

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

Сайтгалина М.А., Любимова Н.Е., Останкова Ю.В., Кузнецова Р.Н., Тотолян Арег А.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИЖНИХ ГРАНИЦ НОРМЫ ДЛЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ TREC И KREC У НОВОРОЖДЕННЫХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАБОРА РЕАГЕНТОВ «TREC/KREC-AMP PS»

ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», 197191, Санкт-Петербург, Россия;

Дефекты созревания, функциональной активности, количественная недостаточность или полное отсутствие T- и B-лимфоцитов приводят к развитию иммунодефицитов, затрагивающих как клеточный, так и гуморальный иммунный ответ. Тяжесть таких заболеваний может сильно варьировать от бессимптомных форм до тяжёлых жизнеугрожающих состояний. Из-за ранней остановки дифференцировки предшественников лимфоцитов нередко наблюдается одновременно дефицит T- и B-клеток. Уровни эксцизионных колец TREC и KREC признаны оптимальными суррогатными маркерами, отражающими количество зрелых наивных T- и B-лимфоцитов, соответственно. Снижение уровней молекул TREC и/или KREC в периферической крови может служить прогностическим маркером не только для ряда первичных, но и для приобретённых вторичных иммунодефицитов, ряда других заболеваний. Определены пороговые уровни количественного содержания фрагментов ДНК TREC и KREC в периферической крови среди новорожденных Санкт-Петербурга согласно рекомендациям Международной федерации клинической химии и Государственного стандарта (ГОСТ) Р 53022.3-2008.

Анализ уровней эксцизионных колец TREC и KREC в крови проводили с использованием разработанного диагностического набора «TREC/KREC-AMP PS» («НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург), наборов «EnLite™ TREC-KREC kit» (PerkinElmer, Финляндия) и «ИММУНО-БИТ» («АБВ-Тест», Москва). Установленная нижняя граница уровня молекул TREC у новорожденных составила 892,6 копий/10⁵ клеток и KREC - 400,4 копий/10⁵ клеток. Сравнение уровней TREC и KREC у здоровых новорожденных и детей с диагнозом Первичный иммунодефицит позволило установить снижение содержания целевых молекул в крови больных детей. При сравнении количественного содержания молекул TREC и KREC, вычисленного с использованием реагентов разных производителей, статистически значимых различий не выявлено. Установленные пороговые границы уровней TREC и KREC у новорожденных, будут способствовать эффективной персонализированной клинической лабораторной диагностике иммунодефицитных состояний различного генеза.

Ключевые слова: TREC; KREC; эксцизионные кольца; Real-time ПЦР; первичные иммунодефициты; новорожденные.

Для цитирования: Сайтгалина М.А., Любимова Н.Е., Останкова Ю.В., Кузнецова Р.Н., Тотолян Арег А. Определение нижних границ нормы для показателей TREC и KREC у новорожденных с использованием набора реагентов «TREC/KREC-AMP PS». *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68(10): 644-649.
DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-10-644-649>.

Для корреспонденции: Останкова Юлия Владимировна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. мол. иммунологии, зав. лаб. иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекций; e-mail: shenna1@yandex.ru

Конфликт интересов. Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 03.07.2023

Принята к печати 28.07.2023

Опубликовано 00.10.2023

Saitgalina M.A., Liubimova N.E., Ostanokova Y.V., Kuznetsova R.N., Totolian Areg A.

DETERMINATION OF THE LOWER NORMAL LIMITS FOR THE TREC AND KREC INDICATORS IN NEWBORN USING THE «TREC/KREC-AMP PS» REAGENT SET

Saint-Petersburg Pasteur Institute, 197191, Saint Petersburg, Russia

A significant proportion of primary immunodeficiencies (PIDs) are diseases characterized by a deficiency or absence of T- and/or B-lymphocytes. Such diseases often take severe life-threatening forms. T cell defects lead to combined immunodeficiencies affecting both cellular and humoral immune responses. Deficiency of mature functioning B-cells leads to insufficiency of humoral immunity. Due to the early arrest of lymphocytes precursors differentiation, there is often a simultaneous deficiency of T- and B-cells. Excision ring levels TREC and KREC are recognized as optimal surrogate markers reflecting the number of mature naive T- and B-lymphocytes, respectively. A decrease in the levels of TREC and/or KREC molecules in the peripheral blood can serve as a prognostic marker not only for a number of PIDs, but also for secondary immunodeficiencies, as well as some other diseases.

The aim of the work was to determine the reference limits for quantitative analysis of TREC and KREC DNA fragments in peripheral blood among newborns in St. Petersburg using the developed diagnostic kit.

The material was 2100 dry blood spot samples obtained from healthy full-term newborns on the 3rd-4th day of life, and 157 newborn cord blood samples. As an additional control, dry blood spot samples obtained from 10 newborns with PID were used. The analysis was carried out using a set of reagents for the quantitative determination of excision rings TREC and KREC «TREC/KREC-AMP PS». The reference limits were determined by the direct method according to the recommendations of the International Federation of Clinical Chemistry and the State Standard P 53022.3-2008.

Results. The levels of TREC and KREC molecules in each blood sample were determined in terms of 10^5 cells. There were no significant differences between the obtained numerical results for the two indicated samples (dry blood drop and umbilical cord blood) ($p > 0.05$). In this connection, the groups were combined and the same reference limits of TREC and KREC molecules in whole blood and dry blood drops of newborns were determined. The established lower limit of the TREC molecules level in newborns was 892.6 copies/ 10^5 cells and KREC - 400.4 copies/ 10^5 cells. A high level of the results correlation obtained using different diagnostic kits to identify the amount of TREC and KREC is shown.

The results obtained, which made it possible to determine the reference limits of the TREC and KREC levels in newborns, will contribute to an effective personalized laboratory diagnosis of various origins immunodeficiency states.

Key words: TREC; KREC; Excision circles; Real-time PCR; Primary immunodeficiencies; newborns.

For citation: Saitgalina M.A., Liubimova N.E., Ostankova Y. V., Kuznetsova R.N., Totolian Areg A. Determination of the lower normal limits for the TREC and KREC indicators in newborn using the «TREC/KREC-AMP PS» reagent set. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2023; 68 (10): 644-649. (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-10-644-649>.

For correspondence: Ostankova Yu. V., PhD senior researcher at the Laboratory of Molecular Immunology; e-mail: shenna1@yandex.ru

Information about authors:

Saitgalina M.A., <https://orcid.org/0000-0002-7603-3269>;

Liubimova N. E., <https://orcid.org/0009-0003-7092-6773>;

Ostankova Yu. V., <https://orcid.org/0000-0003-2270-8897>;

Kuznetsova R.N., <https://orcid.org/0000-0003-1668-6716>;

Totolian Areg A., <https://orcid.org/0000-0003-4571-8799>.

Conflict of interests. *The authors declare absence of conflict of interests.*

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 03.07.2023

Accepted 28.07.2023

Published 00.10.2023

Введение. Нарушения в процессах дифференцировки лимфоцитов могут приводить к дефектам функциональной активности и количественного содержания Т- и В-клеток в периферической крови и центральных органах иммунной системы. Дети, рождающиеся с дефицитом Т- и/или В-лимфоцитов подвержены частым инфекционным заболеваниям, тяжесть проявления которых может варьировать от умеренных до жизнеугрожающих форм, вплоть до летальных исходов [1-3]. Одной из наиболее значимых проблем, связанных с оказанием медицинской помощи таким пациентам, является сложность своевременной диагностики заболевания, поскольку при рождении дети могут выглядеть здоровыми и не иметь каких-либо специфических симптомов [4]. При этом отсрочка постановки диагноза, а, следовательно, и начало эффективного лечения, зачастую играет решающую роль для исхода заболевания и вероятности наступления смерти.

Причина недостаточности как Т-, так и В-лимфоцитов, как упоминалось выше, часто кроется в нарушениях дифференцировки их предшественников, что на ранних этапах может вести к полной остановке созревания клеток. Уровни эксцизионных колец TREC (T-cell receptor excision circles - Т-клеточные рецепторные эксцизионные кольца) и KREC (Kappa-deleting recombination excision circles - Каппа рекомбинационные эксцизионные кольца) признаны оптимальными

суррогатными маркерами, отражающими количество зрелых наивных Т- и В-лимфоцитов, покидающих тимус и костный мозг, соответственно, и выходящих на периферию [5-7]. Это небольшие нуклеотидные последовательности, которые удаляются из генома в ходе формирования зрелого рецепторного гена лимфоцита. После эксцизии такой фрагмент ДНК замыкается в кольцо и существует в виде эписомальной ДНК в той лимфоцитарной клетке, в которой он был образован. Эксцизионные кольца не реплицируются при пролиферации лимфоцита после его активации антигеном и, следовательно, отражают функцию продуцирования новых клеток центральными лимфоидными органами: тимусом и костным мозгом [8, 9].

Количественная оценка уровней TREC и KREC в периферической крови новорожденных играет не маловажную роль, поскольку значительная часть врождённых ошибок иммунитета, или первичных иммунодефицитов, является ургентными состояниями. Метод ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) является оптимальным для количественного определения фрагментов TREC и KREC в пробах суммарной ДНК, поскольку позволяет провести анализ практически сразу после рождения ребёнка и не требует больших затрат времени и финансов на его выполнение. Его проведение доступно в стандартной ПЦР-лаборатории и легко может быть внедрено в ру-

тинную практику клиницистов [8, 10]. Это является достаточно важными требованиями к методам диагностирования врождённых иммунопатологий, поскольку от быстроты получения результата зависит скорость осуществления эффективной терапии, что, в конечном счете, влияет на процент смертности и инвалидизации пациентов. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК), проведенная у детей с тяжелыми комбинированными иммунодефицитами (ТКИД) в первые 3,5 месяца жизни обеспечивает выживаемость более 95% таких больных. В то время как выживаемость после ТГСК, проведенной в более поздний период при таких состояниях не превышает 60-70% [11].

Для выявления тех уровней молекул TREC и KREC, которые могут свидетельствовать о тяжёлых иммунопатологиях, необходимо, в первую очередь, понимать какие значения концентраций TREC и KREC в крови новорожденных можно считать нормальными, не патологичными. Особенно важно определение нижних пороговых значений TREC/KREC, поскольку экстремальное снижение этих молекул свидетельствует о больших рисках развития необратимых инфекционных осложнений.

Цель работы: определение пороговых уровней количественного содержания фрагментов ДНК TREC и KREC в периферической крови среди новорожденных Санкт-Петербурга с использованием разработанного диагностического набора.

Материал и методы. Для определения границ нормы уровней молекул TREC и KREC в периферической крови новорожденных сформированы две группы условно здоровых доношенных обследуемых детей с отсутствием диагноза иммунодефицит любого генеза и группа детей с диагнозом первичный иммунодефицит. В 1-ю группу здоровых новорожденных (группа 1) вошли дети, взятие крови у которых осуществляли на 3-4-й день после рождения проколом пятки и нанесением капель крови на бибулярную бумагу - карту Гатри. В эту группу вошли 2100 детей (получено 2100 образцов крови на картах Гатри, по одному образцу от каждого ребёнка). Вторую группу условно здоровых новорожденных (группа 2) составили дети, взятие крови у которых осуществляли из пуповины при рождении. В эту группу вошли 157 детей (получено 157 образцов крови). Третью обследуемую группу составили дети, которым поставлен диагноз первичный иммунодефицит по клиническим и лабораторным признакам (группа 3). В эту группу вошли 10 детей, от каждого больного получен образец крови, собранный на карту Гатри на 3-4-й день после рождения в ходе скрининга новорожденных. Большая разница в размере выборок трёх анализируемых групп связана с доступностью клинического материала.

Критерием не включения новорожденного в эксперимент в группе 1 и группе 2 являлось подтвержденное носительство хотя бы одним из родителей ВИЧ или вирусных гепатитов, наличие в семейном анамнезе наследственных иммунопатологий (первичных иммунодефицитов). К группе 3 такие критерии не включения не применялись.

Исследования проводили при письменном согласии родителей пациентов. Дизайн исследования был одобрен локальным этическим комитетом ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера». Все процедуры соответствовали этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и её последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

Из всех полученных образцов крови проводили экстракцию суммарной ДНК с использованием набора реагентов «Экстра-ДНК-Био» («Алкор-Био», СПб), предназначенного для выделения нуклеиновых кислот из цельной крови и сухих капель крови на картах Гатри, согласно инструкции производителей. Оценку уровней молекул TREC и KREC для всех образцов тотальной ДНК проводили методом количественной мультиплексной ПЦР-РВ с использованием набора реагентов для количественного определения уровней эксцизионных колец TREC и KREC методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени «TREC/KREC-AMP PS», разработанного в ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера». В одной пробирке одновременно амплифицировали фрагменты последовательностей TREC, KREC, фрагменты генов человека HPRT и RPP30, выбранные в качестве нормировочных генов. Для количественной оценки в каждом запуске ПЦР амплифицировали серию из пяти калибраторов с известной концентрацией перечисленных выше генетических фрагментов [12]. После количественных расчётов проведён сравнительный анализ полученных результатов (уровней TREC и KREC) для трёх обследованных групп.

Количественный ПЦР-анализ со всеми описанными выше образцами проводили с применением ещё двух диагностических ПЦР-систем. Одной из них являлся набор «EnLite™ TREC-KREC kit» (PerkinElmer, Финляндия), не зарегистрированный на территории РФ как медицинское изделие, но рекомендуемый производителем для исследовательских целей. И диагностический набор «ИММУНО-БИТ» («АБВ-Тест», Москва), зарегистрированный на территории РФ, как медицинская тест-система. После проведения анализа сравнивали количественные данные, полученные с использованием реагентки разных производителей.

Нормальность распределения полученных числовых значений в каждой группе определяли с помощью двух критериев: Шапиро-Уилка и Колмогорова-Смирнова. Поскольку в каждой группе числовые данные не подчинялись закону нормального распределения, все последующие статистические расчёты выполнены с применением инструментов непараметрической статистики.

Границы нормы уровней TREC и KREC у новорожденных устанавливаются непрямой методом определения референсных интервалов (РИ), когда в качестве массива анализируемых значений используют уже накопленные медицинские данные или образцы, не прибегая к организации целенаправленного рекрутинга добро-

вольцев/референсных индивидуумов [13]. Согласно руководству Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI) и рекомендациям Международной федерации клинической химии и лабораторной медицины (International Federation of Clinical Chemistry - IFCC) использование непрямого метода допустимо в ряде случаев, в частности при работе с детьми [14, 15].

Статистическая обработка данных проведена с применением пакетов программного обеспечения GraphPad Prizm 5, StatTech и Microsoft Exel 2010. Сравнительный анализ независимых выборок пациентов проведён с использованием критериев Манна-Уитни, Краскела-Уоллиса, ROC-анализа. Для установления наличия/отсутствия корреляций между массивами количественных данных, полученных с применением разных тест-систем, рассчитаны ранговые коэффициенты корреляции Спирмена. Полученные коэффициенты Спирмена оценены по шкале Чеддока.

Результаты. После проведения ПЦР-анализа, рассчитаны уровни молекул TREC и KREC в каждом

образце крови в пересчёте на 10^5 клеток. Статистически значимых различий между полученными количественными результатами для группы 1 (образцы сухих капель крови на картах Гатри) и группы 2 (образцы пуповинной крови) не выявлено ($p>0,05$). Группы 1 и 2 объединены, и определены общие границы норм содержания молекул TREC и KREC у новорожденных, относящиеся как к цельной крови (пуповинной), так и к сухим пятнам крови на картах Гатри. Установленная нижняя граница референсного диапазона уровня молекул TREC у новорожденных составила 892,6 копий/ 10^5 клеток и KREC - 400,4 копий/ 10^5 клеток.

После определения нижних порогов нормы уровней TREC и KREC в крови в неонатальный период, проанализированы пробы ДНК, выделенные из образцов сухих пятен крови, полученных от десяти новорожденных с диагнозом ПИД различного генеза (группа 3). Для всех этих образцов зафиксированы сниженные уровни молекул TREC и/или KREC в крови по сравнению с референсным порогом (см. таблицу).

Определение уровней молекул TREC и KREC в крови новорожденных с ПИД

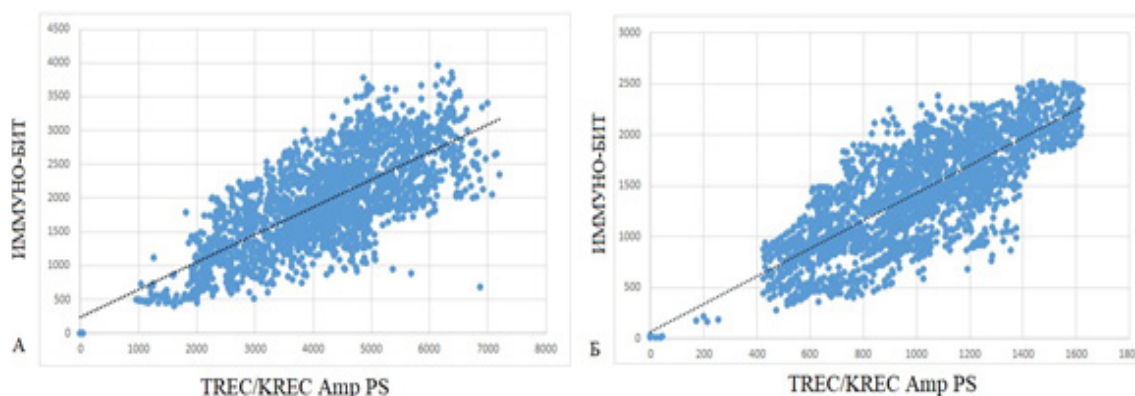
№ п/п	Диагноз	Клинические проявления	Уровень TREC, копий/ 10^5 клеток	Уровень KREC, копий/ 10^5 клеток
1	Синдром CHARGE	Порок сердца Укорочение длины верхних и нижних конечностей Гипоплазия тимуса Недоразвитие костей мозгового черепа Недоразвитие пальцев стоп Задержка роста и развития Неонатальный сепсис	2*	198
2	ТКИД	Синдром дыхательных расстройств - парез ЖКТ - пневмония	1	213
3	ПИД недифференцированный	неонатальный сепсис	2	255
4	Транзиторная гипогаммаглобулинемия детского возраста	- неонатальный сепсис - синдром дыхательных расстройств - бронхолёгочная дисплазия - малые аномалии развития сердца (открытое овальное отверстие)	2	173
5	Транзиторная гипогаммаглобулинемия детского возраста	неонатальный сепсис	8	0
6	ТКИД, Транзиторная гипогаммаглобулинемия детского возраста	- неонатальный сепсис - бронхолёгочная дисплазия - интерстициальная лёгочная эмфизема (тяжёлое течение)	0	18
7	Транзиторная гипогаммаглобулинемия детского возраста, Синдром CHARGE	- врожденный порок сердца (дефект межжелудочковой перегородки, открытый артериальный проток) - малые аномалии развития сердца (открытое овальное отверстие) - атрезия пищевода - микрогении - деформация и укорочение ребер	2	36
8	ПИД недифференцированный, агаммаглобулинемия	малые аномалии развития сердца (открытое овальное отверстие)	5	42
9	Транзиторная гипогаммаглобулинемия детского возраста, ОВИН	- пневмония - неонатальный сепсис - синдром дыхательных расстройств	21	0
10	Транзиторная гипогаммаглобулинемия детского возраста	- анемия тяжёлой степени - синдром дыхательных расстройств	38	0

Примечание. * - Установленная нижняя граница нормы молекул TREC - 892,6 копий/ 10^5 клеток, молекул KREC - 400,4 копий/ 10^5 клеток.

Из таблицы следует, что в некоторых случаях у больных фиксировали нулевой уровень молекул TREC или KREC (или близкий к нулевому значению), что свидетельствует о глобальных нарушениях в процессах формирования функционально активных Т-/В-клеточных рецепторов в ходе дифференцировки лимфоцитов. Следовательно, у таких пациентов практически отсутствует Т-/В- лимфоцитарное звено иммунитета, что может обуславливать тяжёлую клиническую картину.

Для проведения сравнительного анализа результатов, полученных на тест-системе «TREC/KREC-AMP

PS», для каждого образца ДНК проведена ПЦР с использованием альтернативных наборов реагентов, направленных на оценку уровней TREC и KREC в периферической крови. После проведения анализа вычисляли ранговые коэффициенты корреляции Спирмена между массивами числовых данных, полученных с использованием разных тест-систем. При сравнении уровней TREC, определённых набором «TREC/KREC-AMP PS» и «ИММУНО-БИТ», $r_s=0,74$ (95% ДИ: 0,7159-0,7562, $p<0,05$), при анализе уровней KREC $r_s=0,71$, (95% ДИ: 0,6779-0,7228, $p<0,05$) (см. рисунок).



Корреляция результатов, полученных с использованием наборов реагентов «TREC/KREC-AMP PS» и «ИММУНО-БИТ». А – TREC. Б – KREC.

При слепом одношаговом тестировании все три диагностических набора позволяли определить всех больных ПИД, в то же время среди здоровых новорожденных ложноположительные результаты регистрировали в 2% случаев при использовании наборов «TREC/KREC-AMP PS» и «ИММУНО-БИТ» и в 3% случаев при работе с набором «EnLite™ TREC-KREC kit». При дублирующей постановке анализа на всех трёх наборах уровни целевых молекул ниже пороговых значений показаны у 2% здоровых новорожденных, что связано, по всей видимости, с реальным снижением уровней TREC и/или KREC у обследуемых детей.

Обсуждение. Согласно рекомендациям международных сообществ, сбор клинического материала от здоровых доношенных новорожденных должен быть постоянным, а последующий анализ результатов, учитывающий новые полученные данные позволит обновлять референсные интервалы [13-15]. В странах Европы, где для первичного скрининга применяют диагностический набор «EnLite Neonatal TREC» (Perkin Elmer, Турку, Финляндия), пороговое значение TREC составляло 34 копии/мкл, однако, в связи с тем, что большинство новорожденных с уровнем анализа 25-34 копии/мкл оказались здоровы, в 2018 году после пересмотра установлен более низкий порог позитивных результатов - 24 копии/мкл.

Разработчики других наборов считают необходимым по мере возможности снижать пороговые

значения целевых аналитов, мы предлагаем другой путь развития скрининга новорожденных на TREC и KREC. Снижение пороговых значений, несомненно, позволяет более чётко выявлять новорожденных с тяжёлыми и потенциально тяжёлыми формами иммунодефицита, таких как ТКИД. С одной стороны, это экономически целесообразно, так как внимание лечащих врачей при этом будет обращено в первую очередь на пациентов с тяжёлыми ПИД. С другой стороны, заниженные пороговые уровни не позволят своевременно выявить детей с более лёгкими формами заболеваний со сглаженным течением. Что, в свою очередь, приведёт к усугублению нынешней ситуации, когда заболевания могут оставаться не выявленными в детском возрасте, а общая переменная иммунная недостаточность (ОВИН) впервые может быть определена в возрасте 35 лет и старше. Ранее для людей старше 18 лет нами установлена статистически значимая отрицательная корреляционная зависимость уровней молекул TREC с возрастом, при этом снижение уровней KREC с возрастом не происходит [16]. Определение пороговых уровней содержания молекул TREC и KREC как для новорожденных, так и для людей старше 18 лет даёт возможность проводить оценку функциональной активности Т- и В-клеточного звена иммунитета на протяжении всей жизни пациентов. Это, в свою очередь, позволит осуществлять более персонализированный подход к диагностике иммунодефи-

цитных состояний, поможет оценивать клиническую картину и результаты иммунологических тестов, исходя из понимания функционального потенциала Т- и В-лимфоцитарного звена. Усовершенствование алгоритмов диагностики ПИД позволит своевременно выявлять риски развития сложных жизнеугрожающих осложнений, применять превентивные меры, выбирать более специализированную, направленную терапию. Перечисленные меры, несомненно, способствуют повышению качества жизни больных, увеличению процента их выживаемости не только в первые годы жизни, но и во взрослом возрасте.

Мы не выявили статистически значимых различий уровней TREC и/или KREC между мальчиками и девочками, хотя некоторые исследователи сообщают о более низких уровнях TREC у новорожденных мальчиков по сравнению с девочками с последующим выравниванием уровней по мере роста [17]. Другие исследовательские группы сообщали об отсутствии связанной с полом разницы уровней TREC и KREC [18], что согласуется с полученными нами результатами.

Заключение. Проведённый анализ позволил установить единые пороговые уровни TREC и KREC для новорожденных при использовании цельной крови и сухой капли крови. Применение разработанного диагностического набора с использованием определенных пороговых уровней целевых аналитов позволит выявить младенцев не только с тяжёлыми формами ПИД, но и со сглаженными вариантами иммунодефицитов, что будет способствовать ранней диагностике и началу терапии, улучшающему качество жизни больных.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1-8, 10-11, 14-15, 17-18 с м. REFERENCES)

9. Ярилин А.А., ред. Иммунология. М.: GEOTAR-Media; 2010.
12. 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; 12(5): 981-96. DOI: 10.15789/2220-7619-MMF-2039.
13. Евгина С.А., Савельев Л.И. Современные теория и практика референтных интервалов. *Лабораторная служба*. 2019; 8(2):36-44. DOI: 10.17116/labs2019802136.
16. Сайтгалина М.А., Любимова Н.Е., Останкова Ю.В., Кузнецова Р.Н., Тотолян Арег А. Определение референтных интервалов циркулирующих в крови эксцизионных колец TREC и KREC у лиц старше 18 лет. *Медицинская иммунология*. 2022; 24(6):1227-36. DOI: 10.15789/1563-0625-DOR-2587.

REFERENCES

1. Amaya-Uribe L., Rojas M., Azizi G., Anaya J.M., Gershwin M.E. Primary immunodeficiency and autoimmunity: A comprehensive review. *J. Autoimmun.* 2019; 99: 52-72. DOI: 10.1016/j.

- jaut.2019.01.011.
2. Gathmann B. The European internet-based patient and research database for primary immunodeficiencies: update 2011. *Clin. Exp. Immunol.* 2012; 167(3): 479-91. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2011.04542.x.
3. Sottini A., Serana F., Bertoli D., Chiarini M., Valotti M., Vaglio Tessoro M., et al. Simultaneous quantification of T-cell receptor excision circles (TRECs) and K-deleting recombination excision circles (KRECs) by real-time PCR. *J. Vis. Exp.* 2014; 94: 52184. DOI: 10.3791/52184.
4. 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; 125(3): 409-13. DOI: 10.1046/j.1365-2249.2001.01640.x.
5. Quinti I., Soresina A., Spadaro G., Martino S., Donnanno S., Agostini C., et al. Long-term follow-up and outcome of a large cohort of patients with common variable immunodeficiency. *J. Clin. Immunol.* 2007; 27(3): 308-16. DOI: 10.1007/s10875-007-9075-1.
6. Lucas M., Lee M., Lortan J., Lopez-Granados E., Misbah S., Chapel H. Infection outcomes in patients with common variable immunodeficiency disorders: relationship to immunoglobulin therapy over 22 years. *Allergy Clin. Immunol.* 2010; 125(6): 1354-60. DOI: 10.1016/j.jaci.2010.02.040.
7. Pai S.Y., Logan B.R., Griffith L.M., Buckley R.H., Parrott R.E., Dvorak C.C., et al. Transplantation outcomes for severe combined immunodeficiency, 2000-2009. *N. Engl. J. Med.* 2014; 371(5):434-46. DOI: 10.1056/NEJMoa1401177.
8. van Zelm M.C., van der Burg M., Langerak A.W., van Dongen J.J. PID comes full circle: applications of V(D)J recombination excision circles in research, diagnostics and newborn screening of primary immunodeficiency disorders. *Front Immunol.* 2011; 2:12. DOI: 10.3389/fimmu.2011.00012.
9. Yarilin A.A. Immunology [Immunologiya]. Moscow: GEOTAR-Media; 2010. (in Russian)
10. Verbsky J.W. Newborn screening for severe combined immunodeficiency: The wisconsin experience (2008-2011). *J. Clin. Immunol.* 2012; 1 (32): 82-8. DOI: 10.1007/s10875-011-9609-4.
11. King J.R., Hammarström L. Newborn Screening for Primary Immunodeficiency Diseases: History, Current and Future Practice. *J. Clin. Immunol.* 2018; 38(1):56-66. DOI: 10.1007/s10875-017-0455-x.
12. 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. *Infektsiya I immunitet.* 2022; 12(5): 981-96. DOI: 10.15789/2220-7619-MMF-2039. (in Russian)
13. Evgina S.A., Saveliev L.I. Current theory and practice of reference interval. *Laboratornaya sluzhba.* 2019; 8(2):36-44. DOI: 10.17116/labs2019802136. (in Russian)
14. Boyd J.C. Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guidelines, CLSI document C28-A3. *CLSI.* 2010; 28(3).
15. Jones G., Haekkel R., Loh T., Sikaris K., Streichert T., Katayev A., et al. Indirect methods for reference interval determination - review and recommendations. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2018; 57(1): 20-9. DOI: 10.1515/cclm-2018-0073.
16. Saitgalina M.A., Liubimova N.E., Ostankova Yu.V., Kuznetsova R.N., Totolian A.A. Determination of reference values for TREC and KREC in circulating blood of the persons over 18 years. *Meditsinskaya immunologiya.* 2022; 24(6):1227-36. DOI: 10.15789/1563-0625-DOR-2587. (in Russian)
17. Verstegen R.H., Borte S., Bok L.A., van Zwieten P.H., von Döbeln U., Hammarström L., et al. Impact of Down syndrome on the performance of neonatal screening assays for severe primary immunodeficiency diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2014; 133:1208-11. DOI: 10.1016/j.jaci.2013.10.010.
18. Di Renzo M., Pasqui A.L., Auteri A. Common variable immunodeficiency: a review. *Clin. Exp. Med.* 2004; 3(4):211-7. DOI: 10.1007/s10238-004-0027-2.