

Корсунский Илья Анатольевич

**РАННЯЯ ДИАГНОСТИКА ИММУНОДЕФИЦИТНЫХ СОСТОЯНИЙ У  
ДЕТЕЙ: КЛИНИЧЕСКИЕ И ЛАБОРАТОРНЫЕ АСПЕКТЫ**

14.01.08 – педиатрия

14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание учёной степени

доктора медицинских наук

Москва – 2019

Работа выполнена в ФГАОУ ВО «Первый Московский Государственный Медицинский Университет им. И. М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет)

**Научные консультанты:**

академик РАН, доктор медицинских наук,  
профессор  
доктор медицинских наук, профессор

**Румянцев Александр Григорьевич**  
**Продеус Андрей Петрович**

**Официальные оппоненты:**

**Латышева Татьяна Васильевна** – доктор медицинских наук, профессор, ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Клиника, отделения иммунопатологии и интенсивной терапии, руководитель отделений

**Дегтярёв Дмитрий Николаевич** – доктор медицинских наук, профессор, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова» Минздрава России, заместитель директора по научной работе

**Овсянников Дмитрий Юрьевич** – доктор медицинских наук, профессор, ФГАОУ ВО Российский Университет Дружбы Народов Минобрнауки России, Медицинский институт, кафедра педиатрии, заведующий кафедрой

**Ведущая организация:** Обособленное структурное подразделение «Научно-исследовательский клинический институт педиатрии имени академика Ю. Е. Вельтищева» ФГБОУ ВО «РНИМУ имени Н. И. Пирогова» Минздрава России

Защита состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2019г. в \_\_\_ на заседании диссертационного совета Д.208.040.10 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр.2.

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бул., д.37/1 и на сайте организации: [www.sechenov.ru](http://www.sechenov.ru)

Автореферат разослан "\_\_\_" \_\_\_\_\_ 2019 г.

Учёный секретарь диссертационного совета  
кандидат медицинских наук, доцент

**Чебышева Светлана Николаевна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность исследования

Первичные иммунодефицитные состояния (ПИДС) представляют собой гетерогенную группу врожденных дефектов иммунной системы, которые клинически проявляются рецидивирующими инфекционными и аутоиммунными заболеваниями разной степени тяжести, а также злокачественными новообразованиями. Тяжёлые формы первичных иммунодефицитов приводят к летальным исходам в первые два года жизни (Dvorak, 2013, Yao, 2013). Менее тяжёлые формы приводят к необратимым изменениям в организме, которые значительно снижают качество жизни человека. Чаще всего ПИДС могут быть охарактеризованы сниженными функциональными способностями лейкоцитов бороться с инфекциями, однако, некоторые расстройства связаны с ограниченной дифференцировкой лимфоидных клеток или их увеличенным апоптозом (Al-Herz, 2011).

Большая часть первичных иммунодефицитных состояний является моногенными заболеваниями, некоторые из них имеют более сложное полигенное происхождение.

За исключением селективного дефицита иммуноглобулина А, который встречается с частотой 1:500 (Пушкова, 2014), все другие формы ПИДС обнаруживаются реже и имеют общую распространенность приблизительно 1:10000. По данным некоторых исследований, среди населения с высоким уровнем близкородственных браков и среди генетически изолированных популяций частота первичных иммунодефицитных состояний значительно выше (Notarangelo, 2010).

Большинство новорождённых с серьёзными дефектами иммунной системы - тяжёлыми комбинированными иммунными недостаточностями (ТКИН) - могут казаться здоровыми при рождении и остаются таковыми в течение первых месяцев жизни. Так продолжается до тех пор, пока врожденная неспособность вырабатывать Т- и В- лимфоциты остаётся компенсированной антитело-

опосредованным материнским иммунитетом. Что касается менее тяжёлых форм ПИДС, их клинические проявления очень индивидуальны, но практически всегда неспецифичны, что приводит к серьёзной задержке в постановке правильного диагноза и назначении адекватного лечения.

Первичное иммунодефицитное состояние тяжёлая комбинированная иммунная недостаточность (ТКИН) манифестирует тяжёлым течением вирусных и бактериальных инфекций у младенцев уже в двухмесячном возрасте (Puck, 2007, 2011), а средний возраст постановки иммунологического диагноза в развитых странах составляет в лучшем случае около 4,5 месяцев (Adeli, 2010, Brown, 2011, Chan, 2011, Pai, 2014). Даже в такой относительно благоприятной ситуации ранней постановки правильного диагноза задержка в 2,5 месяца является существенной, так как эффективность трансплантаций гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) детям младше 3,5 месяцев жизни значительно выше таковой, нежели пациентам более старшего возраста – 94% выживаемость против 66-69% (Pai, 2014, Malhan, 2016, Корсунский, 2017). Менее тяжёлые формы первичных иммунодефицитных состояний могут манифестировать с разной симптоматикой и гораздо позже (Modell, 2014, Кондратенко, 2005), что приводит к задержке в постановке правильного диагноза, назначении правильного лечения и, как следствие, к увеличению инвалидизации, смертности (Гордукова, 2015) и значительным расходам системы здравоохранения (Kwan, 2015). Существующие методы лабораторной диагностики иммунодефицитных состояний у детей являются сложными, дорогостоящими, трудоемкими и требующими подготовленного персонала лабораторий. Выполняются иммунологические анализы, как правило, в единичных случаях или не выполняются вообще.

Первичные иммунодефицитные состояния могут быть обнаружены с помощью измерения уровней TREC и KREC в сухом пятне крови на карте неонатального скрининга методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) (Chan, 2005). TREC являются побочным продуктом рекомбинации гена Т-клеточного рецептора, а KREC – В-клеточного. Следовательно, низкие уровни несущих эти молекулы лимфоцитов в

периферической крови указывают на Т- и/или В- клеточную лимфопению (Serana, 2013). Анализ количества TREC и KREC обладает всеми необходимыми для включения в программу неонатального скрининга свойствами (Hamilton, 2014, Гордукова, 2015).

Таким образом, не вызывает сомнений необходимость разработки тест-системы для количественного определения маркеров наивных Т- (TREC) и В- (KREC) лимфоцитов в сухих пятнах крови на картах неонатального скрининга и в цельной крови пациентов с подозрением на иммунодефицитные состояния, её внедрения в систему неонатального скрининга и в клиническую практику врачей педиатров.

### **Цель исследования**

Разработка, апробация и внедрение в практику количественного определения TREC и KREC методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в сухих пятнах крови новорождённых на картах неонатального скрининга и в периферической крови детей с целью раннего выявления и контроля иммунодефицитных состояний в неонатальный и постнатальный периоды.

### **Задачи исследования**

1. Определить место количественного определения TREC и KREC методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в диагностике иммунодефицитных состояний у детей;
2. Определить референсные значения количества TREC и KREC в сухих пятнах крови новорождённых на картах неонатального скрининга и в периферической крови условно здоровых детей разного возраста;
3. Установить клиническое значение определения содержания TREC и KREC в периферической крови пациентов с подозрением на иммунодефицитное состояние и оценить перспективы внедрения этого анализа в рутинную практику врача-педиатра;

4. Установить клиническое значение определения содержания TREC и KREC в сухих пятнах крови на картах неонатального скрининга для диагностики первичных иммунодефицитных состояний у новорождённых и оценить перспективы внедрения этого исследования в систему неонатального скрининга;

### **Научная новизна**

Впервые в России разработана, апробирована и внедрена в клиническую практику эффективная тест-система, которая позволяет выявлять иммунодефицитные состояния у новорождённых и детей разного возраста до клинической манифестации заболевания.

Установлено клиническое значение и показана целесообразность внедрения анализа для определения количества TREC и KREC методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в сухих пятнах крови в систему неонатального скрининга и в цельной крови в клиническую практику врача-педиатра для ранней диагностики иммунодефицитных состояний у детей;

Впервые определена корреляция количества TREC с количеством экспрессирующих CD3, CD4 и CD8 Т-лимфоцитов и количества KREC с количеством экспрессирующих CD19 В-лимфоцитов. Доказано, что количество TREC и KREC не коррелирует с содержанием иммуноглобулинов в периферической крови;

Впервые определены референсные значения TREC и KREC в сухих пятнах крови на картах неонатального скрининга новорождённых и в периферической крови детей разных возрастных групп.

Впервые определена чувствительность и специфичность тест-системы для раннего выявления иммунодефицитных состояний у детей методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Получен патент №2587540 «Способ диагностики состояния иммунной системы пациента и набор праймеров, зондов и стандартных образцов для количественной оценки ДНК молекул TREC, KREC и количества геном

эквивалентов ДНК». Авторы патента: Гордукова Мария Александровна, Продеус Андрей Петрович, Филипенко Максим Леонидович, Корсунский Илья Анатольевич. Заявка №2015132823. Приоритет изобретения 06 августа 2015 года. Зарегистрировано в государственном реестре изобретений Российской Федерации 25 мая 2016 года.

### **Практическая значимость исследования**

Показано, что анализ даёт ценную диагностическую и прогностическую информацию в отношении широкого спектра заболеваний, связанных с нарушением Т- и/или В- клеточного звена иммунитета, что позволяет выявлять пациентов для углублённого обследования и своевременного назначения адекватной терапии.

Показано, что количество TREC и KREC является значимым прогностическим маркером развития первичных иммунодефицитных состояний у новорождённых.

Количественное определение TREC и KREC является простым в интерпретации и быстрым тестом, который легко воспроизводится в любой клинико-диагностической лаборатории и может служить диагностическим фактором оценки клеточного иммунитета пациента.

Получено регистрационное удостоверение №РЗН 2018/7447 на медицинское изделие «набор реагентов для диагностики *in vitro* «БиТ-тест» для количественного определения ДНК TREC и KREC методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени по ТУ 21.20.23-001-17608775-2017».

Результаты данной работы являются основанием для внедрения анализа количества TREC и KREC в систему неонатального скрининга России, а также в клиническую практику врачей-педиатров.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Количественное определение ДНК TREC (наивные Т-лимфоциты) и KREC (наивные В-лимфоциты) в крови методом полимеразной цепной реакции в

- режиме реального времени по ТУ 21.20.23-001-17608775-2017 является чувствительным и специфичным анализом для скрининга патологических состояний, вызванных недостатком Т- и В-клеток во всех группах детского населения без градации по демографическому или популяционному признаку;
2. Количественное определение содержания TREC и KREC в периферической крови методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени является эффективным для выявления иммунодефицитных состояний у детей разного возраста;
  3. Анализ количества TREC и KREC в сухих пятнах крови на картах неонатального скрининга методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени является перспективным и оправданным инструментом для выявления младенцев с иммунодефицитными состояниями, требующими дальнейшего углублённого обследования;

### **Внедрение результатов исследования**

Научные положения и практические рекомендации внедрены в клиническую практику клинико-диагностического центра детской иммунологии и аллергологии и первого педиатрического отделения (иммунология и аллергология) ГБУЗ ДГКБ №9 им. Г. Н. Сперанского ДЗМ, а также в работу молекулярно-генетической лаборатории МОНИКИ им. М. Ф. Владимирского ДЗМО.

Результаты работы используются в учебной подготовке студентов, клинических ординаторов, аспирантов, курсантов сертификационных циклов усовершенствования врачей ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова МЗ РФ (Сеченовский Университет).

### **Апробация результатов исследования**

Основные положения работы доложены на 25 российских и зарубежных мероприятиях, в том числе:



- Объединённый иммунологический форум (Нижний Новгород, 2013);
- Европейский съезд общества иммунодефицитов (Прага, 2014);
- XVIII Конгресс педиатров России (Москва, 2015);
- I Калининградский иммунологический научный форум (Калининград, 2016);
- Конференция «Иммунология в клинической практике» (Красноярск, 2017);
- Конгресс европейского общества аллергологии и клинической иммунологии (Мюнхен, 2018);

Работа апробирована на совместном совещании расширенного экспертного совета ГБУЗ ДГКБ им. Г. Н. Сперанского ДЗМ, НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачёва МЗ РФ и ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова МЗ РФ. Протокол №2 от 18.02.2019 г.

Исследование одобрено локальным этическим комитетом ГБУЗ ДГКБ №9 им. Г. Н. Сперанского ДЗМ, протокол №3 от 17.04.2014 г.

### **Личный вклад автора**

Автором лично выбрано и определено направление исследования, подготовлен обзор данных отечественных и зарубежных источников литературы, сформулированы цель и задачи диссертационной работы. При непосредственном участии автора разработан способ диагностики состояния иммунной системы пациента, на который 25 мая 2016 года получен патент №2587540. Проведен анализ и обобщение полученных результатов с определением их научной и клинической значимости, сделаны научные выводы, изложены практические рекомендации, оформлена и апробирована работа. В процессе работы при непосредственном участии автора проведено клиническое исследование, по результатам которого получено регистрационное удостоверение №РЗН 2018/7447 на медицинское изделие «набор реагентов для диагностики *in vitro* «БиТ-тест» для количественного определения ДНК TREC и KREC методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени по ТУ 21.20.23-001-17608775-2017».

Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии во всех этапах исследования: от научной разработки нового способа

диагностики иммунной системы и проведения клинического испытания созданной тест-системы, ведения пациентов, постановки задач, их практической и клинико-лабораторной реализации до обсуждения результатов в научных публикациях, докладах и внедрения в практику.

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 25 научных работ, в том числе 11 в журналах, включенных в перечень изданий, рекомендованных ВАК РФ для публикаций основных результатов диссертационных исследований.

Получен патент №2587540 «Способ диагностики состояния иммунной системы пациента и набор праймеров, зондов и стандартных образцов для количественной оценки ДНК молекул TREC, KREC и количества геном эквивалентов ДНК». Авторы патента: Гордукова М. А., Продеус А. П., Филипенко М. Л., Корсунский И. А. Заявка №2015132823. Приоритет изобретения 06 августа 2015 года. Зарегистрировано в государственном реестре изобретений Российской Федерации 25 мая 2016 года.

Получено регистрационное удостоверение №РЗН 2018/7447 на медицинское изделие «набор реагентов для диагностики *in vitro* «БиТ-тест» для количественного определения ДНК TREC и KREC методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени по ТУ 21.20.23-001-17608775-2017».

### **Структура и объём диссертации**

Диссертация изложена на 125 странице машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, 4 глав собственных исследований, обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций, библиографического указателя, включающего 194 литературных источника, в том числе 4 отечественных и 190 иностранных. Работа иллюстрирована 44 таблицами и рисунками.

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Диссертация соответствует паспортам научных специальностей: 14.01.08 – педиатрия, результаты проведённого исследования соответствуют области исследования «клиника, диагностика и лечение врождённых и наследственных болезней» данной специальности и 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология, результаты проведённого исследования соответствуют области исследования «разработка и усовершенствование методов диагностики, лечения и профилактики аллергических и иммунопатологических процессов» данной специальности.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

Основу работы составило изучение связи количества TREC и KREC в сухих пятнах крови на картах неонатального скрининга и в периферической крови пациентов, их иммунного статуса, клинического состояния и диагноза. Работа состояла из трёх частей.

Целью первой части работы было доказать качество исследования количества TREC и KREC в сухих пятнах крови на картах неонатального скрининга и в периферической крови методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, его соответствие результатам других иммунологических исследований у одних и тех же пациентов с выявленными ранее первичными иммунодефицитными состояниями. Также было необходимо определить референсные интервалы показателей TREC и KREC у здоровых детей разных возрастных групп.

Целью второй части работы было рассчитать прогностическую способность анализа в отношении «золотого» стандарта иммунодиагностики - исследования субпопуляционного состава периферической крови методом проточной цитофлуориметрии, а также определить место количественного анализа TREC и KREC в периферической крови в работе врачей-педиатров с детьми с подозрениями на иммунодефицитные состояния.

Целью третьей части работы было определить возможность использования анализа количества TREC и KREC в сухих пятнах крови на картах неонатального скрининга в рамках неонатального скрининга, его клиническую значимость и перспективу.

### **Материалы и методы исследования**

С целью валидации анализа было исследовано 14 образцов (8 замороженной крови и 6 свежей) крови пациентов с установленными ранее с помощью метода проточной цитофлуориметрии диагнозами ПИДС тяжёлая комбинированная иммунная недостаточность. Из них: 4 образца замороженной, 3

образца свежей крови мальчиков и 3 образца замороженной крови, 2 образца свежей крови девочек, взятых на первом году жизни, 1 образец замороженной крови, 1 образец свежей крови мальчиков, взятых в возрасте 2,5 года и 5 лет 3 месяцев соответственно. Характеристика по полу и возрасту 14 пациентов, чьи образцы ранее замороженной и свежей крови были использованы для валидации анализа, представлены в таблице 1. Возраст указан на день забора крови.

Таблица 1 – Половозрастная характеристика пациентов с установленными ранее первичными иммунодефицитными состояниями тяжёлыми комбинированными иммунными недостаточностями

Возраст	Пол	
	М	Ж
0 – 12 месяцев	7	5
1 – 6 лет	2	0
<b>Всего</b>	14	

С целью установления референсных значений TREC и KREC у детей разного возраста было обследовано 282 ребёнка (140 мальчиков и 142 девочки) в возрасте от 0 месяцев до 18 лет. Все дети – пациенты клинико-диагностического центра и стационарных отделений ГБУЗ ДГКБ №9 им. Сперанского, обратившиеся к врачу с неиммунологическими и неинфекционными заболеваниями. У всех детей был тщательно собран анамнез и проведено лабораторное обследование, направленное на исключение иммунологических и инфекционных патологий. Лабораторное обследование включало в себя, в том числе, исследование иммунного статуса методами проточной цитофлуориметрии и турбидиметрии.

Дизайн включения в работу и обследования условно здоровых детей на рисунке 1, их половозрастная характеристика в таблице 2. Отдельно стоит отметить, что периферическая кровь для всех иммунологических анализов

забиралась одновременно, осмотр детей и сбор анамнеза проводился в тот же день.

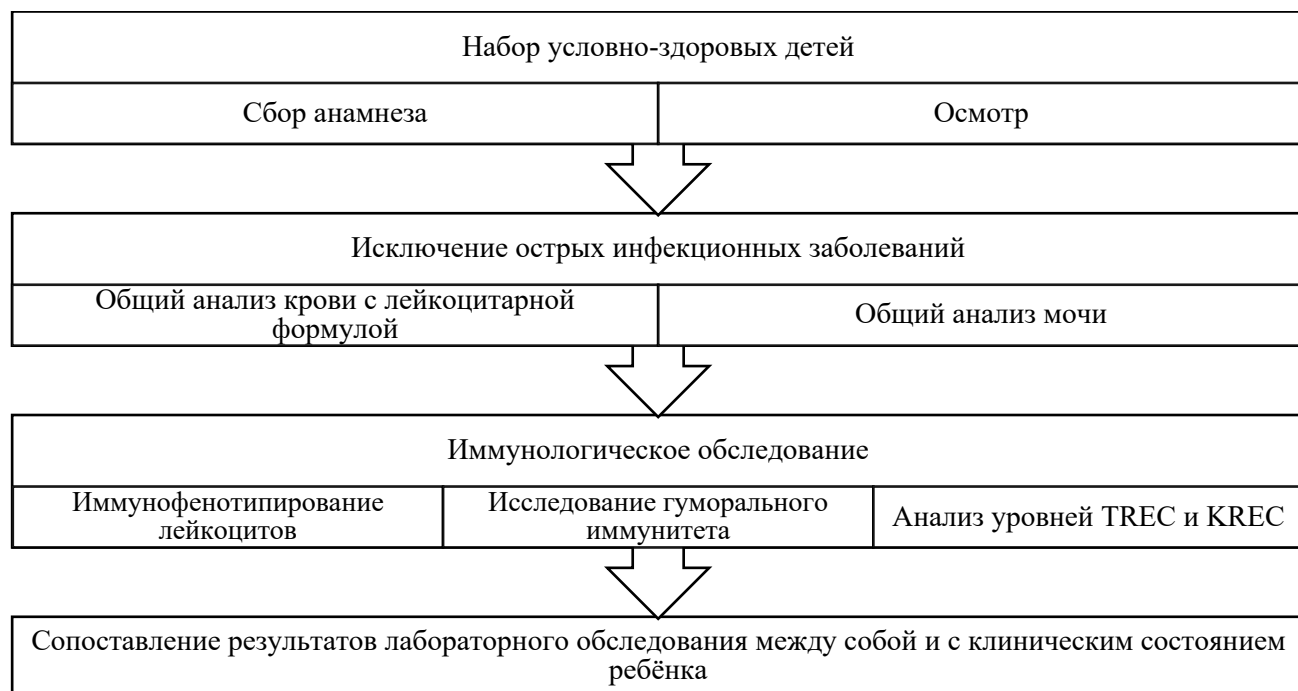


Рисунок – Дизайн обследования условно-здоровых детей

Таблица 2 – Включённые в клинико-лабораторное исследование условно здоровые дети

<b>пол</b>	<b>Количество (всего 282)</b>
девочки	142
мальчики	140
<b>возраст</b>	
0 – 3 месяца	19
3 – 12 месяцев	19
1 – 2 года	51
2 – 6 лет	58
6 – 12 лет	79
12 – 18 лет	64

Вторая часть работы включила в себя анализ комплексного обследования поступивших в стационарные отделения городской скорой помощи

инфекционной больницы, а также обратившихся с подозрениями на иммунодефицитные состояния в клиничко-диагностический центр 3 уровня пациентов в возрасте от рождения до 18 лет в период с мая 2013 года по август 2016 года. Всего было сопоставлено и проанализировано лабораторных показателей и клинических симптомов 425 девочек и 580 мальчиков разного возраста. В анализе были использованы пол, возраст, рабочие и окончательные диагнозы, количество лимфоцитов и лейкоцитов, показатели субпопуляционного состава лимфоцитов, а также уровни иммуноглобулинов. Периферическая кровь для всех анализов забиралась одномоментно.

Дизайн обследования на рисунке 2, половозрастная характеристика пациентов в таблице 3.



Рисунок 2 – Дизайн обследования пациентов стационарных отделений и клиничко-диагностической поликлиники

Таблица 3 – Городской Клинической Больницы №9 имени Г. Н. Сперанского

<b>пол</b>	<b>Количество (всего 1005)</b>
девочки	425
мальчики	580
<b>возраст</b>	
0 – 3 месяца	93
3 – 12 месяцев	145
1 – 2 года	101
2 – 6 лет	263
6 – 12 лет	259
12 – 18 лет	144

Третья часть работы включила в себя анализ данных, полученных в процессе скринингового обследования родившихся в 2017-18 гг. на территории Московской области младенцев. Всего было скринировано 17476 новорождённых, в 2524 случаях потребовалось сделать повторное исследование. Таким образом, было выполнено 20000 исследований количества TREC и KREC в сухих пятнах крови на картах неонатального скрининга

Дизайн обследования включал в себя первичные и повторные анализы, исследование субпопуляционного состава периферической крови младенцев с подозрением на иммунодефицитное состояние методом проточной цитофлуориметрии и катамнез. Дизайн на рисунке 3.





Рисунок 3 – Дизайн скринингового обследования новорождённых

Лабораторное обследование условно-здоровых детей и пациентов с ранее установленными ПИДС осуществлялось в клинической лаборатории ГБУЗ ДГКБ №9 им. Г. Н. Сперанского ДЗМ (заведующая лабораторией – Галева Е. В., главный врач – Корсунский А. А.) Обследование пациентов стационарных отделений и клинико-диагностической поликлиники осуществлялось в клинической лаборатории ГБУЗ ДГКБ №9 им. Г. Н. Сперанского ДЗМ. Скрининговое обследование новорождённых осуществлялось в клинической

лаборатории ГБУЗ ДГКБ №9 им. Г. Н. Сперанского ДЗМ и в медико-генетическом центре московской области ГБУЗ МО МОНИКИ им. М. Ф. Владимирского (заведующая – Калиненко С. Г., главный врач – Семёнов Д. Ю.)

При обследовании применялись следующие методы: клинико-анамнестический, иммунологическое исследование состава крови методом ПЦР в режиме реального времени, иммунологическое исследование состава крови методом проточной цитофлуориметрии, турбидиметрия, общий и биохимический анализы крови.

Клинические диагнозы выставлялись в соответствие с принятой ВОЗ международной классификацией болезней 10 пересмотра, а также в соответствие с принятой международным союзом иммунологических сообществ (IUIS) классификацией первичных иммунодефицитных состояний.

Анализ субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови методом проточной цитофлуориметрии проводился на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (Becton Dickinson, США) с использованием программного обеспечения FACSDiva v7.0. Суспензия клеток метилась следующими моноклональными антителами: CD3, CD19+, CD3-CD(16+56)+, CD3+CD4+, CD3+CD8+ (Becton Dickinson, США) а также соответствующими изотипическими контролями. Для исследования внутриклеточных маркеров клетки, предварительно окрашенные антителами к мембранным антигенам, были пермеабелизованы с применением IntraPrep™ Permeabilization Reagent (Immunotech, Франция), а затем окрашены изотипическим контролем или моноклональными антителами к Foxp3-PC5, (eBioscience, США), Granzyme B (Serotec, Великобритания) в соответствии с методиками производителей.

Референсные значения основных субпопуляций лимфоцитов у детей разных возрастных групп взяты из статьи F. Tosato, G. Bucciol, G. Pantano, M. C. Putti, M.C. Sanzari, G. Basso и M. Plebani «Lymphocytes Subsets Reference Values in Childhood», опубликованной в журнале Cytometry Part A в 2015 году.

Общий и биохимические анализы крови проводились общепринятыми методами на гематологическом анализаторе Advia 2120i (Siemens, Германия).

Клинико-anamнестический метод. При сборе анамнеза особое внимание уделялось повышенной частоте и тяжести эпизодов инфекционных заболеваний, атипичности возбудителей, а также наличию аутоиммунных заболеваний. Клинический осмотр детей проводился в соответствии с общепринятыми методами.

Содержание иммуноглобулинов А, G, М, Е в сыворотке определялось методом турбидиметрии на биохимическом анализаторе Architect (Abbott, США) согласно инструкции производителя.

Количество TREC и KREC было оценено с помощью количественной ПЦР с детекцией в режиме реального времени. Исследование состояло из следующих этапов: получение стандартных плазмидных образцов, получение калибраторов, количественный анализ TREC, KREC и альбумина.

Получение стандартных плазмидных образцов.

Фрагменты TREC, KREC и альбумина для конструирования стандартных образцов амплифицировали с помощью праймеров, приведенных в таблице 4, в следующих условиях: реакционная смесь ПЦР объемом 50 мкл содержала: 1x буфер для Taq-полимеразы (65 mM Tris-HCl (pH 8,9); 16 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,05% Tween 20; 3,5 mM MgCl<sub>2</sub>), 0,2 mM дНТФ, 50 нг геномной ДНК человека, 1 е.а. Taq-полимеразы (Биосан), 0,5 е.а. Pfu-полимеразы (Биосан). Амплификацию проводили в амплификаторе «Терцик» (ДНК- технология) согласно следующей программе: 3 мин при 95 °С начальной денатурации, 35 циклов: 10с при 95°С для денатурации, 10с при 60 °С для гибридизации праймеров, 40 с при 72 °С для элонгации.

Продукты амплификации с праймерами TREC3/TREC4 длиной 1192 п.н., IL17Ra3/IL17- Ra4 длиной 455 п.н. и KREC3/KREC4 длиной 482 п.н.

гидролизировали эндонуклеазой рестрикции HindIII (Сибэнзим, г.Новосибирск) и лигировали с вектором pBluscriptII SK(+), гидролизированным той же эндонуклеазой, в течение 3-х часов с 100 ед.акт. Т4 ДНК-лигазы (Биосан). Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* штамма XL1-Blue (Stratagene).

Таблица 4 – Нуклеотидные последовательности использованных олигонуклеотидных праймеров и Таq-ман зондов

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

У плазмидных клонов, отобранных по результатам рестрикционного анализа, для подтверждения структуры определяли нуклеотидную

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

#### Получение калибраторов.

Концентрацию полученных стандартных плазмидных ДНК определяли спектрофотометрически и флуориметрически (набор Qubit™ BR, Invitrogen). А именно – 2 мкг ДНК подвергали гидролизу эндонуклеазой рестрикции EcoRI для линеаризации. Полученные линейные стандарты разводили до концентрации  $10^7$ - $10^1$  копий плазмидной ДНК на мкл в стерильном буфере, содержащем 10 мМ TrisHCl pH7.6 и ДНК фага лямбда 5 нг на мкл. Концентрацию ДНК в полученных стандартах уточняли с использованием цифровой ПЦР на платформе QX100™ Droplet Digital™ PCR System (Bio-Rad, США) согласно инструкциям фирмы-производителя. Для этого готовили 20 мкл ПЦР-смеси, содержащей исследуемую ДНК (< 66 нг на 20 мкл), 1X ПЦР-смесь (Bio-Rad), 300 нМ олигонуклеотидные праймеры и 100 нМ Taq-man зонд. Для получения микрокапель 20 мкл приготовленной ПЦР-смеси и 70 мкл масла для генерации капель помещали в соответствующие лунки картриджа DG8. 40 мкл полученных микрокапель переносили 96-луночную ПЦР плашку, запечатывали фольгой и помещали в амплификатор. Программа амплификации: 96°C–10мин и далее 50 циклов 96°C–15с, 60 °C – 40 с с финальным прогревом в течение 10 мин при 98 °C. После это микрокапли подвергали считыванию с помощью прибора Droplet Reader, полученные данные обрабатывали в программе QuantaSoft (Bio-Rad, США).

#### Количественный анализ TREC и KREC методом ПЦР-РВ.

Для количественного анализа TREC и KREC проводили мультиплексную ПЦР-РВ. Смесь для ПЦР (объемом 25 мкл) содержала олигонуклеотидные праймеры (см. таблицу 6) TREC2fo, TREC2re, KREC3 и KREC4 – 0,3 мкМ;

IL17RA-U и IL17RA-R – 0,25 мкМ, флюоресцентно-меченые зонды TREC<sub>CP2</sub> и KREC4P – 0,2 мкМ, IL17RA-P – 0,15 мкМ, а также 1x буфер для Taq- полимеразы (65 мМ Tris-HCl (pH 8,9); 16 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,05% Tween 20; 3,5 мМ MgCl<sub>2</sub>), 0,2 мМ дНТФ, 1 е.а. Taq-полимеразы («Био- синтек», Россия) и геномную ДНК человека. Реакцию амплификации проводили в амплификаторах CFX96 (Bio-Rad, США), Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Австралия) и ABI 7500 (Applied Biosystems, США) согласно следующей программе: 15 мин при 95 °С начальной денатурации для активации фермента, 4 цикла: 10 с при 95 °С для денатурации, 30 с при 61 °С для гибридизации праймеров, 15 с при 72 °С для элонгации, далее 39 циклов: 10 с при 95 °С, 30 с при 60 °С, съём флуоресцентного сигнала на каналах FAM/HEX/ROX, 15 с при 72 °С. Для каждого образца анализ проводили в трех повторах, для построения калибровочной кривой использовали стандартные образцы 10<sup>7</sup>, 10<sup>5</sup>, 5 × 10<sup>3</sup> копий на мл. Количество копий анализируемых ДНК мишеней рассчитывали по формуле, выведенной из графика калибровочной кривой с помощью программного обеспечения к соответствующему прибору.

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

### **Достоверность научных положений и выводов**

Степень достоверности результатов исследований определяется представительностью и релевантностью данных, корректностью сбора информации, точностью проведенных расчетов.

Статистический анализ и обработка результатов проводилась с помощью пакета статистических программ R-project версии 3.4.1. Для оценки распределения переменных был использован критерий Шапиро-Уилка. Для оценки силы связи между переменными был использован коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Чувствительность, специфичность и доверительные интервалы были рассчитаны с использованием метода бутстрэп. ROC кривые и

AUC были рассчитаны с использованием 95% доверительного интервала. Результаты считались значимыми, если значение  $p$  было меньше 0,05.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ**

### **Валидизация анализа количества TREC и KREC с помощью иммунофенотипирования крови пациентов с ранее установленными диагнозами первичных иммунодефицитных состояний**

В таблице 5 показан субпопуляционный состав периферической крови пациентов с ранее установленными ПИДС ТКИН выполненный методом проточной цитофлуориметрии. В периферической крови 7 из 14 пациентов нет или почти нет экспрессирующих CD3 маркер лимфоцитов. В 12 случаях нет или почти нет экспрессирующих CD4 маркер клеток. В 12 случаях нет или почти нет экспрессии CD8. У 5 пациентов резко снижено количество В-лимфоцитов. У 2 пациентов выявляются единичные NK-клетки. Таким образом, фенотипы 14 отобранных образцов крови пациентов с первичными иммунодефицитными состояниями тяжёлая комбинированная иммунная недостаточность были следующими: T-B+NK-, T-B+NK+, T-B+NK-, T-B+NK+, T-B+NK+, CD8-B-NK+, T-B-NK+, CD8-B+NK+, T-B-NK+, T-B-NK+, T-B+NK+, T-B-NK+, T-B+NK+, T-B+NK+.

Результаты исследования крови этих же пациентов методом ПЦР-РВ показали, что для 13 из 14 образцов не было получено сигнала амплификации по каналу TREC, у 1 пациента были обнаружены TREC в количестве  $9,40 \times 10^1$  копий на  $10^5$  клеток, при граничной норме  $5 \times 10^2$  коп/10<sup>5</sup> клеток. Такой результат может быть объяснён ненулевыми количествами CD3+CD4+, которых было 3%, что в абсолютном количестве составило 85 клеток в микролитре. Из всех образцов ТКИН, у которых отсутствовали Т-хелперы, этот имел самое высокое количество TREC. В любом случае, выявленные в образце единичные копии TREC позволяли заподозрить серьёзный дефицит Т-лимфоцитов у данного пациента. Таким образом, для мишени TREC в случае пациентов с диагнозом ПИД ТКИН диагностическая чувствительность системы составила 100%. Из группы

пациентов с ТКИН 5 практически не имели В-лимфоцитов. В 3 случаях результаты амплификации по мишени KREC были отрицательными, в двух случаях были обнаружены KREC в количестве в 10 раз меньше нижней границы нормы –  $1,07 \times 10^1$  копий/ $10^5$  клеток и  $8,72 \times 10^0/10^5$  клеток при граничной норме  $7,46 \times 10^1$  копий/ $10^5$  клеток.

Таблица 5 – Субпопуляционный состав периферической крови пациентов с ранее установленными диагнозами ПИДС тяжёлая комбинированная иммунная недостаточность

Пациент	CD3+CD4+		CD3+CD8+		CD3+		CD19+		CD16+56+	
	%	кл/мкл	%	кл/мкл	%	кл/мкл	%	кл/мкл	%	кл/мкл
<b>1</b>	0	0	0	0	10	730	74	540	2	15
<b>2</b>	3	85	2	57	5	142	57	1624	24	684
<b>3</b>	0,82	4	0	0	1,1	5	83	378	0,8	4
<b>4</b>	0,15	0	0,05	0	0,6	0	73	621	0,7	0
<b>5</b>	1,9	4	0	0	2	5	50	113	15	34
<b>6</b>	36	673	1	17	40	748	0,5	10	49	916
<b>7</b>	0	0	0	1	1,3	2	3	5	77	131
<b>8</b>	16,6	161	1	7	17	165	80	775	2	19
<b>9</b>	0,1	0	0	1	0,5	1	0,1	0	98	283
<b>10</b>	21,5	23	12	13	32	35	0,3	0	62	68
<b>11</b>	1	28	1	33	11	307	85	2371	0,7	20
<b>12</b>	9	29	11	35	21	67	0	0	60	191
<b>13</b>	17	61	18	64	50	179	9	32	9	32
<b>14</b>	21	99	3	13	24	113	71	335	2,2	10



Результаты количественного определения TREC и KREC и их сопоставление с фенотипом ПИДС ТКИН можно увидеть в таблице 6.

Таблица 6 – Количество TREC и KREC в периферической крови детей с первичным иммунодефицитным состоянием тяжёлая комбинированная иммунная недостаточность

Пациент	Возраст, лет	Пол	Фенотип ТКИН	TREC на $10^5$ лейкоцитов	KREC на $10^5$ лейкоцитов
1	0,6	М	T-B+NK-	н/о	$2,35 \times 10^1$
2	0,5	М	T-B+NK+	$9,4 \times 10^1$	$3,71 \times 10^4$
3	0,6	М	T-B+NK-	н/о	$1,46 \times 10^4$
4	0,9	М	T-B+NK+	н/о	$2,52 \times 10^3$
5	2,5	М	T-B+NK+	н/о	$2,58 \times 10^3$
6	0,3	Ж	CD8-B-NK+	н/о	н/о
7	0,1	Ж	T-B-NK+	н/о	$1,07 \times 10^1$
8	0,4	Ж	CD8-B+NK+	н/о	$1,05 \times 10^4$
9	0,3	Ж	T-B-NK+	н/о	н/о
10	0,2	М	T-B-NK+	н/о	$8,72 \times 10^0$
11	0,7	М	T-B+NK+	н/о	$1,85 \times 10^5$
12	5,3	М	T-B-NK+	н/о	н/о
13	0,6	Ж	T-B+NK+	н/о	$1,14 \times 10^2$
14	0,7	М	T-B+NK+	н/о	$2,63 \times 10^4$
<b>Референтные нормы:</b>				$6,00 \times 10^2$	$7,46 \times 10^1$

Таким образом, можно утверждать, что результаты анализа количества TREC и KREC методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени полностью соответствуют результатам исследования субпопуляционного состава периферической крови методом проточной цитофлуориметрии. Чувствительность анализа составила 100%.

### **Референтные показатели содержания TREC и KREC у детей разных возрастных групп**

В таблице 7 представлены показатели субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови здоровых детей, чьи данные анамнеза, клинического осмотра, а также показатели общих анализов крови и мочи соответствовали возрастным нормам и исключали течение каких-либо хронических или острых инфекционных заболеваний. Уровни сывороточных иммуноглобулинов были в пределах возрастных норм.

Таблица 7 – Иммунологические параметры субпопуляционного состава периферической крови детей, которые были выбраны для определения референтных значений TREC и KREC

<b>Возраст</b>	<b>0 – 18 лет</b>
<b>CD3+</b>	58 – 60% 1300 – 4800 кл/мкл
<b>CD3+CD4+</b>	31 – 54% 700 – 3500 кл/мкл
<b>CD3+CD8+</b>	16 – 38% 500 – 1040 кл/мкл
<b>CD19+</b>	16 – 27% 400 – 1600 кл/мкл

Статистически значимых различий значений количества TREC и KREC в периферической крови здоровых детей разного пола (критерий Краскела–Уоллиса и Джонкхиера–Терпстра,  $p > 0,05$ ) получено не было, что позволило объединить выборки девочек и мальчиков только по признаку возраста.

Как и ожидалось, уровни TREC снижаются с возрастом, а уровни KREC стабильны.

На первом году жизни минимальное количество TREC у условно-здоровых детей составило  $6,00 \times 10^2$ , максимальное  $1,13 \times 10^4$ . В период 1 – 6 лет уровни TREC варьируют от  $9,92 \times 10^3$  до  $2,27 \times 10^4$ . С 6 до 12 лет от  $5,18 \times 10^2$  до  $5,60 \times 10^3$ . А в возрастной группе 12 – 18 лет от  $1,63 \times 10^2$  до  $1,77 \times 10^3$ .

Уровни KREC, как уже было написано выше, не изменяется с возрастом. Минимальный уровень  $7,46 \times 10^1$ , а максимальный  $7,46 \times 10^3$ .

Полученные референсные значения и средние величины приведены в таблицах 8 и 9.

Таблица 8 – Возрастные нормы TREC в периферической крови, на  $10^5$  лейкоцитов

<b>TREC</b>	<b>0 – 1 год</b>	<b>1 – 6 лет</b>	<b>6 – 12 лет</b>	<b>12 – 18 лет</b>
<b>Max</b>	$1,13 \times 10^4$	$2,27 \times 10^4$	$5,60 \times 10^3$	$1,77 \times 10^3$
<b>Min</b>	$6,00 \times 10^2$	$9,92 \times 10^3$	$5,18 \times 10^2$	$1,63 \times 10^2$

Таблица 9 – Возрастные нормы KREC в периферической крови, на  $10^5$  лейкоцитов

<b>Возраст</b>	<b>0 – 18 лет</b>
<b>Max</b>	$7,46 \times 10^3$
<b>Min</b>	$7,46 \times 10^1$

Результатами работы по валидации анализа и определению референсных норм является патент №2587540 «Способ диагностики состояния иммунной системы пациента и набор праймеров, зондов и стандартных образцов для количественной оценки ДНК молекул TREC, KREC и количества геном эквивалентов ДНК» и регистрационное удостоверение №РЗН 2018/7447 на медицинское изделие «набор реагентов для диагностики in vitro «БиТ-тест» для количественного определения ДНК TREC и KREC методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени по ТУ 21.20.23-001-17608775-2017».

Согласно заключению отчёта клинического исследования испытательного центра федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный научно-практический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» медицинское изделие «Набор реагентов для диагностики in vitro «БиТ-тест» для количественного определения ДНК TREC и KREC методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени по ТУ 21.20.23-001-17608775-2017» может быть рекомендовано к использованию в медицинской практике на территории Российской Федерации.

### **Скрининг иммунодефицитных состояний в амбулаторном звене.**

Первый этап состоял из двух разделов.

В первом разделе была исследована корреляция между уровнями TREC и CD3, CD4 и CD8, а также KREC и CD19. Данные представлены в виде доли пациентов с нормальными показателями одного из маркеров среди всех пациентов с нормальным показателем парного к первому маркера.

Во втором разделе была исследована способность TREC и KREC предсказать ненормальные уровни субпопуляций Т- и В-лимфоцитов. Был проведён ROC-анализ, в результате которого была определена чувствительность анализа при фиксированной специфичности, то есть доля пациентов со сниженными уровнями субпопуляций лимфоцитов при заранее известном

количестве контролей с нормальными показателями проточной цитофлуориметрии. Также был определён AUC.

Второй этап был направлен на оценку прогностической способности TREC и KREC диагностировать первичные иммунодефицитные состояния следующих групп: иммунодефициты с поражением клеточного и гуморального иммунитета (I), комбинированные иммунодефициты, ассоциированные с синдромальными проявлениями (II), и дефекты гуморального иммунитета (III). ROC-анализ проводился отдельно для типов I и II ПИДС и типа III ПИДС. Показатели всех субпопуляций лимфоцитов, а также комбинации TREC и KREC оценивались и сравнивались с точки зрения чувствительности (доля пациентов со сниженными показателями среди всех пациентов с ПИДС) с фиксированной специфичностью (доля заранее известных контролей, правильно обнаруженных, не имеющих ПИДС) и с точки зрения AUC.

#### Популяционные показатели

Данные взяты из историй болезни и лабораторной информационной системы ГБУЗ ДГКБ №9 м. Г. Н. Сперанского ДЗМ.

Из 3055 пациентов, которым было проведено исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови методом проточной цитофлуориметрии за указанный ранее период времени, в силу финансовых ограничений только 1005 образцов периферической крови было исследовано как методом проточной цитофлуориметрии, так и методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Окончательные диагнозы были установлены 471 детям, из них: 263 мальчика и 208 девочек. Из них 226 иммунологически здоровы, 99 с ПИДС из групп I и II, 146 из группы III. Все диагнозы были установлены в соответствии с Международной Классификацией Болезней 10 пересмотра (МКБ-10) и принятой на момент исследования классификацией первичных иммунодефицитных состояний европейским сообществом иммунодефицитных состояний (ESID). Характеристика пациентов по полу, возрасту и диагнозам представлена в таблице 10.

Таблица 10 – Характеристика пациентов, которым после полноценного иммунологического обследования был установлен окончательный диагноз

Группа ПИДС в соответствии с принятой в настоящее время классификацией	Код диагноза в МКБ-10	Возраст	Пол	
			М	Ж
Группа I Иммунодефициты с поражением клеточного и гуморального иммунитетов	D81	0 – 12 месяцев	9	5
		1 – 6 лет	2	0
		6 – 12 лет	1	0
		12 – 18 лет	0	0
Группа II Комбинированные иммунодефициты, ассоциированные с синдромальными проявлениями	D82	0 – 12 месяцев	7	9
	D82.1	1 – 6 лет	26	17
	D82.4	6 – 12 лет	10	6
	D84.8	12 – 18 лет	4	3
Группа III Дефекты гуморального иммунитета	D80.1	0 – 12 месяцев	6	2
	D80.2	1 – 6 лет	21	17
	D80.3	6 – 12 лет	28	21
	D80.4	12 – 18 лет	38	13
	D80.5			
Здоровые дети		0 – 12 месяцев	9	5
		1 – 6 лет	41	48
		6 – 12 лет	36	33
		12 – 18 лет	25	29

## Первый этап

### Сопоставление показателей проточной цитофлуориметрии с TREC и KREC

Сначала была исследована предиктивная способность анализа TREC и KREC в отношении результатов проточной цитофлуориметрии. Обнаружено, что 667 из 863 (77.3%) пациентов с нормальными показателями KREC имеют нормальные показатели CD19, в то время как 667 из 682 (97.8%) пациентов с нормальными показателями CD19 имеют нормальные показатели KREC.

Среди пациентов с нормальными результатами TREC, 462 из 548 (84.3%) имеют нормальные уровни CD3, 440 из 548 (80.3%) имеют нормальные уровни CD4 и 473 из 548 (86.3%) имеют нормальные уровни CD8. Нормальные уровни CD3 имеют 462 из 548 (84.3%) пациентов с нормальными уровнями TREC, 440 из 548 (80.3%) с нормальными уровнями CD4 и 473/548 (86.3%) с нормальными уровнями CD8.

Уровни TREC снижаются с возрастом у здоровых детей, однако, это менее выражено у детей с ПИДС. Данные представлены на рисунке 4.

Была оценена способность TREC предсказывать ненормальные уровни CD3, 4, 8 (рисунок 5) и комбинации TREC и KREC предсказывать ненормальные уровни всех субпопуляций лимфоцитов (рисунок 6). TREC демонстрирует AUC 0.66 (95% CI 0.63 – 0.70), в то время как комбинация TREC и KREC обеспечивает AUC 0.65 (95% CI 0.62 – 0.69). Граничное значение 0.4 показывает наилучшую диагностическую точность с учётом чувствительности и специфичности для TREC (59% и 65%; таблица 11), индекс Юдена ( $J$ ) = 23 и 0.35 для комбинации TREC и KREC (61% и 59% соответственно; таблица 12),  $J = 20.2$ . AUC предиктивной способности в отношении каждого CD для комбинации TREC и KREC показан на рисунке 7.

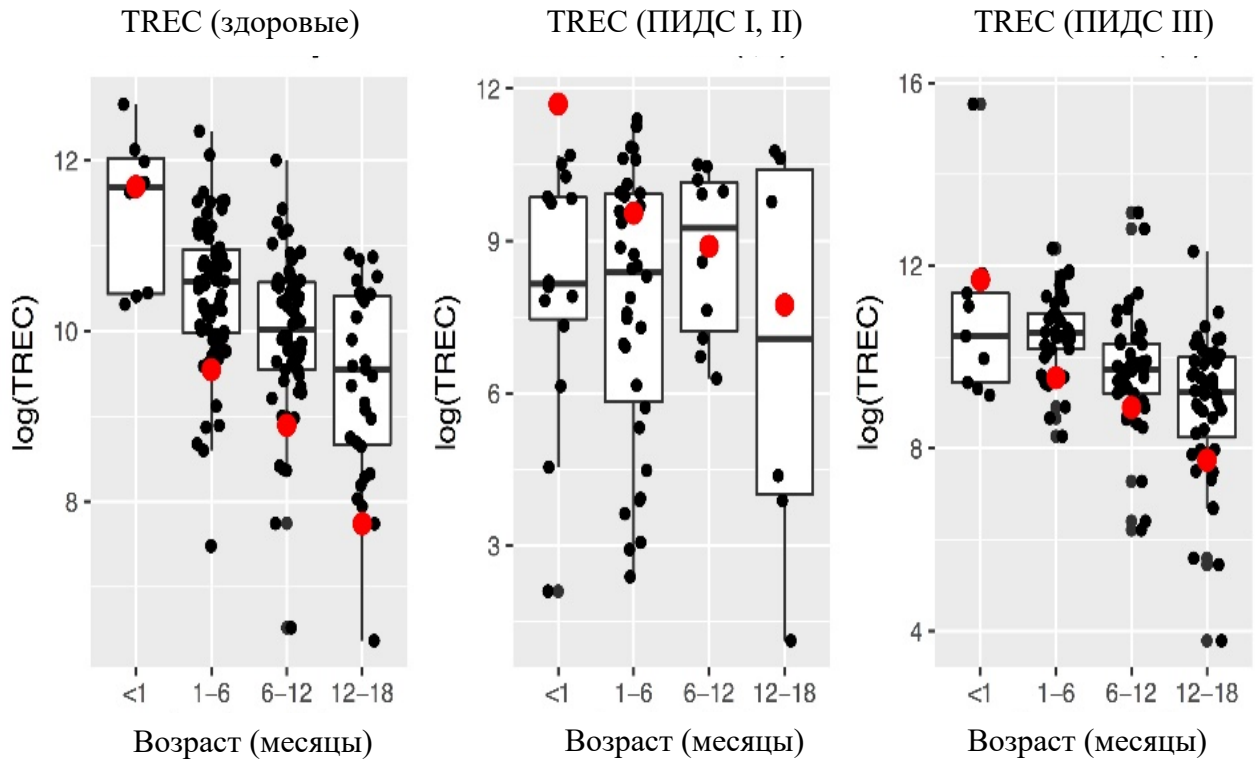


Рисунок 4 – Модели изменений TREC у здоровых детей и пациентов с первичными иммунодефицитными состояниями в разном возрасте

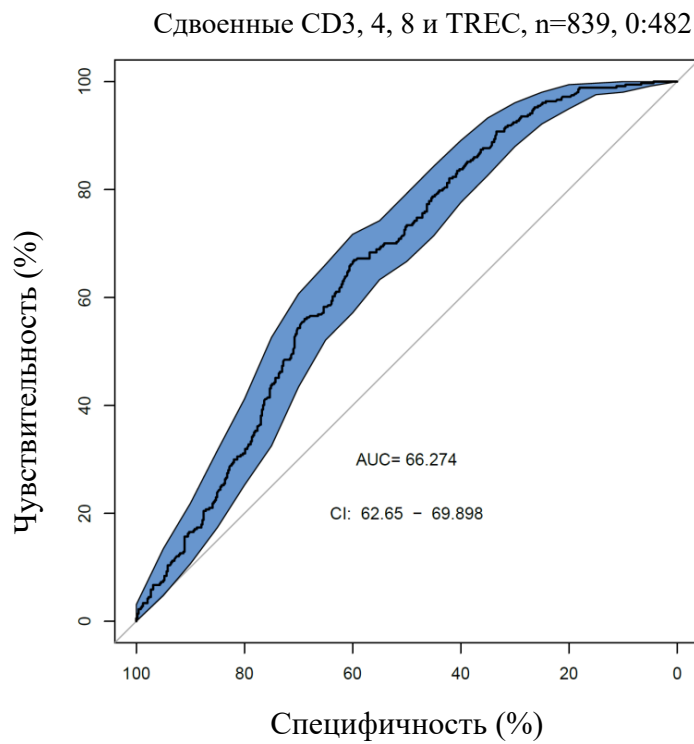


Рисунок 5 – Предиктивная способность TREC в отношении ненормальных уровней CD3, 4 и 8



Таблица 11 – Диагностические значения модели прогнозирования для разных точек отсечения возможных вероятностей для TREC в отношении CD 3, 4 и 8

Точка отсечения (вероятность)	PPV (%)	NPV (%)	Чувствительность (%)	Специфичность (%)	Индекс Юдена (J)
0.4	55	68	59	65	23
0.45	55	61	28	83	10.7
0.5	56	59	17	90	6.7

Таблица 12 – Диагностические значения модели прогнозирования для разных точек отсечения возможных вероятностей для TREC + KREC в отношении всех измеренных CD

Точка отсечения (вероятность)	PPV (%)	NPV (%)	Чувствительность (%)	Специфичность (%)	Индекс Юдена (J)
0.3	43	85	93	24	17.3
0.35	48	71	61	59	20.2
0.4	52	68	43	75	18.2
0.45	54	66	28	86	13
0.55	65	64	13	96	8.5

Сдвоенные CD3, 4, 8 и TREC с KREC, n=931, 1:357, 0:574

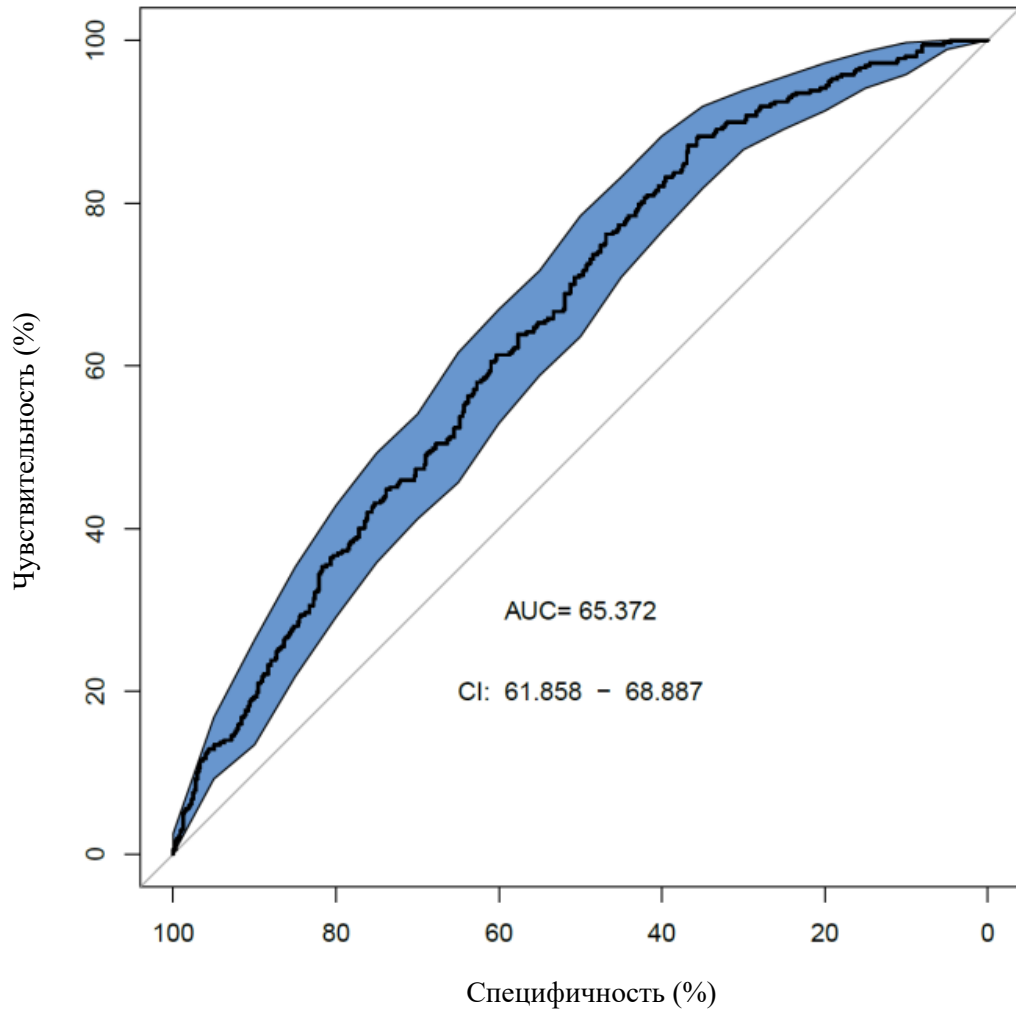


Рисунок 6 – Способность комбинации TREC и KREC предсказать ненормальные уровни всех измеренных CD

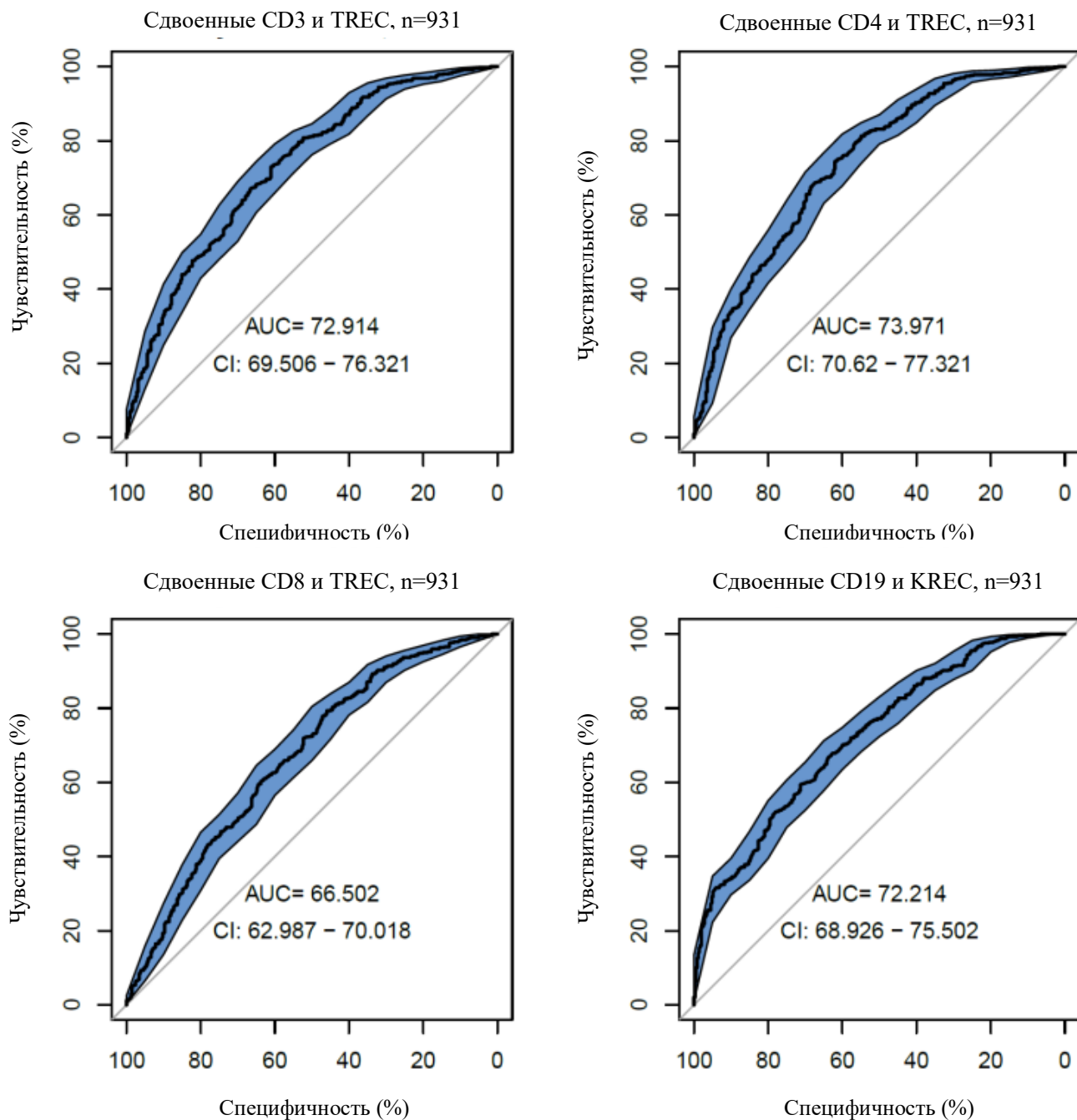


Рисунок 7 – Предиктивная способность TREC и KREC в отношении ненормальных уровней CD3, 4, 8 и KREC в отношении ненормальных CD19

Была обнаружена умеренная корреляция между уровнями TREC с CD4 ( $r=0.55$ ,  $p < 0.01$ ) и KREC с CD19 ( $r=0.56$ ,  $p < 0.01$ ). Слабая корреляция обнаружена между TREC с CD19, CD3 и лимфоцитами ( $r$  между 0.28-0.46,  $p < 0.01$ ) и KREC с CD4 и лимфоцитами ( $r=0.33$ ,  $p < 0.01$ ). Ни TREC, ни KREC не коррелируют с уровнями сывороточных иммуноглобулинов. Данные представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Карта корреляции между уровнями TREC и KREC с иммуноглобулинами, CD3, 4, 8, 19, клетками крови

	Лейкоциты	Лимфоциты	IgG	IgA	IgM	CD4	CD8	CD3	CD19
<b>TREC</b>	0.09**	0.41**	-0.08*	-0.11**	0.002 <sup>NS</sup>	0.55**	0.28**	0.46**	0.34**
<b>KREC</b>	0.11**	0.33**	-0.17**	-0.15**	-0.10**	0.33**	0.12**	0.25**	0.56**

\* -  $p < 0.05$ ; \*\* -  $p < 0.01$ ; NS – не значимые

### Второй этап

#### Использование TREC и KREC с целью скрининга ПИДС

Посчитан AUC предиктивной способности первичных иммунодефицитных состояний для CD3, 4, 8, 19, иммуноглобулинов А и G, TREC и KREC. Для ПИДС I и II групп и III группы были проведены отдельные анализы. AUC предиктивной способности для комбинации TREC и KREC в отношении ПИДС I и II групп составил 0.82 (CI = 0.75 – 0.90). Граничное значение вероятности 0.40 показало лучшую прогностическую способность с учётом чувствительности и специфичности (75% и 86%; таблица 14),  $J = 60.5$ . Комбинация иммуноглобулинов А, G, TREC и KREC показала наилучший AUC 0.77 (CI = 0.71 – 0.82) для ПИДС III группы, с точкой граничного значения 0.80 демонстрирующей наилучшую прогностическую способность с учётом чувствительности и специфичности (70% и 72%; таблица 15),  $J = 42.2$ .

Таблица 14 – Диагностическое значение модели прогнозирования для разных точек отсечения возможных вероятностей для TREC + KREC

Точка отсечения (вероятность)	PPV (%)	NPV (%)	Чувствительность (%)	Специфичность (%)	Индекс Юдена (J)
0.1	30	93	95	22	17.1
0.15	32	92	92	33	24.8
0.2	35	91	88	42	30.2
0.3	51	91	80	73	53.3
0.35	64	91	75	86	60.5
0.4	80	88	62	95	56.5
0.45	80	79	27	98	24.4

На рисунке 8 показано, что предиктивная способность TREC и KREC в отношении первичных иммунодефицитных состояний из групп иммунодефицитов с поражением клеточного и гуморального иммунитетов (I) и комбинированных иммунодефицитов, ассоциированных с синдромальными проявлениями (II) значимо выше, чем у CD-маркеров проточной цитофлуометрии.

Что касается пациентов с дефектами гуморального иммунитета (III), TREC и KREC ожидаемо не прогнозируют отклонения уровней иммуноглобулинов от нормы, но в 100% случаев определяют нормальные показатели клеточного иммунитета, что позволяет исключить комбинированные дефекты. Данные на рисунке 9.

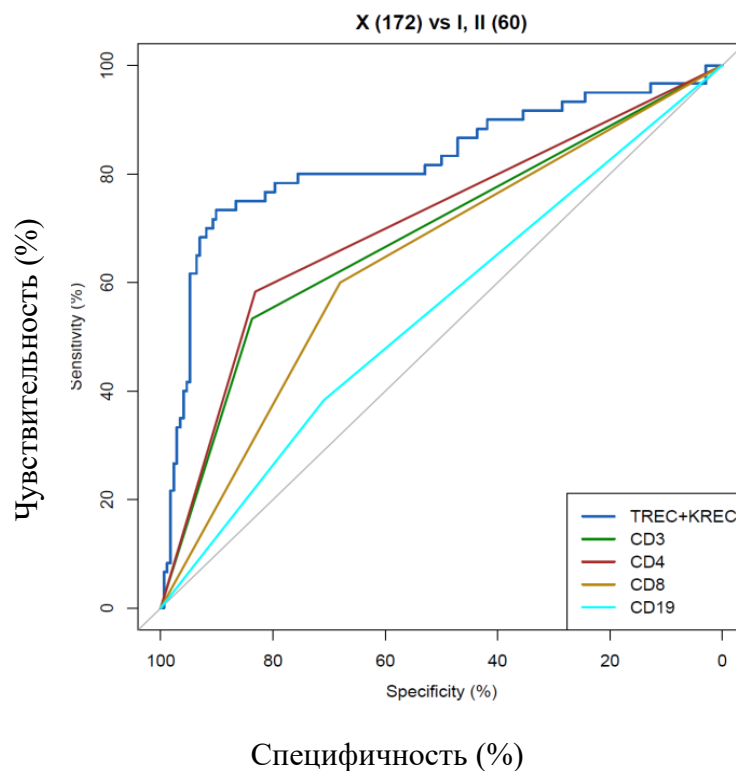


Рисунок 8 – Предиктивная способность TREC и KREC в отношении первичных иммунодефицитных состояний из групп I, II

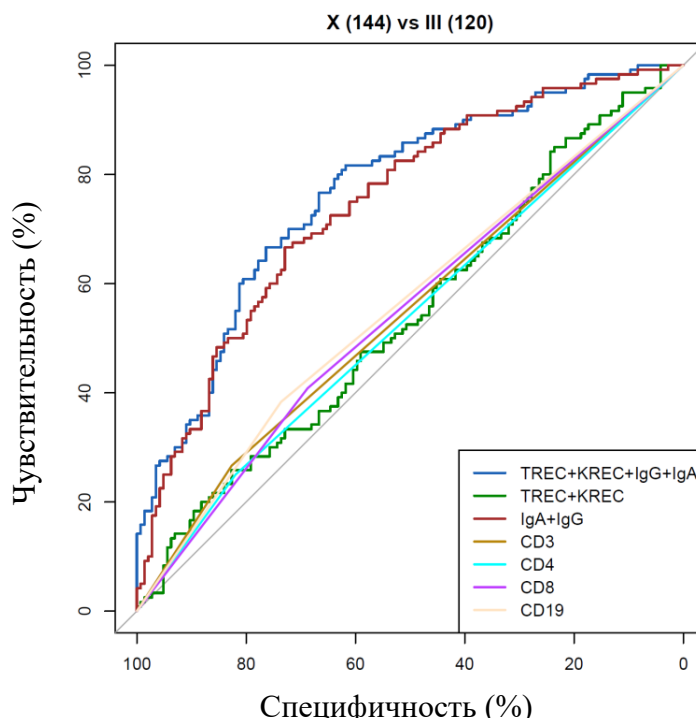


Рисунок 9 – Предиктивная способность TREC и KREC в отношении первичных иммунодефицитных состояний из группы III

Таблица 15 – Диагностическое значение модели прогнозирования для разных точек отсечения возможных вероятностей для TREC + KREC + IgA + IgG

Точка отсечения (вероятность)	PPV (%)	NPV (%)	Чувствительность (%)	Специфичность (%)	Индекс Юдена (J)
0.1	49	92	98	15	13.6
0.2	52	87	95	27	22.1
0.3	55	82	90	39	28.9
0.35	58	81	87	49	35.3
0.4	61	79	82	57	38.6
0.5	68	74	70	72	42.2
0.55	71	71	62	79	40.2
0.6	72	64	43	86	28.6
0.65	77	61	28	93	21.4
0.7	85	60	24	97	20.7
0.8	91	58	16	99	14.4

Таким образом, показано, что количество TREC и KREC в периферической крови детей с подозрением на иммунодефицитные состояния является чувствительным и специфичным инструментом для отбора пациентов на углублённое иммунологическое обследование и скрининга первичных иммунодефицитных состояний. В настоящий момент, отбор пациентов для консультации аллерголога-иммунолога происходит исключительно по субъективным клиническим симптомам. Использование анализа в рутинной практике врачей общей практики позволит формировать более правильный поток пациентов для консультации аллерголога-иммунолога и последующего углублённого иммунологического обследования.

## Неонатальный скрининг первичных иммунодефицитных состояний

В начале работы был проведён анализ количества TREC и KREC в сухих пятнах крови 120 здоровых новорождённых, чьи данные семейного анамнеза, клинического осмотра, результаты иммунологических исследований, а также показатели общих анализов крови и мочи соответствовали возрастным нормам и исключали течение каких-либо хронических или острых инфекционных заболеваний. Таким образом, были определены референсные значения:  $5 \times 10^2$  для TREC и  $1 \times 10^2$  для KREC.

В период с 1 ноября 2017 года по 30 сентября 2018 года было проведено скрининговое обследование 17476 родившихся в родильных домах московской области младенцев. В 14952 случаях результатом анализа были нормальные значения TREC и KREC, тогда как в 2524 случаях показатели TREC и/или KREC были снижены и потому потребовалось повторное исследование. Таким образом, было выполнено 20000 анализов уровней TREC и KREC в сухих пятнах крови на картах неонатального скрининга. Данные по первичным и повторным анализам представлены в таблице 16.

Таблица 16 – Количество исследований уровней TREC и KREC в сухих пятнах крови на картах неонатального скрининга

<b>Исследования</b>	<b>Количество</b>
Первичные	17476
Повторные	2524
Всего	20000

В 131 случае (характеристика по полу и доношенности этих детей представлена в таблице 17) в повторных анализах также были выявлены незначительно сниженные уровни TREC и/или KREC, а в крови 16 новорождённых TREC и/или KREC были существенно ниже референтных значений либо не детектировались вообще. Таким образом, 95 мальчиков и 52



девочки, из которых только 3 младенца родились раньше срока, потребовали углублённого обследования и наблюдения.

Таблица 17 – Характеристика новорождённых со сниженными показателями TREC и/или KREC

Пол		Доношенность		Вес при рождении (гр)	
м	ж	доношенный	недоношенный	минимум	максимум
95	52	144	3	1350	4810

В 131 случае показатели были снижены незначительно. Эти дети взяты под контроль участковыми педиатрами районных поликлиник, к которым прикреплены эти пациенты.

В 16 случаях показатели TREC и/или KREC были существенно ниже референтных значений, что позволило выделить их в группу риска иммунодефицитных состояний.

Развернутое иммунологическое обследование методом проточной цитофлуориметрии 9 младенцев из этой группы не выявило каких-либо отклонений в иммунном статусе. Последующее исследование количества TREC и KREC в периферической крови этих детей также не выявило каких-либо отклонений. В показателях общих анализов крови была выявлена лейко- и лимфопения разной степени тяжести. В настоящий момент, рост и развитие этих детей проходят без особенностей.

3 младенца сразу после рождения были госпитализированы в отделения реанимации и интенсивной терапии областных и районных больниц с диагнозом бактериальной инфекции прямо из родильных домов и в течение следующих 6-11 дней умерли от бактериального сепсиса. Возможностей для углублённого иммунологического обследования этих детей не представилось.

Родители 4 детей от углублённого обследования отказались.

Таким образом, показано, что младенцы со сниженными показателями TREC и/или KREC в сухих пятнах крови на картах неонатального скрининга относятся к

группе риска по развитию тяжёлых инфекционных заболеваний. К ним должно быть проявлено пристальное внимание неонатологов и иммунологов.

## ВЫВОДЫ

1. Доказана высокая чувствительность анализа количества TREC и KREC методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в отношении пациентов с первичным иммунодефицитным состоянием тяжёлая комбинированная иммунная недостаточность, составившая 100%;
2. Предиктивная способность анализа количества TREC и KREC методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в отношении дефектов клеточного иммунитета значимо выше, чем у соответствующих CD-маркеров проточной цитофлуориметрии;
3. Определены референсные значения количества копий TREC и KREC в сухих пятнах крови на картах неонатального скрининга. Они составляют  $5 \times 10^2$  для TREC и  $1 \times 10^2$  для KREC.
4. Определены референсные интервалы TREC в периферической крови (на  $10^5$  лейкоцитов). Для первого года жизни они составляют от  $6,00 \times 10^2$  до  $1,13 \times 10^4$ , для возрастной группы от 1 до 6 лет от  $9,92 \times 10^3$  до  $2,27 \times 10^4$ , для возрастной группы от 6 до 12 лет от  $5,18 \times 10^2$  до  $5,60 \times 10^3$ , для возрастной группы от 12 до 18 лет от  $1,63 \times 10^2$  до  $1,77 \times 10^3$ . Референсные интервалы KREC периферической крови (на  $10^5$  лейкоцитов) для всех возрастных групп варьируют от  $7,46 \times 10^1$  до  $7,46 \times 10^3$ ;
5. Чувствительность и специфичность анализа количества TREC и KREC в сухих пятнах крови новорождённых на картах неонатального скрининга являются достаточными для выявления первичных иммунодефицитных состояний до их клинической манифестации;
6. Анализ количества TREC и KREC в периферической крови детей разных возрастов является достаточно чувствительным и специфичным для выявления

пациентов с иммунодефицитными состояниями, требующими углублённое иммунологическое обследование.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

Рекомендуется использовать анализ количества TREC и KREC в сухих пятнах крови методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в системе неонатального скрининга Российской Федерации с целью выявления младенцев с первичными иммунодефицитами для углублённого обследования и раннего начала специфической терапии.

При получении сниженных показателей TREC и/или KREC в сухом пятне крови новорождённого, необходимо сделать повторный анализ из другого пятна. При повторном получении сниженных показателей необходимо госпитализировать ребёнка в специализированное иммунологическое отделение с целью провести углублённое обследование ребёнка, включающее в себя исследования гуморального иммунитета методом турбидиметрии и клеточного иммунитета методом проточной цитофлуориметрии.

Рекомендуется использовать анализ количества TREC и KREC в периферической крови пациентов с подозрением на иммунодефицитное состояние в рутинной практике врачей-педиатров с целью определения необходимости консультации врача аллерголога-иммунолога и дальнейшего углублённого обследования и лечения.

При комбинации клинических симптомов, присущих иммунодефицитным состояниям и снижении показателей TREC и/или KREC необходимо направить пациента на консультацию аллерголога-иммунолога для углублённого иммунологического обследования, включающего в себя исследование исследования гуморального иммунитета методом турбидиметрии и клеточного иммунитета методом проточной цитофлуориметрии. При выраженном снижении показателей TREC и/или KREC необходимо госпитализировать пациента в специализированное иммунологическое отделение минуя амбулаторный этап.

## СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. M. Gordukova, **I. Korsunskiy**, N. Davydova, A. Smirnova, O. Barabanova, O. Shvech, S. Zimin, N. Zinoveva, M. Filipenko, A. Prodeus. The quantification of T-cell receptor recombination excision circles (TREC) and Kappa-deleting recombination excision circles (KREC) in children with predominant T-cell immunodeficiency in Russia. // Journal of Clinical Immunology Volume 34, Issue 2, October 2014
2. **I. Korsunskiy**, M. Gordukova, N. Davydova, A. Smirnova, O. Barabanova, T. Kosacheva, Y. Konopliannikova, S. Zimin, N. Zinoveva, M. Filipenko, A. Prodeus. The quantification of T-cell receptor recombination excision circles (TREC) and Kappa-deleting recombination excision circles (KREC) in children with B-cell immunodeficiencies. // Journal of Clinical Immunology Volume 34, Issue 2, October 2014
3. Гордукова М.А., Оскорбин И.П., Любимова Н.Е., Останкова Ю.В., Семенов А.В., Гордукова М.В., **Корсунский И.А.**, Филипенко М.Л., Тотолян А.А. Определение значений нормы TREC и KREC в периферической крови новорождённых. // Медицинская иммунология. 2015. Т. 17. № 5. С. 353.
4. Гордукова М.А., Давыдова Н.В., **Корсунский И.А.**, Никитина И.А., Филипенко М.Л., Продеус А.П. Не диагностированные первичные иммунодефициты могут являться причиной ранней детской смертности! // Медицинская иммунология. 2015. Т. 17. № 5. С. 346.
5. 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.
6. Мунблит Д.Б., Корсунский И.А. Про- и пребиотики в профилактике и лечении аллергических заболеваний. // Русский Медицинский Журнал. 2016. Т. 24. № 6. С. 354-367.

7. Мунблит Д.Б., **Корсунский И.А.** Определение специфических IgG-антител к пищевым продуктам в диагностике пищевой аллергии: миф или реальность? // Русский Медицинский Журнал. 2016. Т. 24. № 18. С. 1206-1209.
8. **Патент на изобретение № 2587540**, Российская Федерация, G01N 33/53. Способ диагностики состояния иммунной системы пациента и набор праймеров, зондов и стандартных образцов для количественной оценки ДНК молекул TREC, KREC и количества геном эквивалентов ДНК / Гордукова М.А., Продеус А.П., Филипенко М.Л., **Корсунский И.А.** – 2015132823/15, заявл. 06.08.2015, **опубл. 20.06.2016, Бюл. №17**
9. Федорова Л.А., Пушкова Е.С., **Корсунский И.А.**, Продеус А.П. Самый частый иммунодефицит. // **Лечащий врач.** 2017. № 1. С. 11
10. Munblit D., **Korsunskiy I.**, Asmanov A., Heather H. The role of breastfeeding and weaning practice in allergic disease development. // Current Allergy & Clinical Immunology | June 2017 | Vol 30, No 2
11. D Munblit, M Treneva, **I Korsunskiy**, A Asmanov, A Pampura, J O Warner, A national survey of Russian physicians' knowledge of diagnosis and management of food-induced anaphylaxis. // **BMJ Open.** 2017;7:e015901
12. **Корсунский И.А.**, Гусева Н.Б., Гаткин Е.Я., Корсунский А.А., Федорова Л.А., Пушкова Е.С., Зиновьева Н.В., Продеус А.П. Комплексное лечение рецидивирующего цистита при нейрогенной дисфункции мочевого пузыря у девочек. // Педиатрия им. Г.Н. Сперанского. 2017. Т. 96. № 1. С. 209-211.
13. **Корсунский И.А.**, Гордукова М.А., 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, No 5, С. 505-512.
14. Гаткин Е.Я., Гусева Н.Б., **Корсунский И.А.**, Хлебутина Н.С. Эффективность комплексного лечения детей с расстройствами мочеиспускания для повышения качества их жизни. // Вестник последипломного медицинского образования. 2017. № 1. С. 45-50.

15. Фёдорова Л. А., Пушкова Е. С., Зимин С. Б., **Корсунский И. А.**, Зиновьева Н. В., Продеус А. П., Корсунский А. А. Болезнь Уиппла у ребёнка с первичным иммунодефицитным состоянием – селективным дефицитом IgA. // **Педиатрия имени Сперанского** 2017, №6, С. 200-204.
16. Мунблит Д. Б., **Корсунский И. А.**, Колотилина А. И., Пампура А. Н. Синдром энтероколита, индуцированного пищевыми белками. // Педиатрия имени Сперанского. 2017, №6, с 150 – 156
17. **Корсунский И. А.**, Пушкова Е. С., Зимин С. Б., Гордукова М. А., Давыдова Н. В., Продеус А. П., Корсунский А. А. Выявление синдрома Ниймеген с помощью исследования уровней TREC и KREC методом ПЦР в режиме реального времени. // «Доктор.Ру» **Педиатрия** 2017, №15 (144), с 30 – 32
18. **Корсунский И.А.**, Гордукова М.А., Смирнова А.С., Мунблит Д.Б., Давыдова Н.В., Козлов И.Г., Продеус А.П., Корсунский А.А., Румянцев А.Г. Целесообразность неонатального скрининга первичных иммунодефицитных состояний // РМЖ. 2018. № 9. С. 29–32.
19. Чотчаева А.А., Колотилина А.И., **Корсунский И.А.**, Смирнова Г. И., Асманов А. И., Мунблит Д. Б. Аллергический ринит: подходы к диагностике и лечению // РМЖ. 2018. № 9. С. 22–28.
20. **Korsunskiy I**, Blyuss O, Gordukova M, Davydova N, Zaikin A, Zinovieva N, Zimin S, Salpagarova A, Filipenko M, Prodeus A, Korsunskiy A, Hsu P, Munblit D. Expanding TREC and KREC utility in primary immunodeficiency diseases diagnosis. // *European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2018. Volume 73, Supplement 105, p 304 – 305.
21. **Korsunskiy I**, Blyuss O., Gordukova M., Davydova N., Zaikin A., Zinovieva N., Zimin S., Salpagarova A., Filipenko M., Prodeus A., Korsunskiy A., Hsu P., Munblit D. TREC and KREC levels as a predictors of flow cytometry results. // **European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 2018. Volume 73, Supplement 105, p 45.
22. Peshko D., Titova E., **Korsunskiy I.**, Dunn-Galvin A., Munblit D. A systematic review of health-related quality of life in children and adults with primary

immunodeficiencies. // **European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 2018. Volume 73, Supplement 105, p 305 – 306.

23. **Korsunskiy IA**, Blyuss O, Gordukova MA, Davydova NV, Gordleeva SY, Molchanov R, Asmanov AI, Peshko D, Zinovieva NV, Zimin SB, Lazarev VV, Salpagarova A, Filipenko ML, Kozlov IG, Prodeus AP, Korsunskiy AA, Hsu P, Munblit DB. TREC and KREC levels as a predictors of lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry. // **Frontiers in Physiology**, 2018.

24. Peshko D, Titova E, **Korsunskiy I**, Kondrikova E, Pulvirenti F, Quinti I, Blyuss O, Galvin AD, Munblit D. Health-Related Quality of Life in Children and Adults with Primary Immunodeficiencies: A Systematic Review and Meta-analysis. **The journal of allergy and clinical immunology. In Practice**. 2019 Feb 20. pii: S2213-2198(19)30179-5. doi: 10.1016/j.jaip.2019.02.013

25. **Корсунский И.А.**, Продеус А.П., Румянцев А.Г., Гордукова М.А., Корсунский А.А., Кудлай Д.А., Филипенко М.Л., Шустер А.М.. Скрининг новорождённых на первичные иммунодефициты и группу риска иммунорегуляторных расстройств, требующих диспансерного наблюдения. // **Педиатрия имени Сперанского**. 2019, №3, С. 49-54.

26. 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 новорождённых с иммунодефицитными состояниями в РФ.// **Медицинская иммунология**. 2019, Т. 21, №3. С. 527-538.