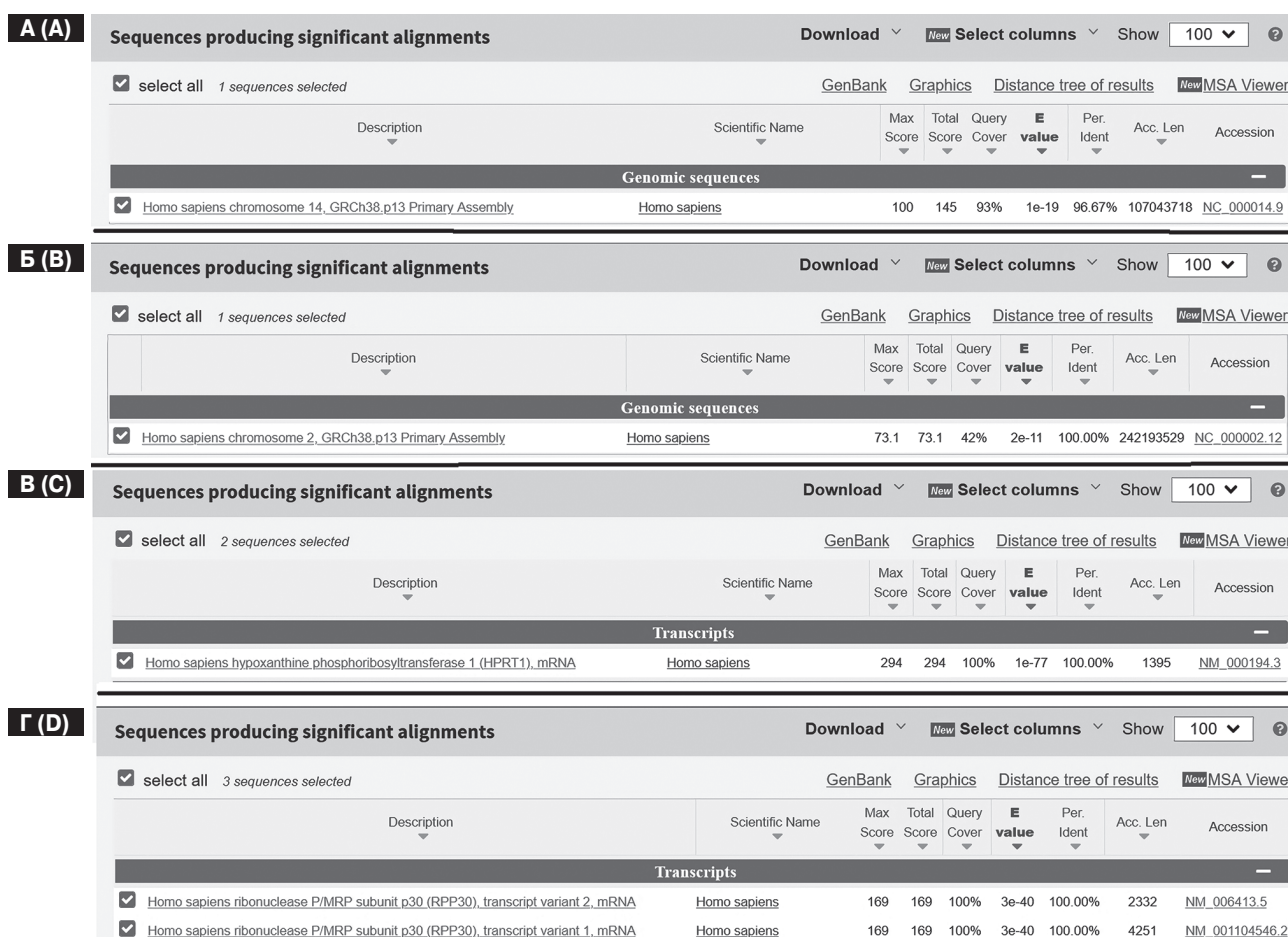


Рисунок 3. Анализ *in silico* фрагментов нуклеотидных последовательностей генов человека

Figure 3. *In silico* analysis of the fragments of human gene nucleotide sequences

Примечание. А — фрагмент целевой молекулы ДНК TREC, Б — фрагмент целевой молекулы ДНК KREC, В — фрагмент ДНК эталонного нормировочного гена HPRT, Г — фрагмент ДНК эталонного нормировочного гена RPP30.

Note. А — fragment of the target DNA molecule TREC, Б — fragment of the target DNA molecule KREC, В — DNA fragment of the HPRT reference normalization gene, D — DNA fragment of the RPP30 reference normalization gene.

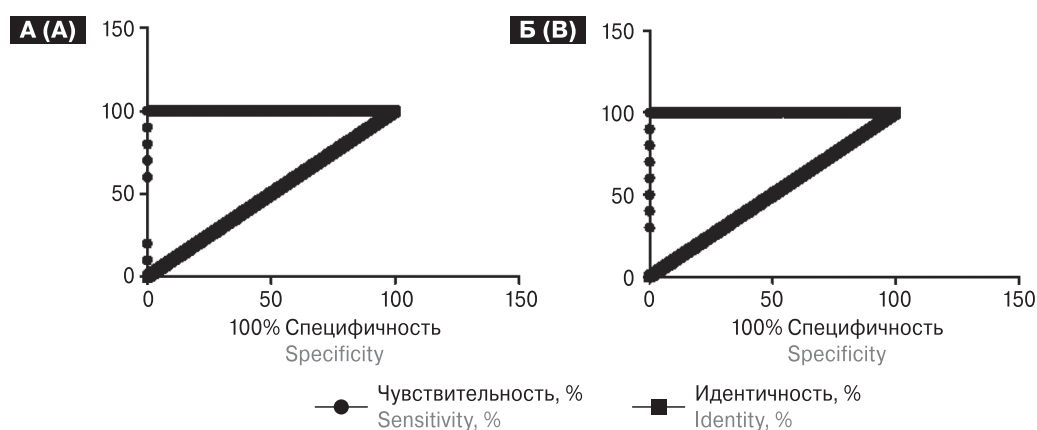


Рисунок 4. ROC-кривые, построенные при сравнении результатов анализа с использованием модифицированного нами метода выборок условно здоровых новорожденных и детей с диагностированными первичными иммунодефицитами по параметрам TREC (А) и KREC (Б)

Figure 4. ROC-curves constructed by comparing the analysis data by using the proposed modified method for samples of apparently healthy newborns and children diagnosed with primary immunodeficiency, according to the TREC (A) and KREC (B) parameters

да и коммерческим набором «ИММУНО-БИТ» (АБВ-Тест, Москва), показано: $r_s = 0,7932$, $p < 0,0001$ (95% ДИ: 0,5714–0,9070), теснота связи по шкале Чеддока — высокая. При анализе уровней KREC — $r_s = 0,8511$, $p < 0,0001$ (95% ДИ: 0,6805–0,9342), теснота связи по шкале Чеддока — высокая. При сравнении полученных результатов с использованием модифицированного нами метода и набора «EnLite™ TREC-KREC kit» (PerkinElmer, Финляндия) коэффициент корреляции для уровней TREC и KREC выше, теснота связи по шкале Чеддока высокая: для TREC $r_s = 0,8130$, $p < 0,0001$ (95% ДИ: 0,6078–0,9164), для KREC $r_s = 0,7495$, $p < 0,0001$ (95% ДИ: 0,4941–0,8858).

При сравнении выборок взрослых условно здоровых лиц и больных с диагностированными первичными иммунодефицитами на основании результатов анализа, полученных с использованием модифицированного нами метода, площадь под кривой для уровней TREC составила $0,98 \pm 0,015$ при 95% ДИ: 0,9489–1,009, $p <$

0,0001; для уровней KREC составила $0,99 \pm 0,003$ при 95% ДИ: 0,9918–1,003, $p < 0,0001$ (рис. 5).

Анализ количества TREC и KREC в образцах цельной крови, полученной от ВИЧ-инфицированных больных, показал достоверное снижение уровней целевых аналитов у длительное время инфицированных пациентов с вирусологической неэффективностью АРТ по сравнению с контрольной группой (рис. 6). Площадь под кривой для параметра TREC составила $0,9997 \pm 0,0003$, при 95% ДИ: 0,9989–1,000, $p < 0,0001$. Для параметра KREC площадь под кривой составила $0,9948 \pm 0,0024$, при 95% ДИ: 0,9900–0,9996, $p < 0,0001$. Разницы уровней ДНК TREC и KREC между здоровыми людьми и лицами с впервые выявленным ВИЧ со сроком инфицирования менее одного года не выявлено.

Наборы реагентов для определения уровней ДНК TREC и KREC «ИММУНО-БИТ» (АБВ-Тест, Москва) и «EnLite™ TREC-KREC kit» (PerkinElmer, Финляндия) предназначены для работы с образцами сухой капли крови, полу-

Таблица 3. Соответствие определения уровней TREC, KREC у здоровых новорожденных и у детей с диагностированными первичными иммунодефицитами

Table 3. Correspondence between detecting the TREC and KREC levels in healthy newborns and children with diagnosed primary immunodeficiencies

Пациенты Patients	Данные по TREC и KREC Data for TREC and KREC	Количество Quantity	Разработанный способ Developed method	ИММУНО-БИТ IMMUNO-BIT	EnLite™ TREC-KREC kit
Здоровые новорожденные Healthy newborns	Нормальные уровни TREC и KREC Normal TREC and KREC levels	2000	98%	98%	97%
Дети с ПИД Children with PID	Сниженные уровни TREC и/или KREC Decreased TREC and/or KREC levels	10	100%	100%	100%

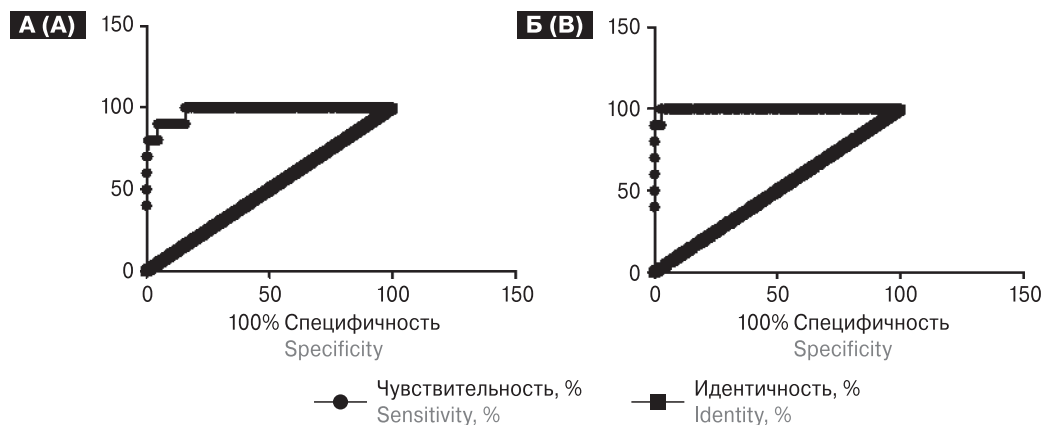


Рисунок 5. ROC-кривые, построенные при сравнении результатов анализа с использованием модифицированного нами метода выборок взрослых условно здоровых лиц и больных с диагностированными первичными иммунодефицитами по параметрам TREC (А) и KREC (Б)
 Figure 5. ROC-curves constructed by comparing the analysis data by using the proposed modified method for samples of apparently healthy adults and patients with diagnosed primary immunodeficiency, according to the TREC (A) and KREC (B) parameters

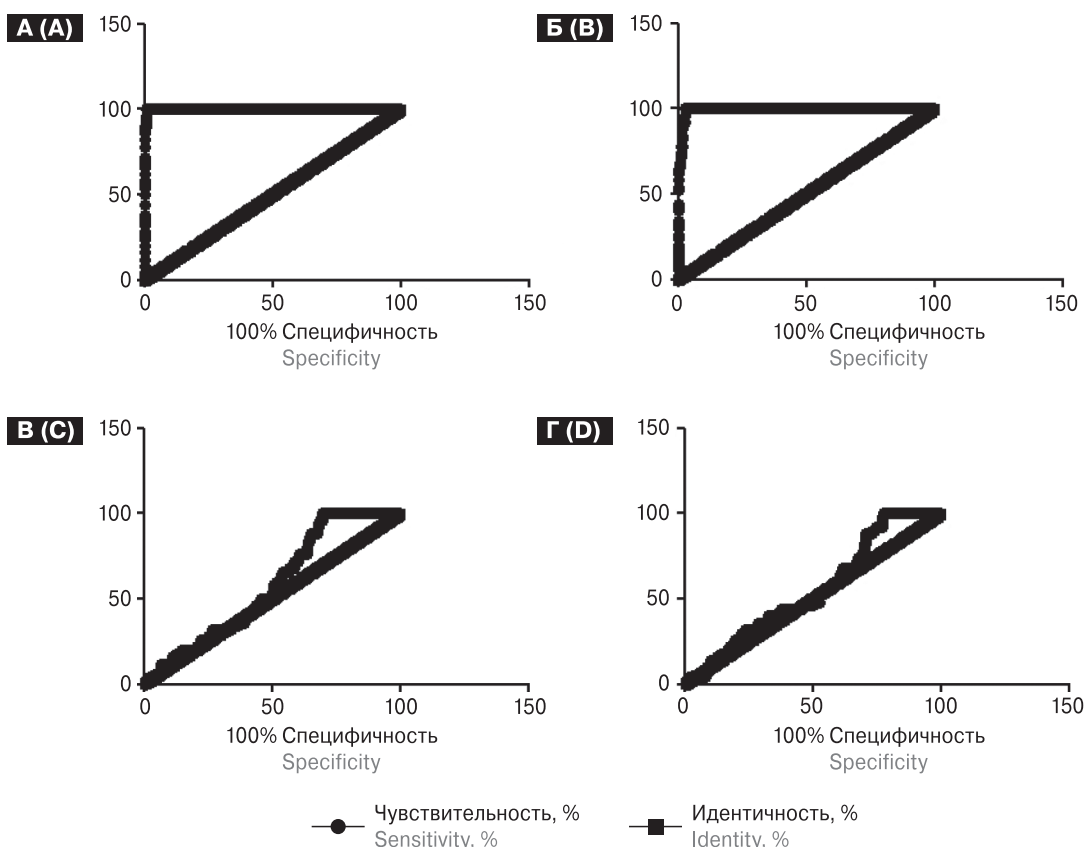


Рисунок 6. ROC-кривые, построенные при сравнении результатов анализа с использованием модифицированного нами метода выборок взрослых условно здоровых лиц и ВИЧ-инфицированных больных: с вирусологической неэффективностью АРТ по параметрам TREC (А) и KREC (Б); с недавно выявленной инфекцией ВИЧ по параметрам TREC (В) и KREC (Г)
 Figure 6. ROC-curves constructed while comparing the analysis data by using the proposed modified method for samples of apparently healthy adults and HIV-infected patients: with virological ART ineffectiveness according to the TREC (A) and KREC (B) parameters; with newly diagnosed HIV infection according to the TREC (C) and KREC (D) parameters

ченными у детей, однако в рамках настоящей работы мы сочли возможным провести анализ с использованием указанных методов у взрослых людей, чтобы оценить корреляцию между полученными результатами и уровнями целевых аналитов, определенными модифицированным нами методом. При оценке ранговой корреляции Спирмена результатов уровней TREC, полученных с использованием модифицированного нами метода и коммерческим набором «ИММУНО-БИТ» (АБВ-Тест, Москва) показано: $r_s = 0,4941$, $p = 0,0026$ (95% ДИ: 0,1826–0,7155), теснота связи по шкале Чеддока — умеренная. При анализе уровней KREC — $r_s = 0,8244$, $p < 0,0001$ (95% ДИ: 0,6715–0,9099), теснота связи по шкале Чеддока — высокая. При сравнении полученных результатов у взрослых людей с использованием модифицированного нами метода и набора «EnLite™ TREC-KREC kit» (PerkinElmer, Финляндия) коэффициент корреляции для уровней TREC и KREC ниже: для TREC корреляция не достоверная $r_s = 0,3301$, $p = 0,0528$ (95% ДИ: 0,01382–0,6042), для KREC теснота связи по шкале Чеддока умеренная — $r_s = 0,4142$, $p = 0,0134$ (95% ДИ: 0,0837–0,6626).

Обсуждение

Мультиплексная амплификация TREC, KREC и нормировочного гена в одной реакции устраняет вариабельность, связанную с ошибками пипетирования, позволяя более точно оценивать уровни целевых аналитов. При этом необходимо с особым вниманием отнестись к выбору нормировочных генов, необходимых для оценки и корректировки эффективности экстракции ДНК и последующей ПЦР из разных клинических образцов. Ряд генов домашнего хозяйства традиционно используется в качестве эталонных, однако, как и другие гены, они могут быть вариабельны при некоторых патологических состояниях из-за своей мультифункциональности. Не существует идеального нормировочного гена, однако правильно подобранный эталонный ген может уменьшить вариации, вызванные разным количеством и качеством исходного биологического материала, разной эффективностью выделения нуклеиновых кислот и разной эффективностью ПЦР. В связи с вышесказанным, оптимальным является одновременное использование двух эталонных нормировочных генов. В качестве таковых нами были выбраны гены «домашнего хозяйства» — и ген белковой субъединицы P30 рибонуклеазы Р (RPP30), и ген гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы человека (HPRT). Выбор RPP30 был обоснован анализом литературных данных, свидетельствующих о применимости данного гена в качестве

контрольного для определения эффективности экстракции геномной ДНК человека, в качестве эндогенного контроля для диагностики и количественной оценки бактериальной и вирусной нагрузки для нормализации количества копий инфекционных агентов с количеством клеток, основанным на наличии двух копий RPP30 в каждой клетке, а также в качестве эталонного гена для определения вариаций числа копий целевых генов в геноме человека [11].

Выбор гена HPRT, локализуемого на X-хромосоме, обусловлен тем, что половая принадлежность потенциально может влиять на иммунитет, развитие связанных с иммунным статусом заболеваний. Кроме того, хотя одни исследователи сообщают об отсутствии корреляции уровней TREC и KREC с полом [8, 23], другие указывают на более высокий уровень TREC у девочек-подростков, замедленное снижение уровня TREC у взрослых женщин по сравнению с мужчинами [18, 24], более высокий уровень TREC у новорожденных девочек, чем у новорожденных мальчиков [21] и, напротив, более высокий уровень KREC у девочек в возрасте полового созревания (9–12 лет), чем у мальчиков [16]. Таким образом, можно предположить, что половые гормоны способны играть существенную иммуномодулирующую роль в иммунных реакциях [15]. Выбор одного из нормировочных генов с локализацией на X-хромосоме и, соответственно, отличающиеся формулы расчетов уровней TREC и KREC для женского и мужского полов позволяют более точно оценить влияние гендера на уровни TREC и KREC. Однако наши результаты не показали значительных различий в уровнях целевых аналитов между женщинами и мужчинами, независимо от возраста. Такие отличия в получаемых результатах разными исследовательскими группами могут быть связаны с различиями и объемами анализируемых выборок.

Следует отметить, что цифровая ПЦР обладает большей точностью и чувствительностью, чем мультиплексная ПЦР, что могло бы позволить снизить частоту ложноположительных результатов [19, 25], однако высокая стоимость является очевидным недостатком метода, не позволяющим использовать его в рутинной диагностике. Тем не менее применение в нашей работе цифровой ПЦР для определения концентрации калибраторов, позволяет увеличить точность метода без существенного увеличения стоимости.

Ряд первичных иммунодефицитов, имеющих сравнительно более легкую форму течения заболевания, позволяют больным достичь совершеннолетия и могут быть впервые выявлены у взрослых людей [5]. Поскольку с возрастом уровни ДНК TREC и KREC в периферической крови снижаются, для оценки состояния им-

мунитета пациента необходимы методики с высокой чувствительностью и специфичностью. В противном случае, в то время как адекватная терапия позволяет не только сохранить жизнь больным с тяжелыми ПИД, но и значительно улучшить качество жизни пациентов с более легкими формами заболеваний, взрослые больные с общим переменным иммунодефицитом могут не получать адекватной заместительной терапии из-за отсутствия своевременной диагностики. Модифицированный нами способ оценки иммунодефицитных состояний может быть использован не только для выявления первичных иммунодефицитов у детей, но и для определения снижения иммунитета у взрослых людей. Данное обстоятельство представляется особенно важным, так как из-за распространенного мнения о том, что ПИД характерны только для детского возраста, врачи смежных специальностей исключают ПИД из дифференциальной диагностики у взрослых пациентов. Описанный в настоящей работе метод количественного определения уровней ТREC и КREC в периферической крови для лабораторной диагностики состояния иммунитета пациентов с использованием ПЦР в режиме реального времени позволит обратить особое внимание лечащих врачей на таких пациентов.

Не менее значима возможность применения настоящего метода не только для выявления случаев первичных иммунодефицитов, но и для диагностики состояния иммунитета при вторичных иммунодефицитах.

Так, при анализе двух групп ВИЧ-инфицированных больных показано достоверное снижение уровней ТREC и КREC у инфицированных в течение длительного времени пациентов с вирусологической неэффективностью АРТ, в то время как уровни целевых аналитов у инфицированных менее года лиц не отличались от уровней группы условно здоровых взрослых людей. Полученные нами результаты согласуются с данными иностранных коллег, согласно которым количество ТREC у ВИЧ-инфицированных пациентов коррелирует с различными клинико-патологическими параметрами (возраст больных, вирусная нагрузка РНК ВИЧ в плазме, количество CD4⁺ Т-лимфоцитов, процентное содержание CD4⁺ Т-лимфоцитов), а продукция КREC при АРТ остается неизменной на протяжении 10–12 месяцев, однако снижается после продолжительной терапии [20], что также не противоречит выявленному нами снижению КREC у получавших терапию больных. Известно, что уровень ТREC у ВИЧ-инфицированных лиц повышается после начала АРТ и, хотя не поднимается до характерных для здоровых людей уровней, достигает плато через 12 месяцев и остается стабильным в течение нескольких лет [20]. В нашей работе мы

не наблюдали достаточно высоких уровней ТREC у длительно инфицированных ВИЧ больных, находящихся на терапии. По всей видимости, это может быть связано с тем, что исследуемая нами группа была представлена больными с вирусологической неэффективностью АРТ и, соответственно, высокой вирусной нагрузкой, а также преимущественно низким количеством CD4⁺ клеток. Полученные результаты согласуются с ранее показанными данными, согласно которым количество ТREC у пациентов, нуждающихся в АРТ, значительно ниже не только по сравнению с контрольной группой, но и по сравнению с не нуждающимися в лечении, согласно действующим рекомендациям, ВИЧ-инфицированными пациентами с относительно сохранным числом клеток CD4⁺ [23]. Таким образом, количественное определение уровней ТREC и КREC в периферической крови представляет собой усовершенствованный метод мониторинга состояния иммунитета ВИЧ-инфицированных лиц, а также потенциально — метод определения нуждающихся в терапии больных.

Заключение

Способ лабораторной диагностики состояния иммунитета пациентов с использованием ПЦР в режиме реального времени на основе определения уровней ТREC и КREC обладает высокой специфичностью и чувствительностью. Калибраторы характеризуются стабильностью и воспроизводимостью. Метод позволяет диагностировать снижение Т- и/или В-клеточного иммунитета у детей и взрослых, и может быть применен для детекции молекул ТREC и КREC как в образцах цельной периферической крови, так и в сухой капле крови с использованием карт Гатри. При этом возможно применение единых значений референсных норм, независимо от анализируемого клинического материала. Результаты испытаний свидетельствуют о возможности эффективного использования мультиплексной ПЦР-диагностики как для комплексного первичного тестирования/скрининга новорожденных, так и для оценки состояния иммунитета в целях выявления взрослых больных ПИД и в рамках диагностики пациентов со вторичными иммунодефицитами, например, с инфекцией ВИЧ. Своевременная персонифицированная оценка состояния иммунитета будет способствовать сохранению жизни пациентов и улучшению ее качества.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы/References

- Гордукова М.А., Корсунский И.А., Чурсинова Ю.В., Бяхова М.М., Оскорбин И.П., Продеус А.П., Филипенко М.Л. Определение референсных интервалов TREC и KREC для скрининга новорожденных с иммунодефицитными состояниями в РФ // Медицинская иммунология. 2019. Т. 21, № 3. С. 527–538. [Gordukova M.A., Korsunsky I.A., Chursinova Yu.V., Byakhova M.M., Oskorbin I.P., Prodeus A.P., Filipenko M.L. Determining reference ranges for TREC and KREC assays in immune deficiency screening of newborns in Russian Federation. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2019, vol. 21, no. 3, pp. 527–538. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-527-538
- Гордукова М.А., Оскорбин И.П., Мишукова О.В., Зимин С.Б., Зиновьева Н.В., Давыдова Н.В., Смирнова А.С., Никитина И.А., Корсунский И.А., Филипенко М.Л., Продеус А.П. Разработка набора реагентов для количественного определения молекул ДНК TREC и KREC в цельной крови и сухих пятнах крови методом мультиплексной ПЦР в режиме реального времени // Медицинская иммунология. 2015. Т. 17, № 5. С. 467–478. [Gordukova M.A., Oskorbin I.P., Mishukova O.V., Zimin S.B., Zinovieva N.V., Davydova N.V., Smirnova A.S., Nikitina I.A., Korsunsky I.A., Filipenko M.L., Prodeus A.P. Development of real-time multiplex PCR for the quantitative determination of TREC's and KREC's in whole blood and in dried blood spots. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, vol. 17, no. 5, pp. 467–478. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2015-5-467-478
- Евгина С.А., Савельев Л.И. Современные теория и практика референсных 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.)] doi: 10.17116/labs2019802136
- Корсунский И.А., Гордукова М.А., Мунблит Д.Б., Козлов И.Г., Продеус А.П., Корсунский А.А. Клинические и эпидемиологические аспекты первичных иммунодефицитных состояний и их раннего обнаружения // Медицинская иммунология. 2017. Т. 19, № 5. С. 505–512. [Korsunskiy I.A., Gordukova M.A., Munblit D.B., Kozlov I.G., Prodeus A.P., Korsunskiy A.A. Clinical and epidemiological aspects of primary immunodeficiency diseases (PID) and early diagnosis options. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, vol. 19, no. 5, pp. 505–512. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2017-5-505-512
- Латышева Т.В., Латышева Е.А., Мартынова И.А., Аминова Г.Э. Пульмонологические проявления у взрослых пациентов с дефектом гуморального звена иммунитета // Терапевтический архив. 2016. Т. 88, № 8. С. 127–134. [Latysheva T.V., Latysheva E.A., Martynova I.A., Aminova G.E. Pulmonary manifestations in adult patients with a defect in the humoral link of immunity. *Terapevticheskii arkhiv = Therapeutic Archive*, 2016, vol. 88, no. 8, pp. 127–134. (In Russ.)] doi: 10.17116/terarkh2016888127-134
- Патент № 2756979 Российская Федерация, МПК C12Q 1/686 (2018.01), C12Q 1/6876 (2018.01). Способ лабораторной персонализированной диагностики состояния иммунитета новорожденных и набор олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно меченных зондов: № 2019142752; заявлено 17.12.2019; опубликовано 07.10.2021 / Семенов А.В., Останкова Ю.В., Любимова Н.Е., Тотолян Арег А. Патентообладатель: ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера. 20 с. [Patent No. 2756979 Russian Federation, Int. Cl. C12Q 1/686 (2018.01), C12Q 1/6876 (2018.01). A method for laboratory personalized diagnosis of the state of immunity in newborns and a set of oligodeoxyribonucleotide primers and fluorescently labeled probes: No. 2019142752; application: 17.12.2019; date of publication 07.10.2021 / Semenov A.V., Ostankova Yu.V., Liubimova N.E., Totolian Areg A. Proprietor: FBUN NII epidemiologii i mikrobiologii imeni Pastera. 20 p. (In Russ.)]
- 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
- Arismendi M.I., Kallas E.G., Santos B.A., Carneiro-Sampaio M.M., Kayser C. Thymopoiesis and regulatory T cells in healthy children and adolescents. *Clinics*, 2012, vol. 67, no. 5, pp. 425–429. doi: 10.6061/clinics/2012(05)04
- 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. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2009, vol. 124, no. 3, pp. 522–527. doi: 10.1016/j.jaci.2009.04.007
- 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. 77, pp. 579–585. doi: 10.1038/pr.2015.14
- Dyavar S.R., Ye Z., Byrareddy S.N., Scarsi K.K., Winchester L.C., Weinhold J.A., Fletcher C.V., Podany A.T. Normalization of cell associated antiretroviral drug concentrations with a novel RPP30 droplet digital PCR assay. *Sci. Rep.*, 2018, vol. 8, no. 1: 3626. doi: 10.1038/s41598-018-21882-0
- Esber R., Theresa S., Hjort M., Wiley V. Newborn screening for primary immunodeficiencies — a method evaluation. *Twin Res. Hum. Genet.*, vol. 21, no. 5: Special Section: Abstracts for the 42nd Human Genetics Society of Australasia Annual Scientific Meeting, Sydney, New South Wales, 2018, pp. 429–476. doi: 10.1017/thg.2018.52
- Hazenbergh M.D., Borghans J.A., de Boer R.J., Miedema F. Thymic output: a bad TREC record. *Nat. Immunol.*, 2003, vol. 4, no. 2, pp. 97–99. doi: 10.1038/ni0203-97
- Kamae C., Nakagawa N., Sato H., Honma K., Mitsuiki 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. 5, no. 131, pp. 1437–1440. doi: 10.1016/j.jaci.2012.10.059
- Klein S.L., Flanagan K.L. Sex differences in immune responses. *Nat. Rev. Immunol.*, 2016, vol. 16, pp. 626–638. doi: 10.1038/nri.2016.90

16. Kwok J.S.Y., Cheung S.K.F., Ho J.C.Y., Tang I.W.H., Chu P.W.K., Leung E.Y.S., Lee P.P.W., Cheuk D.K.L., Lee V., Ip P., Lau Y.L. 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
17. Laitala V., Ylikoski A., Raussi H.M., Ollikka P., Hemmilä I. Time-resolved detection probe for homogeneous nucleic acid analyses in one-step format. *Anal. Biochem.*, 2007, vol. 361, no. 1, pp. 126–131. doi: 10.1016/j.ab.2006.11.015
18. 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, pp. 409–413. doi: 10.1046/j.1365-2249.2001.01640.x
19. Profzaizer T., Slev P. A multiplex, droplet digital PCR assay for the detection of T-cell receptor excision circles and kappa-deleting recombination excision circles. *Clin. Chem.*, 2019, vol. 66, pp. 229–238. doi: 10.1373/clinchem.2019.308171
20. Quiros-Roldan E., Serana F., Chiarini M., Zanotti C., Sottini A., Gotti D., Torti C., Caimi L., Imberti L. Effects of combined antiretroviral therapy on B- and T-cell release from production sites in long-term treated HIV-1+ patients. *J. Transl. Med.*, 2012, vol. 10, no. 94. doi: 10.1186/1479-5876-10-94
21. Rechavi E., Lev A., Simon A.J., Stauber T., Daas S., Saraf-Levy T., Broides A., Nahum A., Marcus N., Hanna S., Stepensky P., Tokar O., Dalal I., Etzioni A., Almashanu S., Somech R. First year of israeli newborn screening for severe combined immunodeficiency-clinical achievements and insights. *Front. Immunol.*, 2017, vol. 8: 1448. doi: 10.3389/fimmu.2017.01448
22. Resino S., Seoane E., Pérez A., Ruiz-Mateos E., Leal M., Muñoz-Fernández M.A. Different profiles of immune reconstitution in children and adults with HIV-infection after highly active antiretroviral therapy. *BMC Infect. Dis.*, 2006, vol. 6: 112. doi: 10.1186/1471-2334-6-112
23. Serana F., Chiarini M., Zanotti C., Sottini A., Bertoli D., Bosio A., Caimi L., Imberti L. Use of V(D)J recombination excision circles to identify T- and B-cell defects and to monitor the treatment in primary and acquired immunodeficiencies. *J. Transl. Med.*, 2013, vol. 11: 119. doi: 10.1186/1479-5876-11-119
24. Sottini A., Serana F., Bertoli D., Chiarini M., Valotti M., Vaglio Tessitore M., Imberti 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
25. Tessitore M.V., Sottini A., Roccaro A.M., Ghidini C., Bernardi S., Martellosio G., Serana F., Imberti L. Detection of newly produced T and B lymphocytes by digital PCR in blood stored dry on nylon flocced swabs. *J. Transl. Med.*, 2017, vol. 15, no. 1: 70. doi: 10.1186/s12967-017-1169-9
26. Ye P., Kirschner D.E., Kourtis A.P. The thymus during HIV disease: role in pathogenesis and in immune recovery. *Curr. HIV Res.*, 2004, vol. 2, no. 2, pp. 177–183. doi: 10.2174/1570162043484898
27. Van Zelm M., Van der Burg M., Langerak A.M., Van Dongen 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, no. 12, pp. 1–9. doi: 10.3389/fimmu.2011.00012

Авторы:

Сайтгалина М.А., младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Останкова Ю.В., к.б.н., зав. лабораторией иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции; старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Любимова Н.Е., к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Семенов А.В., д.б.н., директор Екатеринбургского научно-исследовательского института вирусных инфекций ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, г. Екатеринбург, Россия;
Кузнецова Р.Н., к.м.н., врач-иммунолог-аллерголог медицинского центра ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; доцент кафедры иммунологии ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;
Тотolian А.А., академик РАН, д.м.н., профессор, директор ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; зав. кафедрой иммунологии ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский Государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Saitgalina M.A., Junior Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Ostankova Yu.V., PhD (Biology), Head of the Laboratory of HIV Immunology and Virology; Senior Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Liubimova N.E., PhD (Biology), Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Semenov A.V., PhD, MD (Biology), Director of Ekaterinburg Research Institute of Viral Infections of SRC VB Vector of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Ekaterinburg, Russian Federation;
Kuznetsova R.N., PhD (Medicine), Allergologist-Immunologist, Medical Center of St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; Associate Professor, Department of Immunology, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;
Totolian A.A., RAS Full Member, PhD, MD (Medicine), Professor, Director, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; Head of the Department of Immunology, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation.