

На правах рукописи

**ГОРДУКОВА
Мария Александровна**

**РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО
МЕТОДА АНАЛИЗА МОЛЕКУЛ ДНК TREC И KREC ДЛЯ
ДИАГНОСТИКИ ПЕРВИЧНЫХ ИММУНОДЕФИЦИТНЫХ
СОСТОЯНИЙ**

14.03.10 - клиническая лабораторная диагностика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург– 2021

Работа выполнена в ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» Министерства Российской Федерации по делам гражданской обороны, чрезвычайных ситуаций и ликвидации последствий стихийных бедствий

Научный руководитель:

Продеус Андрей Петрович, доктор медицинских наук профессор

Официальные оппоненты:

Кушлинский Николай Евгеньевич, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, лаборатория клинической биохимии, заведующий;

Владимир Александрович Козлов, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, ФГБНУ "Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии" Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, научный руководитель

Ведущая организация: Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Защита состоится «26» октября 2021 года в 12:00 часов на заседании диссертационного совета Д 205.001.01 при ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 4/2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 197374, Санкт-Петербург, ул. Оптиков, д.54 и на сайте <https://nrcerm.ru>

Автореферат разослан « » 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
к.м.н. доцент

Санников М.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Первичные иммунодефицитные состояния (ПИД) представляют собой гетерогенную группу врожденных нарушений иммунной системы, которые являются следствием высокопенетрантных мутаций в более чем 300 генах (Picard, 2015). Эти мутации влияют на фенотип или функцию врожденной и/или адаптивной иммунной системы, изменяют функцию Т- и В-лимфоцитов за счет нарушения рекомбинации V(D)J, переключения классов и соматической гипермутации, что приводит к хронизации инфекционного процесса и воспалению (Derroorter, 2018). Характерной особенностью ПИД является повышенная восприимчивость к инфекционным заболеваниям, часто вызываемым микроорганизмами с низкой патогенностью. ПИД могут проявляться аутоиммунными и аутовоспалительными заболеваниями, а также злокачественными новообразованиями (ASCIA 2019; Knight 2019). Тяжелые формы ПИД, такие как тяжелая комбинированная иммунная недостаточность (ТКИН), приводят к раннему развитию рецидивирующих инфекционных заболеваний и смерти детей в первые два года жизни (Тузанкина, 2018). Менее тяжелые ПИД могут позже развить клиническую картину с разной неспецифической симптоматикой, имеют плохой долгосрочный прогноз, приводят к инвалидизации и снижают качество жизни ребенка (Slatter, 2006).

Согласно национальному регистру, распространенность ПИД в РФ составляет 1,35 человека на 100 тыс. населения, в то время как в Европейском регионе - 6-7 случаев на 100 тыс. новорожденных (Seidel, 2019; Мухина, 2019).

Основной проблемой ПИД (в т.ч. ТКИН) является поздняя диагностика, которая влечет за собой неадекватное и несвоевременное лечение таких больных (Тузанкина, 2018). Особенностью ПИД является отсутствие специфических признаков и клинических проявлений, которые можно было бы обнаружить при физикальном обследовании новорожденного. ТКИН является неотложным иммунологическим состоянием и требует быстрой диагностики и лечения. Известно, что результаты лечения пациентов значительно улучшаются, если терапия с помощью ТГСК проводится в возрасте до 3,5 месяцев, до появления тяжелых инфекций и других осложнений (Pai, 2014). Реально это возможно

осуществить только при раннем выявлении детей с ТКИН посредством программы скрининга новорожденных. ТКИН проявляется значительным снижением или отсутствием Т-лимфоцитов, и, таким образом, скрининг новорожденных на Т-клеточную лимфопению является идеальной стратегией для выявления заболевания. Ранняя диагностика и своевременное лечение ПИД позволяют либо вылечить эти заболевания, либо достичь стабилизации общего состояния и нормального качества жизни больных (Щербина, 2016а).

Эксцизионные кольца Т-клеточного рецептора (TREC) представляют собой небольшие кольцевые молекулы эписомальной ДНК, которые образуются во время реаранжировки генов Т-клеточного рецептора (TCR) в наивных Т-клетках и, таким образом, являются суррогатными маркерами для клеток - недавних эмигрантов тимуса (Douek, 1998). В 2005 году Чан и Пак впервые описали применение теста с TREC в крупномасштабном исследовании – популяционном скрининге на ТКИН и другие формы Т-клеточной лимфопении (Chan, 2005).

Также была описана возможность расширения скрининга для других нозологических форм с помощью исследования эксцизионных колец каппа-делеционного элемента (KREC), позволяющих идентифицировать детей с ПИД с В-клеточной лимфопенией. Примером могут служить Х-сцепленная агаммаглобулинемия (XLA) (возникает в результате мутации в гене ВТК) и аутосомно-рецессивные XLA-подобные расстройства. Как и у Т-лимфоцитов гены, кодирующие В-клеточный рецептор, также подвергаются перестройке вариабельных, разнообразных и соединяющихся доменов (V (D) J-рекомбинация) с тем, чтобы образовалось множество уникальных рецепторов к возможным антигенам. Этот процесс завершается формированием функционального рецептора на поверхности В-лимфоцита и также эписомальной кольцевой ДНК - KREC. van Zelm с соавт. описали этот процесс и разработали анализ KREC на основе ПЦР, а Nakagawa с соавт. показали возможность его применения для выявления новорожденных с В-клеточными дефектами, доказав, что у пациентов с XLA отсутствуют KREC в образцах цельной крови и в неонатальных картах Гатри (Nakagawa, 2011; van Zelm, 2007).

Степень разработанности темы. Sottini с соавторами предложили одновременное определение TREC и KREC, но в дуплексном варианте и только с использованием прибора 7500 FastReal-Time PCR (Applied Biosystems). Borte et al. в 2012 использовали систему Sottini et al., 2010 в триплексном варианте. Однако в своей работе авторы не описали многие аналитические характеристики предложенного метода (например, нижние пределы детекции и измерений), несмотря на заявляемые низкие пороговые уровни отсечения измеряемых аналитов – 15 TREC/мкл и 10 KREC/мкл – для скрининга врожденных иммунодефицитов. Кроме того, имеющаяся в литературе информация о диагностической значимости одновременного выявления TREC и KREC остается неполной и, в некоторых случаях, даже противоречивой. Описанная авторами система не может быть использована без дальнейшего ее улучшения и адекватной характеристики.

Таким образом, можно заключить, что разработка высокочувствительного метода для одновременного определения концентрации TREC и KREC как в образцах ДНК из периферической крови, так и ДНК, полученной из сухих пятен крови, собираемых в ходе национальной программы скрининга новорожденных, является актуальной задачей, имеющей важное научно-практическое значение.

Цель настоящей работы - Разработать и валидировать анализ TREC и KREC для диагностики первичных иммунодефицитных состояний.

Задачи исследования:

1. Разработать и валидировать метод проведения мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени» для количественного анализа молекул ДНК TREC и KREC, а также однокопийного нормировочного локуса в геноме человека. Определить его аналитические характеристики.

2. Оценить эффективность различных протоколов выделения ДНК из сухих пятен крови новорожденных из карт Гатри, их совместимость с предложенным методом определения молекул ДНК TREC и KREC.

3. Определить референсные интервалы значений TREC и KREC на популяционной выборке сухих пятен крови новорожденных на картах Гатри.

4. Провести оценку диагностических характеристик разработанного набора реагентов с использованием коллекций образцов от пациентов с подтвержденными диагнозами ТКИИ и агаммаглобулинемия.

5. Охарактеризовать значения TREC и KREC у пациентов разного возраста с синдромами Ди Джорджи, повреждения Ниймегена, атаксией телеангиэктазией (Луи-Бар), Кавасаки, Дауна, с общим варибельным иммунодефицитом, гипер-IgM синдромом, избирательным дефицитом иммуноглобулина А.

6. Охарактеризовать информативность прогноза смертности у детей с тяжелыми состояниями на основе количественного анализа TREC/KREC.

7. У пациента со стабильным снижением количества TREC в цельной крови с неуточненным диагнозом "ОВИН?" провести расшифровку молекулярной этиологии заболевания с помощью экзомного секвенирования.

Научная новизна работы. В представленной работе проведена разработка нового высокочувствительного метода для одновременного определения нормированной концентрации TREC и KREC в образцах ДНК из венозной крови и сухих пятен крови для выявления иммунодефицитных состояний как у новорождённых до клинической манифестации заболевания, так и у детей более старшего возраста с целью диагностики различных иммунодефицитных состояний (ИДС), а также с целью дифференциальной диагностики Т- и В-клеточных ПИД от других типов ИДС. Разработан полный протокол определения TREC и KREC в сухих пятнах крови на картах Гатри с целью проведения неонатального скрининга ПИД. Проведено определение референсных значений TREC и KREC, характерных для Российской популяции. Впервые показано, что количество TREC может являться значимым предиктором летального исхода у критически больных детей на первом году жизни. Также впервые проведен анализ значений TREC и KREC при болезни Кавасаки. Разработанный в результате выполнения протокол определения нормированной концентрации TREC и KREC в образцах ДНК человека лег в основу первого получившего регистрационное удостоверение Росздравнадзора набора реагентов для клинического использования.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Разработанный протокол лабораторной диагностики ПИД позволяет проводить рутинный скрининг с использованием описываемого в работе отечественный набора реагентов для ранней диагностики ТКИН и других форм первичных иммунодефицитов у новорожденных. Продемонстрированы высокие аналитические и диагностические характеристики разработанного набора реагентов, позволяющего количественно оценивать тимопоз в норме, при комбинированных и изолированных Т- и В-клеточных иммунодефицитных состояниях, при критических состояниях в отделении реанимации. Данная работа является примером того, каким образом должно быть выстроено лабораторное обследование в диагностике ПИД: начиная от сухого пятна крови и заканчивая применением секвенирования следующего поколения для постановки диагноза. Разработанный набор реагентов может применяться в КДЛ, оснащенной стандартным оборудованием для проведения ПЦР в режиме реального времени. Полученные в настоящем исследовании данные о снижении TREC (суррогатный маркер количества наивных Т-клеток) при сепсисе и других осложнениях инфекционного процесса у детей могут являться отправной точкой для дальнейших фундаментальных исследований особенностей ответа иммунной системы при таких типах тяжелых состояний пациентов.

Методология и методы исследования. В работе применялись стандартные методы выделения ДНК, геной инженерии, ПЦР в реальном времени, капельной ПЦР, а также различные методы статистической обработки полученных данных в соответствии с типом анализируемых данных и проверяемой гипотезы.

Положения, выносимые на защиту.

1. Разработанная тест-система на основе метода мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени» для определения нормированного количества ДНК TREC, KREC соответствует требованиям, предъявляемым к аналитическим характеристикам клинико-диагностических тестов.

2. Референсные значения TREC и KREC в сухих пятнах крови на картах Гатри определены по международным клинико-диагностическим стандартам и могут быть использованы для программы неонатального скрининга ПИД в РФ.

3. Разработанный метод количественного анализа TREC и KREC имеет высокую диагностическую эффективность для установления диагнозов тяжелая комбинированная иммунная недостаточность и агаммаглобулинемия.

4. Использование метода количественного анализа TREC и KREC имеет клиническое значение как для скрининга, так и для дифференциальной диагностики пациентов с синдромами Луи-Бар, Ниймеген, Ди Джорджи и Дауна.

Степень достоверности и апробация результатов.

Достоверность полученных результатов исследования обеспечена обоснованностью исходных теоретических позиций, статистически обоснованными объемами исследуемых выборок, использованием современных лабораторных методов, воспроизводимостью результатов исследований, применением адекватных статистических методов и критериев. Объем выборки для определения референсных интервалов был выбран учетом распределения значений аналита TREC и KREC, которое имеет значительную асимметрию и не соответствует нормальному, и составил 2739 образцов сухих пятен крови. В параллели с методом «золотого стандарта» проточной цитометрией с определением популяций лимфоцитов CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+ и CD19+ было проведено 1533 исследования TREC и KREC у детей разного возраста и с разными диагнозами, что позволило оценить характеристики разработанного набора реагентов по отношению к результатам иммунофенотипирования.

Апробация. Результаты работы были представлены на конференциях: Объединенный иммунологический форум, Нижний Новгород, 2013 г.; V Всероссийская с международным участием школа-конференция по клинической иммунологии «Иммунология для врачей», Пушкинские Горы, Псковская область, 2014 г.; The 16th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies (ESID 2014), Прага, 2014 г.; XX Всероссийская научно-практическая конференция «Достижения и перспективы развития лабораторной службы России», Москва, 2015 г.; The 17th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies (ESID 2016), Барселона, 2016 г.; I междисциплинарная научная конференция «Аутоиммунные и иммунодефицитные заболевания», Москва, 2016 г.; XVI Всероссийский научный форум с международным участием

имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге», Санкт-Петербург, 2017 г.; XVII ассамблея «Здоровье Москвы», Москва, 2018 г.; IV московский городской Съезд педиатров с международным участием «Трудный диагноз» в педиатрии. Междисциплинарный подход. Москва, 2018 г.; The 18th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies Лиссабон, Португалия, 2018 г.; Национальная конференция «Клиническая иммунология и аллергология – междисциплинарные проблемы», Москва, 2019 г.; X Конгресс НОДГО «Актуальные проблемы и перспективы развития детской гематологии-онкологии в Российской Федерации», Сочи, 2019 г.; Объединенный иммунологический форум, Новосибирск, 2019 г.; XIX Конгресс детских инфекционистов России с международным участием, Москва, 2020 г.

Внедрение результатов исследования. Разработанный набор реагентов успешно прошел клинические испытания в ФГБУ «ННПЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России.

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».

Получено регистрационное удостоверение РК-ИМН-5№017228, которое позволяет использовать разработанный набор реагентов на территории Казахстана.

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 и НИИ Матери и Ребенка г. Кишинев, Молдова.

Результаты полученные в ходе диссертационного исследования используются в процессе обучения врачей на циклах совершенствования и профессиональной переподготовки врачей ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский

университет имени И. М. Сеченова МЗ РФ (Сеченовский Университет).

Личный вклад автора. Все результаты, приведенные в настоящей работе, получены самим автором либо при его непосредственном участии.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 24 печатные работы, из них 11 в рецензируемых научных изданиях, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертации, 2 публикации в международных журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus, 1 патент.

Структура и объём работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка процитированной литературы. Работа изложена на 264 страницах, содержит 72 рисунка и 67 таблиц. Список процитированной литературы включает 529 источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Разработка мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме "реального времени" для количественного анализа TREC и KREC, а также однокопийного нормировочного локуса в геноме человека

Первым этапом нашей работы стало клонирование протяженных (более 200 п.н.) фрагментов TREC, KREC, генов IL17RA и альбумина для создания плазмидных стандартных ДНК, которые необходимы как для оптимизации условий ПЦР, так и для определения динамического диапазона измерений, лимита квантификации (LOQ) и лимита детекции (LOD). Полученные рекомбинантные плазмиды линеризовали эндонуклеазами рестрикции, измеряли концентрацию флуорометрически и с помощью ddPCR (см. Материалы и Методы), разводили до концентраций 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 копий плазмиды на мкл для использования в дальнейших этапах работы

Мы протестировали олигонуклеотидные праймеры и зонды для TREC, описанные во многих работах по скринингу на ТКИИ (Baker, 2009; Borte, 2012) и констатировали недостаточную эффективность амплификации (менее 85% при использовании

четырёх разведений в четыре раза двух случайных ДНК здоровых детей с возрастом не более года). В экспериментах с плавлением с интеркалирующим красителем EvaGreen® и при любой температуре отжига праймеров было показано наличие неспецифичных продуктов амплификации. Таким образом, необходимо было подобрать другую пару праймеров и зондов для мишени TREC, отличающуюся более высокой специфичностью и позволяющей достичь лучших показателей эффективности амплификации.

При выборе праймеров и зондов для мишени KREC также были проанализированы предложенные ранее структуры (van Zelm, 2007). Ввиду наличия большого количества их вторичных структур, разброса в температурах отжига, было необходимо подобрать другую пару праймеров и соответствующий им зонд, которые бы при мультиплексировании с мишенями TREC и нормировочного локуса показывали адекватную эффективность ПЦР и не взаимодействовали друг с другом.

Часто используемый в указанных выше работах обратный праймер на геномный локус beta-actin 5'-CGTCACACTTCATGATGGAGTTG-3', используемый для оценки количества геномной ДНК человека, показал 100% гомологию с псевдогенами на различных хромосомах человека. Это может увеличивать вероятность образования неспецифичных продуктов ПЦР, что также побудило нас найти новый референсный ген и подобрать к нему пару олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченный зонд.

Праймеры и зонды для ПЦР были подобраны с учетом нуклеотидных последовательностей TREC и KREC таким образом, чтобы исключить отжиг на матрице геномной ДНК (перестроенной и не перестроенной в Т- и В-лимфоцитах и в любых других клетках человека не лимфоцитарного ряда), а также с учетом минимизации образуемых в мультиплексной реакции праймер-димеров. Структуры разработанных и в дальнейшем используемых олигонуклеотидных праймеров и зондов приведены в разделе «Материалы и методы». Оптимальную температуру отжига праймеров, при которой в эксперименте не наблюдается образования неспецифических продуктов, но наблюдается высокая эффективность амплификации, подбирали с помощью градиентной

ПЦР с использованием как флуоресцентного зонда, так и интеркалирующего красителя (EvaGreen®) с последующим анализом кривых плавления. Оптимальную концентрацию ионов Mg^{2+} в реакционной смеси определяли, тестируя коммерчески доступные буферы для ПЦР с различной его концентрацией, она составила 3,5 мМ. Также нами были определены оптимальные концентрации праймеров и зондов, обеспечивающие максимальную эффективность амплификации всех типов ампликонов в области как больших, так и малых концентраций геномной ДНК человека (табл. 1).

Таблица 1. Оптимальные параметры разработанной системы: олигонуклеотидный состав

Выявляемая мишень	Название олигонуклеотида	Конечная концентрация в реакции, мкМ	Размер ампликона
sjTREC (T cell receptor excision circles)	TREC2 forward	от 0,45 до 0,65	144 п.н.
	TREC2 reverse	от 0,6 до 0,85	
	TREC2 probe	0,15-0,25	
sjKREC (k-deleting recombination excision circles)	KREC3	от 0,6 до 0,85	112 п.н.
	KREC4	от 0,6 до 0,85	
	KREC4 probe	0,15-0,25	
ВКО - Homo sapiens ген альбумина	Alb-U	0,25-0,35	98 п.н.
	Alb-R	0,25-0,35	
	Alb-PR	0,1-0,15	

Для повышения чувствительности и специфичности ПЦР был применен "горячий старт", который обеспечивался как использованием химически модифицированной Taq-полимеразы, так и с использованием специфических к Taq-полимеразе моноклональных антител. С целью увеличения чувствительности без снижения специфичности был оценен вклад различных соединений, способных улучшать ПЦР: бетаин, ДМСО, БСА, коммерческая ПЦР-смесь "Синтол" с энхансерами (Frackman, 1998), однако, они не оказали существенного влияния на эффективность ПЦР.

Аналитическая характеристика разработанной системы

Для определения LOD (limit of detection - минимальное количество ДНК матрицы, при котором результаты ПЦР положительны в 95% повторов) и LOQ (limit of quantification - наименьшее количество аналита, которое может быть измерено с приемлемой точностью) был проведен мультиплексный анализ 4х разведений стандартных образцов ДНК TREC, KREC и ALB в 20 повторах с построением калибровочной кривой на 4х повторах этих же стандартных ДНК. В проведенном анализе только при концентрации 5 копий на реакцию одна из 20 реплик по каналу TREC (FAM) являлась ложно-негативной. Таким образом, LOD (95%) для мишени TREC составил 5 копий на реакцию. Дальнейший анализ коэффициента вариации на всех 3 мишенях показал, что при концентрации 10 коп/реак коэффициент вариации составил для TREC – 38,3%, что близко к 35% стандартному значению, а для KREC и ALB (%) – 27,5 и 29,9% (менее 35%), соответственно. Таким образом, LOQ составил 10 копий измеряемых ДНК мишеней на реакцию.

Надежность (robustness) - это мера способности аналитической процедуры не менять свои аналитические характеристики при незначительных, но вероятных вариациях. К одной из наиболее значимых таких вариаций относится выполнение анализа на схожих по назначению, но разных (по производителю) приборах. В связи с этим, надежность оценивалась в постановках на приборах CFX96 (Bio-rad), ABI7500 (Applied Biosystems), RG3000 (Corbett Research) и Light Cycler 96 (Roche). Анализ показал, что вне зависимости от используемого прибора сохраняется определенный ранее уровень детекции по всем трем мишеням – не хуже 6 копий на реакцию.

Для того, чтобы оценить чувствительность разработанного набора реагентов для амплификационной части и для этапа экстракции ДНК совместно, был проведен эксперимент, заключающийся в создании пулированных образцов крови, полученных от детей с установленными диагнозами ТКИН и агаммаглобулинемия, подтвержденными данными проточной цитометрии, добавлением к ним крови здоровых детей того же возраста в разном соотношении, и экстракции ДНК из 100 мкл полученных пулированных образцов. Образцы пулированной крови были разбавлены кровью от большого с ТКИН или агаммаглобулинемией в различных соотношениях от

10% до 100%. Анализ показал, что система позволяет воспроизводимо оценивать количество молекул TREC/KREC в модельных образцах крови, содержащих всего 10% крови здоровых детей. Следовательно, можно заключить, что 10 мкл крови достаточно для проведения подобного анализа.

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

Линейный диапазон количественного определения копийности TREC, KREC и ALB определяли с помощью ПЦР на разведениях стандартных плазмид от 10^9 коп/мл до 10^3 коп/мл. В области исследуемых концентраций для всех трех мишеней наблюдается линейный диапазон изменения Ct от концентрации с коэффициентом корреляции R^2 не хуже 0,98.

Для оценки вариации значений Ct по всем трем мишеням были рассчитаны среднее значение и стандартное отклонение по 120 запускам на приборе Rotor-Gene 3000 и 50 запускам на приборе CFX96 для калибратора №2 (K2) с концентрацией 3×10^5 копий на мл, соответственно, всего было произведено 170 измерений этой точки. В случае набора реагентов Enlite™ Neonatal TREC производитель оценил вариацию путем 108 измерений Ct 7-ми образцов сухих пятен, SD для TREC колебалось от 0,65 до 0,87 (EnLite Neonatal TREC kit). В работе Audrain в многоцентровом исследовании на территории Франции диапазон SD для TREC составил 0,25 – 0,45 (Audrain, 2018). Значения Ct для K2 в 120 постановках на амплификаторе Rotor-gene по TREC характеризовались разбросом Ct от 19,93 до 22,72 (среднее Ct – 21,77 [95% CI 21,68– 21,85]) и стандартным отклонением 0,47, что меньше, чем заявлено в инструкции к набору реагентов производства PerkinElmer, и близко к значению SD, полученному во Франции.

Определение референсных интервалов TREC и KREC для скрининга новорожденных

Сухие пятна крови представляют собой небольшую каплю капиллярной крови, полученной из прокола пальца или из пятки

новорожденных ланцетом, помещенную на бумажный фильтр и затем высушенную. Данный способ получения клинического образца для проведения дальнейших диагностических процедур имеет низкую себестоимость, менее инвазивный, чем отбор венозной крови из локтевой вены, и не требует специальных условий хранения. Для определения референсных интервалов требуется группа клинически здоровых индивидуумов с целью установления «нормальных» значений тестируемого аналита. Определение референсных норм у новорожденных стоит в ряду организационно сложных задач, для которых популяционные подходы с минимальным отбором на стадии формирования выборки и дальнейшим статистическим анализом целевого аналита являются методом выбора (Poole, 2016). Особенно это применимо для редких заболеваний, для которых попадание «больных» субъектов в референсную группу имеет низкую вероятность. К такой группе заболеваний относятся первичные иммунодефицитные состояния (ПИД), и в частности, ТКИН.

Мы использовали популяционную выборку сухих пятен крови новорожденных на картах Гатри размером 2739 индивидуальных образцов для определения референсных интервалов значений молекул ДНК TREC и KREC. Медиана полученных абсолютных значений TREC и KREC составила 195 (CI95%: 185-206) и 185 (CI95%: 176-197) копий на мкл, соответственно, нормированных значений для TREC – 2780 (CI95%: 2690-2840) и для KREC – 2790 (CI95%: 2700-2900) копий на 2×10^5 копий гена альбумина или 10^5 ядросодержащих клеток. Референсный интервал рассчитывался для 99 и 99,9 перцентилей всех величин TREC и KREC. Для фильтрации «выпадающих» значений был применен критерий Тьюки после логарифмической трансформации данных, ввиду их несимметричного распределения. При анализе абсолютных значений (TREC/KREC на мкл крови) не было идентифицировано «выпадающих» значений TREC, для KREC из дальнейшего анализа было исключено 18 значений (от 9,8 до 13,5). В нормированных значениях TREC/KREC «выбросов» не выявлено. Полученные нижние референсные значения TREC и KREC (на уровне 0,1 перцентиля) составили 458 и 32 на 10^5 ядросодержащих клеток, 23 и 17 на мкл крови новорожденных соответственно.

TREC и KREC в сухих пятнах крови от умерших детей.

В ретроспективное исследование вошли образцы от 24 детей, умерших на первом году жизни от генерализованных вирусных и бактериальных инфекций, что позволяет заподозрить у них ПИД. Для проверки этой гипотезы из ГБУЗ «НПЦ ПЗДП им. Г.Е. Сухаревой ДЗМ» были получены карты новорожденных от этих детей, содержащие сухие пятна крови. Из 24 образцов ДНК присутствовала и была пригодна для анализа для 22 образцов. Из них в 18 образцах TPEC и KPEC превышали граничное значение. Из четырех образцов, в которых полученные значения TREC оказались сниженными, трое принадлежали недоношенным детям, для которых незрелость иммунной системы является временным фактором, обусловленным гестационным возрастом. Исследование выявило одного ребенка, в сухом пятне крови которого отсутствовали TREC, а KREC находились на нижней границе нормы. В возрасте 1,5 месяцев пациенту было проведено иммунофенотипирование, подтвердившее результаты анализа TREC и KREC и диагноз ПИД, ТКИН. Несмотря на относительно раннюю постановку диагноза, этот ребенок умер в связи с генерализацией ЦМВ-инфекции.

Установление пороговых значений TREC_n и KREC_n для различных ИДС

ТКИН – генетически неоднородная группа заболеваний (более 15 генетических вариантов), но все пациенты имеют общую составляющую: полное отсутствие или очень низкий уровень функциональных Т-лимфоцитов из-за нарушения развития Т-клеток в тимусе, что приводит к выраженным дефектам клеточных и гуморальных параметров иммунитета (Buckley, 2004). Х-сцепленная агаммаглобулинемия (XLA) характеризуется ограниченным количеством или отсутствием зрелых В-лимфоцитов или секретирующих антитела плазматических клеток, острые и хронические заболевания легких являются ведущей причиной смерти (41% случаев) при этом заболевании.

Для определения пороговых нормированных значений TREC для диагноза ТКИН и KREC для диагноза XLA был проведен ROC-анализ, в который вошли образцы цельной крови от 40 детей с ТКИН и 23 детей с XLA. Группу сравнения для ТКИН составил 181

ребенок в возрасте до 1 года, для XLA - 171 ребенок той же возрастной группы.

Таблица 2. Пороговые значения TREC/KREC для ТКИН и XLA

Диагноз	ТКИН	XLA
Диагностическое граничное значение TRECn	94	-
Диагностическое граничное значение KRECn	-	12
Чувствительность	97,50%	96,65%
Специфичность	100,0%	100,0%

Аналогично, ROC-анализ для установления пороговых значений TRECn и KRECn был проведен для 37 детей с атаксией-телеангиэктазией, 28 детей с синдромом Ниймеген, 75 детей с синдромом Ди Джорджи, 13 детей с синдромом Дауна, 136 детей с ОВИН, 11 детей с гипер-IgM синдромом, 45 детей с селективным дефицитом IgA, 10 детей с синдромом Кавасаки.

Таблица 3. Пороговые значения TREC/KREC для различных ИДС

Диагноз	Атаксия-телеангиэктазия	Синдром Ниймеген	Синдром Ди Джорджи	Синдром Дауна
Диагност. гранич. значение TRECn	318	209	499	209
Чувствительность	91,89%	93,33%	64,00%	84,62%
Специфичность	97,18%	95,32%	85,83%	93,79%
Диагност. гранич. значение KRECn	230	85	679	209
Чувствительность	86,49%	80,00%	84,00%	92,31%
Специфичность	96,61%	97,66%	24,87%	59,89%
	ОВИН	Гипер-IgM синдром	Селект. дефицит IgA	Синдром Кавасаки
Диагност. гранич. значение TRECn	319	>1939	>1414	1270
Чувствительность	36,03%	81,82%	53,33%	50,0%
Специфичность	90,64%	48,02%	70,18%	71,75%
Диагност. гранич. значение KRECn	146	1070	>445	899
Чувствительность	25,00%	9,09%	82,22%	10,00%
Специфичность	92,40%	70,06%	37,43%	75,71%

Следовательно, для разных ИДС исследование TREC и KREC имеет разную диагностическую значимость, а для некоторых - селективный дефицит IgA, гипер-IgM синдром и синдром Кавасаки - не применимо вовсе.

Тяжелые состояния. В 2018-2019 гг. было проведено проспективное обсервационное исследование, в которое вошли пациенты в возрасте до 1 года, кому по тяжести состояния потребовалась госпитализация в отделение ИОРИТ в виду необходимости респираторной поддержки, нарушения сердечного ритма или органной недостаточности, гипоперфузии. Статистический анализ распределения значений TRECn, KRECn, СРБ и ПКТ в группах новорожденных «тяжело болеющих» (1-я группа) и «умерших» (2-я группа) с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни и введением поправки Бонферрони позволил выявить статистически значимое снижение TREC ($p = 0,0004$) и увеличение уровня прокальцитонина ($p = 0,004$) во второй группе («умершие»). Распределение значений TRECn в группах - популяционная норма, тяжело болеющие и умершие дети - имело статистически значимые отличия ($p < 0,0001$). Разница медиан для TRECn в исследуемых группах также оказалась высоко статистически значима ($p < 0,001$). различий в количестве KREC в цельной крови в группах «тяжелых состояний» и «умерших» выявлено не было: медианы нормированных значений KREC составили 742,4 и 501,3 копий KREC на 10^5 лейкоцитов соответственно ($p = 0,3963$).

Молекулярная диагностика для пациента с диагнозом "ОВИН?". Полноэкзомное секвенирование было проведено с целью установления окончательного диагноза 17-летнему мальчику, имевшему в анамнезе признаки общей вариабельной иммунной недостаточности (ОВИН), рецидивирующие легочные инфекции, хроническую вирусную ЭБВ, лимфаденопатию, снижение субкласса IgG3 и отсутствие субкласса IgG4, и количество TRECn на нижней границе нормы, многократно госпитализированного в отделение иммунопатологии многопрофильного стационара. Мы показали наличие гетерозиготной миссенс-мутации E1021K в гене PIK3CD, кодирующем p110d (с.3061G > A [p.E1021K]). Присутствие данной мутации в геноме пациента было подтверждено с помощью секвенирования по Сэнгеру, а ее отсутствие в образцах ДНК от

родителей пациента свидетельствует о возникновении этой мутации de novo. Другие мутации в генах, задействованных в функционировании иммунной системы, также были подтверждены секвенированием по Сэнгеру, включая TLR3 p.L412F, TNFRSF1A p.R121Q (rs4149584), ассоциированные с периодической болезнью. В результате полноэкзомного секвенирования диагноз "ОВИН?" был уточнен и изменен на "синдром активированной фосфоинозитол 3-киназы- δ ", для которого описаны возможные таргетные пути терапии. Для выявления мутации в PIK3CD нами был предложен тест на основе HRM, что позволило исследовать выборку образцов ДНК от пациентов с диагнозами ОВИН, гипогаммаглобулинемия и гипер-IgM синдром (96 пациентов). Ни у одного обследуемого не была выявлена эта мутация.

Выводы

1. Разработанный нами метод мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени» для количественного анализа молекул ДНК TREC, KREC, гена альбумина показал приемлемые аналитические характеристики (специфичность – 100%, LOD (95%) для 3 мишеней - 5 копий на реакцию, LOQ (95%) для 3 мишеней - 10 копий на реакцию, высокую робастность), позволяющие применить его в клинико-диагностической практике.

2. С использованием разработанного метода нами определены референсные значения TREC и KREC в сухих пятнах крови на картах Гатри (медианы полученных нормированных значений для TREC - 2780 (CI95%: 2690-2840), для KREC - 2790 (CI95%: 2700-2900) копий на 10^5 ядросодержащих клеток; нижние границы (99.9% референсный интервал) – 458 TREC и 32 KREC копий на 10^5 ядросодержащих клеток), которые можно рассматривать как отправную точку для организации программ неонатального скрининга ПИД, базирующихся на анализе количества TREC/KREC в крови новорожденных.

3. Валидация предложенного метода количественного анализа TREC и KREC на образцах крови пациентов с ТКИН и агаммаглобулинемией показала высокую диагностическую эффективность. Анализ TREC для выявления ТКИН - AUC=0,975 (ДИ95% 0,945 - 0,991), SE - 97,50%, SP - 100,0%, cut-off < 94 копий

TREC/10⁵ лейкоцитов; анализ KREC для выявления агаммаглобулинемии - AUC=0,996 (ДИ95% 0,973 - 1,000), SE - 95,65%, SP - 100,0%, cut-off < 12 копий KREC/10⁵ лейкоцитов.

4. Скрининг на основе анализа TREC/KREC эффективен для выявления пациентов с синдромами Луи-Бар (TREC AUC=0,984 (0,957 - 0,996) TRECn-D < 318, SE=91,9% и SP=97,2%; KREC AUC=0,961 (0,926 - 0,983) KRECn-D < 230, SE=86,5% и SP=96,6%) и Ниймеген (TREC AUC=0,980 (0,950 - 0,995) TRECn-D < 209, SE=93,33% и SP=95,32%; KREC AUC=0,881 (0,828 - 0,923) KRECn-D < 85, SE=80,0% и SP=97,66%). Несмотря на меньшую диагностическую чувствительность в изолированном варианте, дополнительная квантификация KREC может увеличивать чувствительность скрининга. В динамике, в течение нескольких лет, значения TREC и KREC могут стабильно сохраняться на уровне ниже референсных значений.

5. Скрининг на основе анализа TREC позволяет выявлять значимые количество пациентов с синдромами ДиДжоржи и Дауна, не информативен для пациентов с общим варибельным иммунодефицитом, гипер-IgM синдромом, избирательным дефицитом иммуноглобулина А.

6. Впервые охарактеризованы в отношении количества TREC пациенты с болезнью Кавасаки. Несмотря на описанный ранее дисбаланс субпопуляций Т-клеток, содержание TREC в крови этих пациентов не отличается от популяционного контроля и не может являться диагностическим маркером (AUC=0,533 (0,459 - 0,606).

7. Количество TRECn (AUC=0,822 (CI95%: 0,752 - 0,879) TRECn-D<528, SE=91,67% и SP=63,12%, p < 0,0001) лучше предсказывает летальный исход у критически больных детей на первом году жизни, чем ПКТ (AUC=0,788 (CI95%: 0,714—0,850) Пороговый уровень > 2,62 SE=83,33% и SP=70,21%, p < 0,0001).

8. Экзомное секвенирование является новым эффективным подходом для изучения молекулярных механизмов гетерогенной группы пациентов с ОВИН, что было продемонстрировано на примере пациента с таким диагнозом, для которого выявлено наличие гетерозиготной миссенс-мутации E1021K в гене PIK3CD, кодирующем p110d (c.3061G>A [p.E1021K]). Дальнейший скрининг 47 пациентов с диагнозом ОВИН и «ОВИН?», 39 пациентов с диагнозом гипогаммаглобулинемия или дефицит субклассов IgG и

10 пациентов с диагнозом гипер-IgM синдром показал, что данный тип мутации отсутствует в геномах исследуемых пациентов, что может свидетельствовать о меньшем распространении этой мутации в российской популяции по сравнению с европейскими.

Практические рекомендации

Результаты проведенного исследования позволяют сформулировать практические рекомендации для врачей клинической лабораторной диагностики, иммунологов-аллергологов:

1) Количественный анализ TREC и KREC в образцах ДНК, выделенной из мононуклеарной фракции периферической крови и пятен крови на Гатри картах, рекомендуется для диагностики пациентов с тяжелыми комбинированными иммунодефицитами и агамглобулинемией, а также для дифференциальной диагностики Т-клеточных и Т- и В-клеточных ПИД.

2) Количественный анализ TREC и KREC в образцах ДНК, выделенной из мононуклеарной фракции периферической крови и пятен крови на Гатри картах, рекомендуется в качестве дополнительного теста для скрининга пациентов с синдромами Луи-Бар и Ниймеген.

3) Рекомендуется повторное проведение количественного анализа TREC и KREC с целью исключения ПИД для детей, попавших в инфекционную реанимацию, для увеличения специфичности теста.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Перспективно исследовать возможность применения набора реагентов при других редких состояниях, связанных с изменением количества Т- и В-лимфоцитов, например, при гемофагоцитарном лимфогистиоцитозе и других. Важна разработка алгоритмов применения анализа для определения эффективности ВААРТ у взрослых пациентов.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в научных изданиях, входящих в перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, а также в международных базах данных, для опубликования основных научных результатов диссертации по специальности: 14.03.10 - клиническая лабораторная диагностика (биологические науки):

1. Гордукова, М.А. и др. 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 / М.А. Гордукова и др. // Медицинская иммунология. – 2015. – Vol. 17, № 5. – P. 467-478.

2. Образцов, И.В. и др. Эксцизионные кольца V(D)J рекомбинации В- и Т-клеток как показатели иммунологической реконституции у детей с острым лимфобластным лейкозом / И.В. Образцов, М.А. Гордукова, Е.В. Цветкова и др. // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2016. – Vol. 15, № 4. – P. 42–50.

3. Образцов, И.В. и др. Эксцизионные кольца V(D)J рекомбинации В- и Т-клеток как прогностический маркер при В-клеточном хроническом лимфолейкозе / И.В. Образцов, М.А. Гордукова, Н.А. Северина и др. // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2017. – Vol. 10, № 2. – P. 131–140.

4. Корсунский, И.А. и др. Клинические и эпидемиологические аспекты первичных иммунодефицитных состояний и их раннего обнаружения / И.А. Корсунский, М.А. Гордукова, И.Г. Козлов и др. // Медицинская иммунология. – 2017. – Vol. 19, № 5. – P. 505–512.

5. Корсунский, И.А. и др. Выявление синдрома Ниймеген с помощью исследования уровней эксцизионных колец рекомбинации Т- и В-клеток / И.А. Корсунский, Е.С. Пушкова, С.Б. Зимин, М.А. Гордукова, и др. // Доктор.Ру. – 2017. – Vol. 15, № 144. – P. 35–37.

6. Гордукова, М.А. и др. Случай пациента с диагнозом “Овин?”: выявление гетерозиготной миссенс-мутации E1021K в гене *Pik3Cd* с помощью экзомного секвенирования / М.А. Гордукова и др. // Российский Иммунологический Журнал. – 2018. – Vol. 12, № 1. – P. 54–64.

7. Дерипапа, Е.В. и др. Синдром Ниймеген у детей: клинико-лабораторная характеристика и оценка эффективности различных

видов терапии / Е.В. Дерипапа, Ю.А. Родина, А.Л. Лаберко, М.А. Гордукова и др. // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. – 2018. – Vol. 97, № 4. – P. 116–124.

8. Корсунский, И.А. и др. Целесообразность неонатального скрининга первичных иммунодефицитных состояний / И.А. Корсунский, М.А. Гордукова, А.С. Смирнова и др. // Российский медицинский журнал. – 2018. – № 9. – P. 29–32.

9. Гордукова, М.А. и др. Определение референсных интервалов TREC и KREC для скрининга новорожденных с иммунодефицитными состояниями в РФ / М.А. Гордукова и др. // Медицинская иммунология. – 2019. – Vol. 21, № 3. – P. 527–538.

10. Хачирова, Л.С. и др. Диагностическая значимость эксцизионных колец реаранжировки генов T- и В-клеточных рецепторов для диагностики иммунных нарушений у новорожденных / Л.С. Хачирова, Л.Ю. Барычева, Л.Т. Кубанова, М.А. Гордукова и др. // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2019. – Vol. 14, № 4. – P. 631–635.

11. Deripapa, E. и др. Prospective study of a cohort of Russian Nijmegen breakage syndrome patients demonstrating predictive value of low kappa-deleting recombination excision circle (KREC) numbers and beneficial effect of hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) / E. Deripapa, D. Balashov, Y. Rodina, A. Laberko, N. Myakova, N. Davydova, M. Gordukova и др. // Frontiers in Immunology. – 2017. – Vol. 8, № JUL.

12. Korsunskiy, I.A. и др. TREC and KREC levels as a predictors of lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry / I.A. Korsunskiy, O. Blyuss, M.A. Gordukova и др. // Frontiers in Physiology. – 2019. – Vol. 9, – P. 1877.

Статья, индексируемая в РИНЦ из списка в ВАК не по специальности

13. Корсунский, И.А. и др. Скрининг новорожденных на первичные иммунодефициты и группу риска иммунорегуляторных расстройств, требующих диспансерного наблюдения / И.А. Корсунский, А.П. Продеус, А.Г. Румянцев, М.А. Гордукова и др. // Педиатрия. Журнал им. Сперанского. – 2019. – Vol. 98, № 3. – P. 49–54.

Патент

14. Гордукова, М.А. и др. Патент на изобретение № Ru 2587540 от 06.08.2015 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 / М.А. Гордукова и др. // – 2015. – – P. 1–18.

Тезисы докладов и конференций

15. Gordukova, M.A. и др. ESID-0630 The Quantification of T-cell receptor recombination excision circles (TREC) and Ig kappa – deleting recombination excision circles (KREC) in children with predominant T-cell immunodeficiency in Russia / М.А. Gordukova и др. // J Clin Immunol. – 2014. – Vol. 34, – P. S139–S515.

16. Korsunsky, I.A. и др. ESID-0649 The quantification of T-Cell receptor recombination excision circles (TREC) and IG kappa – deleting recombination excision circles (KREC) in children with B-Cell immunodeficiencies / I.A. Korsunsky, M.A. Gordukova и др. // J Clin Immunol. – 2014. – – P. 4121233–4121235.

17. Obratsov, I. V. и др. V(D)J recombination excision circles as markers of T- and B-cell immune reconstitution in patients with acute lymphoblastic leukaemia / I. V. Obratsov, M.A. Gordukova и др. // 10th SIOP Asia 10th SIOP Asia. – 2016. – – P. 16.

18. Образцов, И.В. и др. Разнообразие антигенного репертуара В- и Т-клеток как прогностический маркер при В-ХЛЛ / И.В. Образцов, М.А. Гордукова и др. // Гематология и трансфузиология. – 2016. – Vol. 61, № 1. – P. 154.

19. Gordukova, M.A. и др. A case of CVID patient: exome sequencing revealed heterozygous missense mutation E1021K in the PIK3CD gene / М.А. Gordukova и др. // ESID 2016, 17th Biennial Meeting. – 2016. – – P. 66.

20. Davydova, N.V. и др. ESID6-0278. Abnormalities in the T and B lymphocytes phenotypes in patients with chromosome instability syndromes / N.V. Davydova, A.S. Smirnova, M.A. Gordukova и др. // ESID 2016, 17th Biennial Meeting. – 2016. – – P. 310

21. Davydova, N.V. и др. ESID6-0285. Autoimmune complications in children with chromosome 22q11.2 deletion syndrome / N.V. Davydova, O.V. Shvez, A.S. Smirnova, M.A. Gordukova и др. // ESID 2016, 17th Biennial Meeting. – 2016. – – P. 416.

22. Dorif, A. и др. Quantification of TREC/KREC levels in blood of newborns in Moldova / A. Dorif, M.A. Gordukova, M.L. Filipenko и др. // Romanian journal of rare disease. – 2017. – – P. SP8.5.

23. Korsunskiy, I.A. и др. Trec and krec utility in primary immunodeficiency diseases diagnosis / I.A. Korsunskiy, O. Blyuss, M.A. Gordukova и др. // European Academy of Allergy and Clinical Immunology Congress. – 2018. – – P. 304.

24. Dorif, A. и др. History and opportunities of primary immunodeficiency screening around the world / A. Dorif, M.A. Gordukova, M.L. Filipenko и др. // Proceedings of 5th medical genetics congress with international participation. – 2018. – – P. 151–157.