

ISSN 1814-6023 (Print)

ISSN 2524-2350 (Online)

УДК 616-021.3-097-07:577.21

<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-3-226-235>

Поступила в редакцию 13.06.2022

Received 13.06.2022

**Е. А. Полякова¹, М. В. Стёганцева¹, И. Е. Гурьянова¹, Д. В. Луцкович¹,
Е. Я. Скоповец¹, А. В. Любушкин¹, Т. П. Володащик¹, В. И. Казак¹,
Ю. В. Скибо², М. В. Белевцев¹**

¹Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии,
д. Боровляны, Минский р-н, Республика Беларусь

²Казанский федеральный университет, Казань, Российская Федерация

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОДУКТОВ РЕАРАНЖИРОВОК Т- И В-КЛЕТОЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ TREC И KREC У ПАЦИЕНТОВ С ВРОЖДЕННЫМИ ОШИБКАМИ ИММУНИТЕТА

Аннотация. Врожденные ошибки иммунитета, такие как первичные иммунодефициты у детей, представляют значимую проблему для здравоохранения, поэтому исключительно важным является совершенствование лабораторной диагностики данной патологии путем создания новых, эффективных методов раннего выявления нарушений, вовлекающих иммунные механизмы.

Цель данного исследования – оценка диагностической значимости определения количества копий кольцевых фрагментов ДНК Т- и В-клеточных рецепторов (TREC и KREC) посредством мультиплексной ПЦР в режиме реального времени у пациентов с генетически установленным диагнозом «первичный иммунодефицит».

Были исследованы образцы ДНК периферической крови здоровых детей ($n = 98$) в возрасте 0,0 (0–15,0) года, которые составили контрольную группу, и пациентов с генетически подтвержденным первичным иммунодефицитом ($n = 95$) в возрасте 7,2 (0,1–18,0) года.

Согласно полученным результатам, определение количества продуктов реаранжировок Т- и В-клеточных рецепторов (TREC и KREC) обладает высокой диагностической ценностью при тяжелой комбинированной иммунной недостаточности, синдромах хромосомной нестабильности, таких как атаксия-телеангиоэктазия и синдром Ниймегена, а также при заболеваниях, связанных с иммунной дисрегуляцией, агаммоглобулинемией. Определение продуктов TREC и KREC обладает низкой информативностью, а следовательно, не имеет диагностической значимости при таких видах первичных иммунодефицитов, как синдром Вискотта–Олдрича и хроническая гранулематозная болезнь.

Таким образом, определение продуктов реаранжировок рецепторов Т- и В-лимфоцитов (TREC и KREC) обладает высокой диагностической ценностью и может быть применимо в диагностике врожденных ошибок иммунитета, связанных с Т- и В-клеточной лимфопенией.

Ключевые слова: TREC, KREC, первичные иммунодефициты, полимеразная цепная реакция в режиме реального времени, ROC-анализ, диагностическая значимость

Для цитирования: Диагностическая значимость определения продуктов реаранжировок Т- и В-клеточных рецепторов TREC и KREC у пациентов с врожденными ошибками иммунитета / Е. А. Полякова [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук. – 2023. – Т. 20, № 3. – С. 226–235. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-3-226-235>

**Ekaterina A. Polyakova¹, Maria V. Stegantseva¹, Irina E. Guryanova¹, Dmitry V. Lutskovich¹,
Katsiaryna Y. Skapavets¹, Aliaksandr V. Liubushkin¹, Tatiana P. Volodashchik¹, Victoria I. Kazak¹,
Yulia V. Skibo², Mikhail V. Belevtsev¹**

¹Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology,
v. Borovliany, Minsk region, Republic of Belarus

²Kazan Federal University, Kazan, Russian Federation

DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE OF DETERMINING TREC AND KREC T- AND B-CELL RECEPTOR REARRANGEMENT PRODUCTS IN PATIENTS WITH INBORN IMMUNE ERRORS

Abstract. Inborn immunity errors such as primary immunodeficiencies in children represent a significant problem for public health, and it is undeniably important to improve the laboratory diagnosis of this pathology by creating new, effective methods for early detection of disorders involving immune mechanisms.

The ROC analysis was used to evaluate the diagnostic significance of determining the copy number of T- and B-cell receptor DNA circle fragments (TREC/KREC) by multiplex real-time PCR in patients with a genetically determined diagnosis of primary immunodeficiency.

Peripheral blood DNA samples of healthy children ($n = 98$) aged 0.0 (0–15.0) years, who constituted the control group, and of patients with genetically confirmed primary immunodeficiency ($n = 95$) aged 7.2 (0.1–18.0) years were examined.

It has been established that determining the number of T and B cell receptor rearrangement products (TREC and KREC) has a high diagnostic significance in severe combined immunodeficiency, chromosomal instability syndromes such as ataxia-telangiectasia and Niimegen syndrome, diseases associated with immune dysregulation, agammaglobulinemia. Determining TREC and KREC is not informative in immunodeficiencies with non-lymphoid cell dysfunction or disorders that do not affect T- and B-cell receptor gene rearrangement such as the Wiskott–Aldrich syndrome and the chronic granulomatous disease.

Determining TREC, KREC has a high diagnostic significance and can be applied in diagnosis of congenital immunity errors associated with T- and B-cell lymphopenia.

Keywords: TREC, KREC, primary immunodeficiencies, real-time polymerase chain reaction, ROC assay, diagnostic significance

For citation: Polyakova E. A., Stegantseva M. V., Guryanova I. E., Lutskovich D. V., Skapavets K. Y., Liubushkin A. V., Volodashchik T. P., Kazak V. I., Skibo Yu. V., Belevtsev M. V. Diagnostic significance of determining TREC and KREC T- and B-cell receptor rearrangement products in patients with inborn immune errors. *Vesti Natsyyanal'noi akademii nauk Belarusi. Seryya medytsynskikh nauk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2023, vol. 20, no. 3, pp. 226–235 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-3-226-235>

Введение. Количественное определение внехромосомных кольцевых фрагментов ДНК Т-клеточного рецептора (TREC) (англ. *T-cell receptor excision circles*) и В-клеточного рецептора (KREC) (англ. *kappa-deleting recombination excision circles*) может быть применимо для мониторинга недавних тимических эмигрантов и неогенеза лимфоцитов костного мозга и сопровождаться высокой информативностью получаемых результатов [1]. TREC и KREC являются побочными продуктами эписомальной кольцевой ДНК, которые образуются при прохождении рецепторами наивных Т- и В-лимфоцитов процесса V(D)J рекомбинации, который контролируется генами антигенных рецепторов с активными или неактивными ядерными компартментами и изменениями в архитектуре хроматина. V(D)J рекомбинация происходит только в лимфоцитах, где она регулируется в контексте клональной специфичности [2, 3]. В этом контексте нарушается процесс образования TREC и KREC и, соответственно, отмечается их низкое содержание либо полное отсутствие [3].

Подбор праймеров и зондов, специфичных к эксцизионным фрагментам рецепторов Т- и В-лимфоцитов, а также создание калибраторов позволяют разработать количественный метод посредством ПЦР в режиме реального времени для определения значений TREC и KREC в периферической крови [4–6]. Исследование уровней TREC/KREC особенно значимо при врожденных ошибках иммунитета – первичных иммунодефицитах (ПИД), мониторинге иммунного восстановления при приобретенных иммунодефицитах, обусловленных трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток, лучевой терапией, а также при скрининге новорожденных [7–11].

Дефекты V(D)J рекомбинации лежат в основе ПИД [12].

Согласно литературным данным, результаты проведенных исследований по выявлению ПИД с использованием определения TREC/KREC показали, что TREC коррелирует с Т-клеточной лимфопенией у детей с тяжелой комбинированной иммунной недостаточностью (ТКИН) [12], а KREC – с уровнем В-лимфоцитов у пациентов с Х-сцепленной агаммаглобулинемией [13, 14]. Некоторые формы ПИД, такие как комбинированные иммунодефициты, характеризующиеся лимфопенией Т- и В-лимфоцитов, также могут быть диагностированы с помощью метода количественного определения копий TREC и KREC [14].

Цель исследования – оценить диагностическую значимость определения количества копий кольцевых фрагментов ДНК Т- и В-клеточных рецепторов (TREC и KREC) с использованием мультиплексной ПЦР в режиме реального времени у пациентов с генетически установленным диагнозом первичного иммунодефицита.

Материалы и методы исследования. Объектом исследования послужили образцы периферической крови 98 здоровых детей в возрасте 0,0 (0–15,0) года, которые составили контрольную группу, и 95 пациентов с ПИД в возрасте 7,2 (0,1–18,0) года (из них с ТКИН – 12 детей, с атаксией-телеангиоэктазией – 14, с синдромом Ниймегена – 17, с Х-сцепленной агаммаглобулинемией – 15, с заболеваниями иммунной дисрегуляции – 15, с синдромом Вискотта–Олдрича (СВО) – 10, с Х-сцепленной хронической гранулематозной болезнью (ХГБ) – 12 пациентов).

Для ПЦР были использованы праймеры и флуоресцентные метки: прямой праймер ALB (5'-tgaacaggcgaccatgctt-3'), обратный праймер 5'-ctctcctctcagaagaagtgtgcatat-3', флуоресцентная метка 5'-FAM-tgctgaaacattcaccttccatgcaga-BHQ1-3'; для TREC – прямой праймер 5'-ccatgctgacacctctggtt-3', обратный праймер cttcattcacctgtctcacga, флуоресцентная метка HEX-cacggtgatgcataggcacctgc-BHQ1-3'; для KREC – прямой праймер 5'-tcagcgccattacgtttct-3', обратный праймер 5'-gtgagggacacgcagcc-3', флуоресцентная метка 5'-ROX -ccagctctaccctagagtttctgcacgg-BHQ2-3' («Праймтех», Беларусь) [11–13].

Количество TREC и KREC определяли методом ПЦР в режиме реального времени с использованием амплификатора CFX96 (Bio-Rad, США).

В качестве калибраторов использовали серийные разведения плазмидной ДНК, содержащей вставки альбумина (ALB), TREC и KREC, в концентрации 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 копий в 5 мкл.

Количественные значения TREC, KREC на 1 млн лейкоцитов периферической крови определяли по формуле

$$[\text{среднее (SQ) TREC (KREC)/среднее (SQ) ALB/2}] \cdot 1\,000\,000.$$

Реакционная смесь для ПЦР состояла из 12,5 мкл ArtMix («АртБиоТех», Беларусь), 6,25 мкл воды и смеси праймеров в концентрации 6 пмоль для прямого и обратного праймеров и 4 пмоль для флуоресцентной метки. Постановка опытов осуществлялась в двух повторах. Данные анализировали с помощью программы Real time RCR Data Analysis (Bio-Rad, США).

Для статистической обработки данных и построения графиков использовали программное обеспечение GraphPad Prizm 6.0.

Значимость статистических различий определяли с помощью непараметрического *U*-критерия Манна–Уитни (Mann–Whitney *U* test). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Данные представлены в виде медианы (25 %–75 %).

Диагностическую значимость анализировали путем построения характеристических ROC-кривых и определения площади под кривой AUC (AUC – Area Under Curve).

Для интерпретации показателя площади под кривой использовали общепризнанную экспертную шкалу [15]. Значение AUC должно варьироваться в диапазоне от 0,5 до 1,0, для высокой информативности показатель должен быть близок к 1.

Результаты и их обсуждение. С целью определения значимости исследуемых показателей TREC и KREC для прогнозирования наличия иммунологических нарушений проведен анализ содержания данных показателей в периферической крови 95 пациентов с генетически подтвержденным диагнозом ПИД.

Для оценки диагностической значимости применения определения TREC/KREC были исследованы уровни данных показателей в образцах периферической крови 12 пациентов с диагнозом ТКИН с мутациями в генах *RAG1*, *IL2RG*, *IL7R*, *JAK3*, *ADA*. Контрольную группу составили здоровые дети ($n = 63$) той же возрастной категории.

В группе здоровых детей уровень TREC и KREC составил 34 814 (16 744–75 293) и 17 653 (7266,5–65991,5) копии соответственно в сравнении с группой пациентов с ТКИН ((Т-В–) и (Т-В+)), у которых значения TREC были значимо снижены в сравнении с контрольной группой ($p < 0,0001$, $U = 0$).

У пациентов с (Т-В–) и (Т-В+) ТКИН уровни TREC были также снижены в сравнении со здоровыми детьми того же возраста ($Me = 0$) ($p < 0,0001$, $U = 0$). У пациентов с (Т-В+) ТКИН уровни KREC значимо не отличались от показателей здоровых детей – 4834 (2750–9429) ($p = 0,98$, $U = 237$).

Для каждой группы была определена диагностическая значимость определения TREC/KREC (рис. 1).

$AUC_{TREC+KREC}$ для диагностики Т- и В-клеточной лимфопении у пациентов с ТКИН с иммунофенотипом (Т-В–) составила $1,00 \pm 0,0$ ($p < 0,0001$), диагностическая чувствительность и специфичность – 100 % (рис. 1, а). Для диагностики ТКИН у пациентов с (Т-В+) ТКИН AUC_{KREC} составила $0,68 \pm 0,11$ ($p = 0,09$), диагностическая чувствительность – 12,2 %, специфичность – 98,9 % (рис. 1, б).

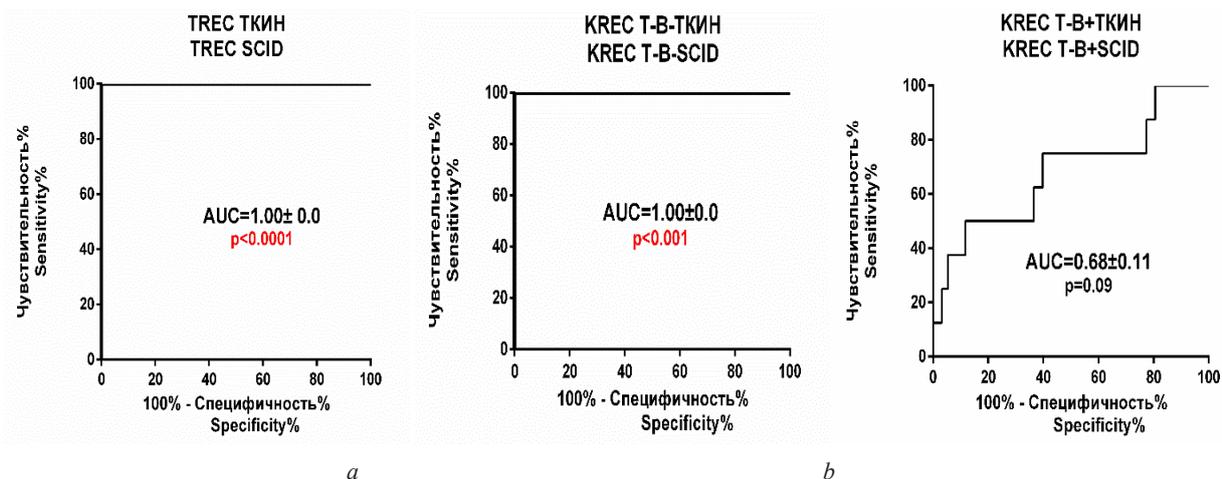


Рис. 1. ROC-кривые показателей TREC (a) и KREC (b) при определении диагностической значимости анализа при ТКИИ
 Fig. 1. ROC curves of TREC (a) and KREC (b) in determining the diagnostic significance of the assay for SCID diagnosis

По данным J. Spek van der с соавт., E. Rechavi с соавт., для диагностики ТКИИ определение TREC в периферической крови имеет наивысшие специфичность и чувствительность в сравнении с данными, полученными при иммунофенотипировании, которые демонстрируют более низкие показатели как специфичности, так и чувствительности [16–18].

Молекулярной основой X-сцепленной агаммаглобулинемии (X-АГЕ) является нарушение развития В-лимфоцитов из-за мутации тирозинкиназы Брутона (*Btk*) на уровне пре-В-клеточного рецептора. Пациенты наследуют дефект, который не позволяет клеткам-предшественникам (В-клеткам) формировать зрелые циркулирующие В-лимфоциты в костном мозге, а следовательно, данные клетки не могут пролиферировать и дифференцироваться в антителопродуцирующие плазматические клетки во вторичных лимфоидных органах. У пациентов с X-АГЕ отмечается отсутствие В-лимфоцитов (CD19+) с нормальным уровнем содержания Т-лимфоцитов (CD3+).

Согласно полученным нами данным, количество TREC и KREC в контрольной группе детей ($n = 64$) составило 66494,5 (44 506–97450,25) и 17387,5 (6543,5–62636,25) копии соответственно.

У пациентов обследованной группы количество копий TREC значимо не отличалось от их значений у здоровых детей – 16 468 (12179,5–37344,25) ($p = 0,16$, $U = 329$), а количество копий KREC было существенно снижено – до 34 (18,5–74,75) ($p < 0,0001$, $U = 0$).

Площадь под кривой AUC_{TREC} при анализе данных информативности у пациентов с X-АГЕ составила $0,62 \pm 0,07$ ($p = 0,16$), диагностическая чувствительность и специфичность – 14

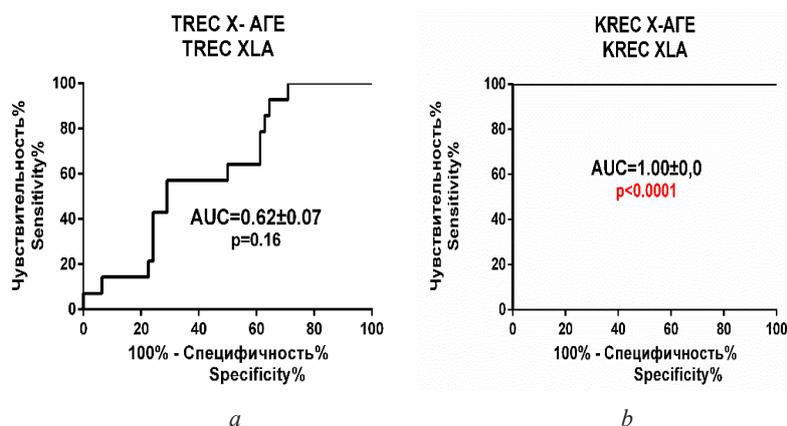


Рис. 2. ROC-кривые показателей TREC (a) и KREC (b) при определении диагностической значимости анализа при агаммаглобулинемии

Fig. 2. ROC curves of TREC (a) and KREC (b) in determining the diagnostic significance of the assay for agammaglobulinemia

и 93,6 % соответственно (рис. 2, *a*), под кривой $AUC_{KREC} = 1,00 \pm 0,0$ ($p < 0,0001$), а диагностическая чувствительность и специфичность – 100 % (рис. 2, *b*). Это свидетельствует о высокой диагностической значимости определения именно уровней KREC в диагностике X-АГЕ.

Атаксия-телеангиэктазия (АТ) и синдром Ниймегена представляют собой две разные, но тесно связанные между собой патологии, обусловленные дефектами репарации ДНК. Заболевания АТ и синдром Ниймегена схожи и включают хромосомную нестабильность, радиочувствительность и дефекты клеточного цикла, обычно вызываемые ионизирующим излучением [19, 20].

У пациентов с синдромами хромосомной нестабильности субпопуляционный состав минорных лимфоцитов может быть как нормальным, так и характеризоваться Т- и В-клеточной лимфопенией, которая прогрессирует с возрастом. В связи с этим заподозрить наличие данной патологии у пациентов только по данным иммунофенотипирования удастся не всегда. Определение TREC и KREC, по данным ряда авторов может представлять собой реальную альтернативу и имеет высокую диагностическую ценность [20, 21].

Нами были исследованы уровни TREC и KREC в группе пациентов с синдромами хромосомной нестабильности – АТ и синдромом Ниймегена с мутациями в генах *ATM* и *NBN*. Группу сравнения составили здоровые дети ($n = 78$) той же возрастной категории.

Медиана значений TREC и KREC в группе здоровых детей составила 31 835 (14574,25–62628,75) и 13 899 (6217,5–40313,75) копий соответственно. Значения копий TREC и KREC в исследуемой группе пациентов были значимо снижены относительно показателей контрольной группы – медиана значений TREC составила 199 (0–1440,5) копий ($p < 0,0001$, $U = 24$), KREC – 76 (0–369,0) копий ($p < 0,0001$, $U = 24$).

AUC_{TREC} для диагностики Т- и В-клеточной лимфопении у пациентов с дефектами репарации ДНК составила $0,99 \pm 0,007$ ($p < 0,0001$), диагностическая чувствительность – 93,4 %, специфичность – 97,4 % (рис. 3, *a*). AUC_{KREC} составила $0,98 \pm 0,015$ ($p < 0,0001$), диагностическая чувствительность – 93,5 %, специфичность – 98,7 % (рис. 3, *b*).

Полученные данные свидетельствуют о высокой диагностической значимости определения TREC/KREC в диагностическом процессе ПИД с синдромами хромосомной нестабильности, такими как АТ и синдром Ниймегена.

При заболеваниях иммунной дисрегуляции имеющиеся лимфоциты могут быть дисфункциональными, что способствует развитию чрезмерной аутореактивности и, как следствие, аутоиммунных заболеваний. Аутоиммунная полиэндокринопатия, кандидоз и эктодермальная дистрофия, аутоиммунный лимфопролиферативный синдром, полиэндокринопатия с нарушением иммунорегуляции – это нарушения, при которых аутоиммунитет является отличительной чертой клинической картины заболевания [22].

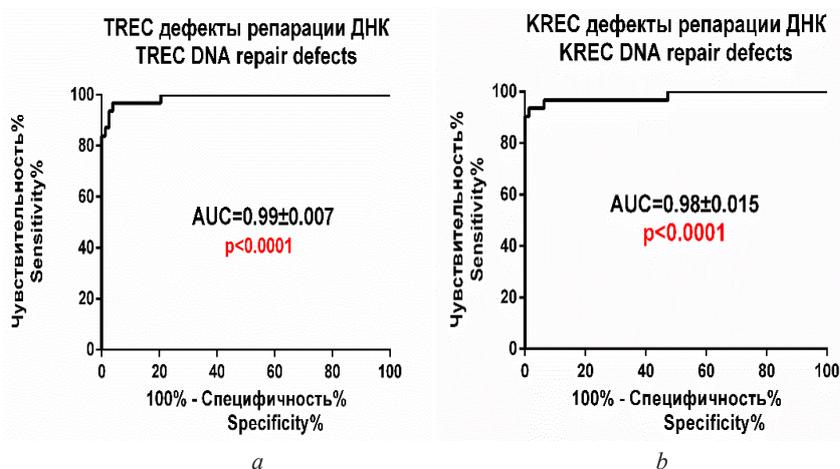


Рис. 3. ROC-кривые показателей TREC (*a*) и KREC (*b*) при определении диагностической значимости анализа при синдромах хромосомной нестабильности

Fig. 3. ROC curves of TREC (*a*) and KREC (*b*) in determining the diagnostic significance of the analysis in diagnosis of chromosome instability syndromes

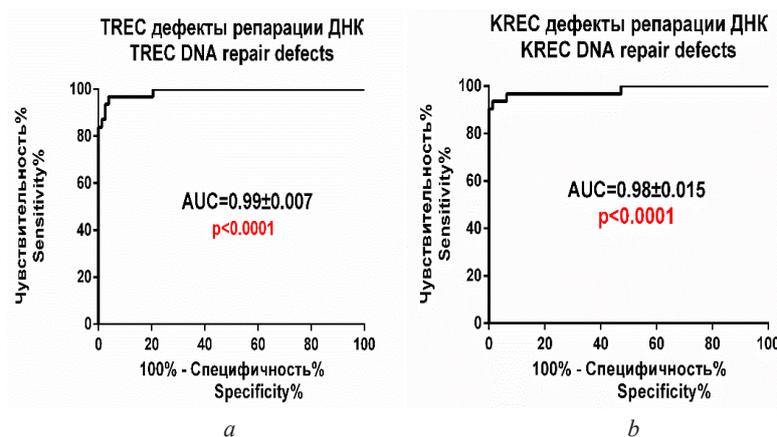


Рис. 4. ROC-кривые показателей TREC (a) и KREC (b) при определении диагностической значимости анализа при синдромах с иммунной дисрегуляцией

Fig. 4. ROC curves of TREC (a) and KREC (b) in determining the diagnostic significance of the analysis in diagnosis of immune dysregulation syndromes

При проведении иммунофенотипирования минорных субпопуляций лимфоцитов не всегда удастся выявить заболевания, связанные с иммунной дисрегуляцией. В диагностике данной патологии требуются как клинические, так и дополнительные лабораторные исследования [23].

По результатам нашего исследования в контрольной группе здоровых детей ($n = 37$) медиана значений TREC составила 16 493 (9154–29 364), KREC – 7231 (5090–11 917) копию.

Уровни TREC и KREC в исследуемой группе пациентов с мутациями в генах *PIK3CD*, *FAS*, *AIRE* были значимо снижены относительно показателей контрольной группы – медиана значений TREC и KREC составила 1678 (515,5–3115,5) ($p < 0,0001$, $U = 4$) и 1668 (299,50–3628,5) ($p < 0,0001$, $U = 72$) копий соответственно.

Площадь под кривой AUC_{TREC} составила $0,99 \pm 0,007$ ($p < 0,0001$), диагностическая чувствительность – 93,3 %, специфичность – 96,3 % (рис. 4, a). AUC_{KREC} составила $0,87 \pm 0,06$ ($p < 0,0001$), диагностическая чувствительность – 86,6 %, специфичность – 94,6 % (рис. 4, b).

Полученные данные свидетельствуют о высокой информативности применения анализа на определение уровней TREC/KREC в первичной диагностике заболеваний, связанных с иммунной дисрегуляцией.

При СВО наблюдается значительное нарушение функции как В-, так и Т-лимфоцитов. Данное заболевание обусловлено генетической поломкой в гене *WAS*, кодирующем белок, который играет основную роль в реорганизации актинового цитоскелета лимфоцитов, передаче сигналов и апоптозе, но не влияет на количество лимфоцитов [24].

Нами не выявлено значимых отличий между значениями TREC и KREC у пациентов с СВО с мутациями в гене *WAS* в сравнении с таковыми в контрольной группе, в которую были включены 98 здоровых детей. Так, значения TREC и KREC в группе контроля составили 40538,5 (17785,75–75 620) и 20 010 (7265,25–77567,25) соответственно, а в исследуемой группе пациентов – 11 459 (5377–41 502) ($p = 0,18$, $U = 356$) и 7443 (4255–16415,75) копии ($p = 0,22$, $U = 375$).

AUC_{TREC} для диагностики СВО составила $0,63 \pm 0,1$ ($p = 0,16$), чувствительность и специфичность – 30 и 78,1 % соответственно (рис. 4; 5, a). AUC_{KREC} составила $0,61 \pm 0,09$ ($p = 0,23$), чувствительность – 20,0 %, специфичность – 92,35 % (рис. 5, b).

С помощью ROC-анализа установлено, что значения диагностической чувствительности и специфичности были статистически не значимы. Это свидетельствует о невысокой ценности определения TREC/KREC у пациентов с СВО.

ХГБ представляет собой ПИД, вызванный дефектами в генах, кодирующих любой из компонентов НАДФН-оксидазы, ответственных за респираторный взрыв фагоцитарных лейкоцитов [25]. При данной патологии нарушение затрагивает клетки миелоидного ряда и не нарушает реаранжировку генов рецепторов лимфоцитов. Соответственно, количество копий TREC и KREC у таких пациентов в диапазоне нормы.

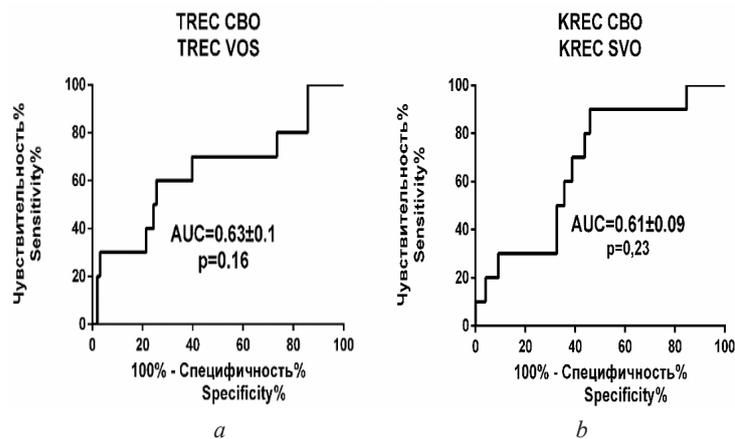


Рис. 5. ROC-кривые показателей TREC (а) и KREC (б) при определении диагностической значимости анализа при синдроме Вискотта–Олдрича

Fig. 5. ROC curves of TREC (A) and KREC (B) in determining the diagnostic significance of the analysis in diagnosis of the Wiskott–Aldrich syndrome

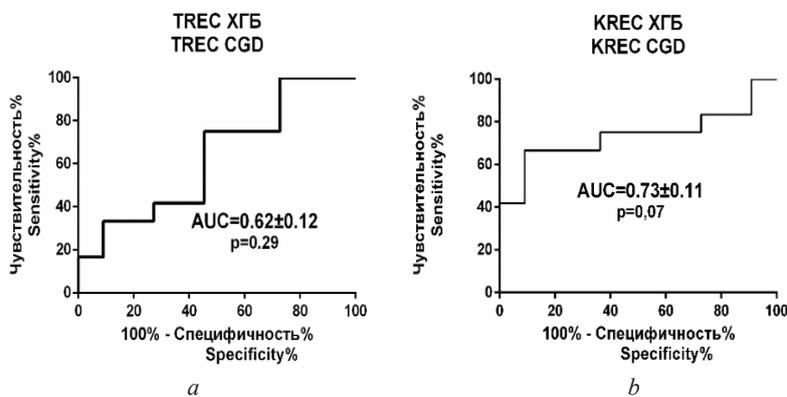


Рис. 6. ROC-кривые показателей TREC (а) и KREC (б) при определении диагностической значимости анализа при хронической гранулематозной болезни

Fig. 6. ROC curves of TREC (a) and KREC (b) in determining the diagnostic significance of the analysis in diagnosis of the chronic granulomatous disease

В исследованной контрольной группе здоровых детей ($n = 11$) уровни TREC и KREC составили 26 369 (14 859,5–30 416) и 7977 (5346,5–12595,5) копий.

Значимых различий между значениями TREC и KREC у пациентов с ХГБ с мутациями в гене *CYBB* в сравнении с здоровыми детьми не установлено. Количество TREC составило 26 369 (14 859,5–30 416) ($p = 0,3$, $U = 49$), а количество KREC – 18 012 (8814,5– 31 693) ($p = 0,1$, $U = 35$).

AUC_{TREC} составила $0,62 \pm 0,012$ ($p = 0,29$), диагностическая чувствительность – 33,4 % и специфичность – 90,1 % (рис. 6, а). AUC_{KREC} составила $0,73 \pm 0,11$ ($p = 0,06$), диагностическая чувствительность – 66,0 %, специфичность – 90,2 % (рис. 6, б).

С помощью ROC-анализа продемонстрировано, что определение TREC/KREC имеет низкую чувствительность и высокую специфичность, однако показатели диагностической чувствительности и специфичности статистически не значимы, что свидетельствует о низкой информативности определения TREC/KREC у пациентов с ХГБ.

Заключение. Представленные результаты оценки диагностической значимости ROC-анализа в выявлении врожденных ошибок иммунитета показали, что определение значений TREC и KREC имеет высокую диагностическую ценность, высокую чувствительность и специфичность в выявлении таких первичных иммунодефицитов, как тяжелая комбинированная иммунная недостаточность, синдромы хромосомной нестабильности, агаммаглобулинемия и заболевания, связанные с иммунной дисрегуляцией.

Определение уровней TREC и KREC обладает низкой информативностью и, соответственно, не имеет диагностической значимости при таких видах первичных иммунодефицитов, как синдром Вискотта–Олдрича и хроническая гранулематозная болезнь.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Puck, J. M. Laboratory technology for population-based screening for SCID in neonates: The winner Is T-cell Receptor Excision Circles (TRECs) // *J. Allergy Clin. Immunol.* – Vol. 129, N 3. – P. 607–616. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.01.032>
2. Quantifying thymic export: combining models of naive T cell proliferation and TCR excision circle dynamics gives an explicit measure of thymic output / I. Bains [et al.] // *J. Immunol.* – 2009. – Vol. 183, N 7. – P. 4329–4336. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900743>
3. Replication history of B lymphocytes reveals homeostatic proliferation and extensive antigen-induced B cell expansion / M. C. van Zelm [et al.] // *J. Exp. Med.* – 2007. – Vol. 204, N 3. – P. 645–655. <https://doi.org/10.1084/jem.20060964>
4. Detection of newly produced T and B lymphocytes by digital PCR in blood stored dry on nylon flocked swabs / M. V. Tessitore [et al.] // *J. Transl. Med.* – 2017. – Vol. 15, N 1. <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1169-9>
5. Development of a multiplex real-time PCR assay for the newborn screening of SCID, SMA, and XLA / C. Gutierrez-Mateo [et al.] // *Int. J. Neonatal Screen.* – 2019. – Vol. 5, N 4. <https://doi.org/10.3390/ijns5040039>
6. Определение эксцизионных колец ДНК T- и B-клеточного рецептора методом мультиплексной ПЦР в реальном времени : инструкция по применению / Е. А. Полякова [и др.]. – Минск, 2020. – 24 с.
7. van Zelm, M. C. Editorial: primary immunodeficiencies worldwide / M. C. van Zelm, A. Condino-Neto, M. R. Barboche // *Front. Immunol.* – 2020. – Vol. 10. – Art. 3148. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03148>
8. Use of V(D)J recombination excision circles to identify T- and B-cell defects and to monitor the treatment in primary and acquired immunodeficiencies / F. Serana [et al.] // *J. Transl. Med.* – 2013. – Vol. 11, N 119. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-119>
9. Newborn screening for severe combined immunodeficiency in 11 screening programs in the United States / A. Kwan [et al.] // *JAMA.* – 2014. – Vol. 312, N 7. – P. 729–738. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.9132>
10. King, J. Newborn screening for primary immunodeficiency diseases: the past, the present and the future / J. King, J. F. Ludvigsson, L. Hammarström // *Int. J. Neonatal Screen.* – 2017. – Vol. 3, N 3. – Art. 19. <https://doi.org/10.3390/ijns3030019>
11. Neonatal screening in Europe revisited: an ISNS perspective on the current state and developments since 2010 / J. G. Loeber [et al.] // *Int. J. Neonatal Screen.* – 2021. – Vol. 7, N 1. – Art. 15. <https://doi.org/10.3390/ijns7010015>
12. Puck, J. M. Newborn screening for severe combined immunodeficiency and T-cell lymphopenia / J. M. Puck // *Immunol. Rev.* – 2019. – Vol. 287, N 1. – P. 241–252. <https://doi.org/10.1111/imr.12729>
13. Kappa-deleting recombination excision circle levels remain low or undetectable throughout life in patients with X-linked agammaglobulinemia / J. King [et al.] // *Pediatr. Allergy Immunol.* – 2018. – Vol. 29, N 4. – P. 453–456. <https://doi.org/10.1111/pai.12893>
14. Disturbed B and T cell homeostasis and neogenesis in patients with ataxia telangiectasia / M. Kraus [et al.] // *J. Clin. Immunol.* – 2014. – Vol. 34, N 5. – P. 561–572. <https://doi.org/10.1007/s10875-014-0044-1>
15. Metz, C. E. Fundamental ROC Analysis / C. E. Metz // *Handbook of Medical Imaging* / eds. : J. Beutel, H. Kundel, R. Van Metter. – Bellingham, 2000. – Vol. 1 : Physics and Psychophysics. – P. 751–769.
16. TREC based newborn screening for severe combined immunodeficiency disease: A systematic review / Spek J. van der [et al.] // *J. Clin. Immunol.* – 2015. – Vol. 4, N 35. – P. 416–430. <https://doi.org/10.1007/s10875-015-0152-6>
17. First year of Israeli Newborn Screening for severe combined immunodeficiency-clinical achievements and insights / E. Rechavi [et al.] // *Front. Immunol.* – 2017, N 8. – Art. 1448. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01448>
18. TREC and KREC levels as a predictors of lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry / I. A. Korsunskiy [et al.] // *Front. Physiol.* – 2019, N 9. – Art. 1877. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01877>
19. Disturbed B and T cell homeostasis and neogenesis in patients with ataxia telangiectasia / M. Kraus [et al.] // *J. Clin. Immunol.* – 2014. – Vol. 34, N 5. – P. 561–572. <https://doi.org/10.1007/s10875-014-0044-1>
20. Nijmegen breakage syndrome detected by newborn screening for T cell receptor excision circles (TRECs) / J. P. Patel [et al.] // *J. Clin. Immunol.* – 2015. – Vol. 35, N 2. – P. 227–233.
21. Ataxia telangiectasia diagnosed on newborn screening-case cohort of 5 years' experience / A. B. Mandola [et al.] // *Front. Immunol.* – 2020. – Vol. 10. – Art. 2940. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02940>
22. Autoimmune and inflammatory manifestations occur frequently in patients with primary immunodeficiencies / A. Fischer [et al.] // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2017. – Vol. 140, N 5. – P. 1388–1393.e8. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.12.978>
23. Human Inborn Errors of Immunity: 2019 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee / S. G. Tangye [et al.] // *J. Clin. Immunol.* – 2020. – Vol. 40, N 1. – P. 24–64. <https://doi.org/10.1007/s10875-019-00737-x>
24. B cell-intrinsic deficiency of the Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) causes severe abnormalities of the peripheral B-cell compartment in mice / M. Recher [et al.] // *Blood.* – 2012. – Vol. 119, N 12. – P. 2819–2828. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-09-379412>
25. Enhanced inflammatory responses of chronic granulomatous disease leukocytes involve ROS independent activation of NFkappaB / J. Bylund [et al.] // *Eur. J. Immunol.* – 2007. – Vol. 37, N 4. – P. 1087–1096. <https://doi.org/10.1002/eji.200636651>

References

1. Puck J. M. Laboratory technology for population-based screening for SCID in neonates: The winner is T-cell Receptor Excision Circles (TRECs). *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 129, no. 3, pp. 607–616. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.01.032>
2. Bains I., Thiébaud R., Yates A. J., Callard R. Quantifying thymic export: combining models of naive T cell proliferation and TCR excision circle dynamics gives an explicit measure of thymic output. *Journal of Immunology*, 2009, vol. 183, no. 7, pp. 4329–4336. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900743>
3. van Zelm, M. C., Szczepański T., van der Burg M., van Dongen J. J. M. Replication history of B lymphocytes reveals homeostatic proliferation and extensive antigen-induced B cell expansion. *Journal of Experimental Medicine*, 2007, vol. 204, no. 3, pp. 645–655. <https://doi.org/10.1084/jem.20060964>
4. Tessitore M. V., Sottini A., Roccaro A. M., Ghidini C., Bernardi S., Martellosio G., Serana F., Imberti L. Detection of newly produced T and B lymphocytes by digital PCR in blood stored dry on nylon flocked swabs. *Journal of Translational Medicine*, 2017, vol. 15, no. 1. <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1169-9>
5. Gutierrez-Mateo C., Timonen A., Vaahtera K., Jaakkola M., Hougaard D. M., Bybjerg-Grauholm J. [et al.] Development of a multiplex real-time PCR assay for the newborn screening of SCID, SMA, and XLA. *International Journal of Neonatal Screening*, 2019, vol. 5, no. 4. <https://doi.org/10.3390/ijns5040039>
6. Polyakova E. A., Stegantseva M. V., Aleshkevich S. N., Zharankova Yu. S., Minakovskaya N. V., Ostroushko D. V., Beresten' S. A., Belevtsev M. V. *Determination of excision circles of T- and B-cell receptor DNA by multiplex real-time PCR: instructions for use*. Minsk, 2020. 24 p. (in Russian).
7. van Zelm M. C., Condino-Neto A., Barboche M. R. Editorial: primary immunodeficiencies worldwide. *Frontiers in Immunology*, 2020, vol. 10, art. 3148. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03148>
8. Serana F., Chiarini M., Zanotti C., Sottini A., Bertoli D., Bosio A., Caimi L., Imberti L. Use of V(D)J recombination excision circles to identify T- and B-cell defects and to monitor the treatment in primary and acquired immunodeficiencies. *Journal of Translational Medicine*, 2013, vol. 11, no. 119. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-119>
9. Kwan A., Abraham R. S., Currier R., Brower A., Andruszewski K., Abbott J. K., Baker M. Newborn screening for severe combined immunodeficiency in 11 screening programs in the United States. *JAMA*, 2014, vol. 312, no. 7, pp. 729–738. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.9132>
10. King J., Ludvigsson J. F., Hammarström L. Newborn screening for primary immunodeficiency diseases: the past, the present and the future. *International Journal of Neonatal Screening*, 2017, vol. 3, no. 3, art. 19. <https://doi.org/10.3390/ijns3030019>
11. Loeber J. G., Platis D., Zetterström R. H., Almashanu Sh., Boemer F., Bonham J. R. [et al.] Neonatal screening in Europe revisited: an ISNS perspective on the current state and developments since 2010. *International Journal of Neonatal Screening*, 2021, vol. 7, no. 1, art. 15. <https://doi.org/10.3390/ijns7010015>
12. Puck J. M. Newborn screening for severe combined immunodeficiency and T-cell lymphopenia. *Immunological Reviews*, 2019, vol. 287, no. 1, pp. 241–252. <https://doi.org/10.1111/imr.12729>
13. King J., Borte S., Brodzski N., von Döbeln U., Edvard Smith C. I., Hammarström L. Kappa-deleting recombination excision circle levels remain low or undetectable throughout life in patients with X-linked agammaglobulinemia. *Pediatric Allergy and Immunology*, 2018, vol. 29, no. 4, pp. 453–456. <https://doi.org/10.1111/pai.12893>
14. Kraus M., Lev A., Simon A. J., Levran I., Nissenkorn A., Levi Y. B. [et al.] Disturbed B and T cell homeostasis and neogenesis in patients with ataxia telangiectasia. *Journal of Clinical Immunology*, 2014, vol. 34, no. 5, pp. 561–572. <https://doi.org/10.1007/s10875-014-0044-1>
15. Metz C. E. Fundamental ROC Analysis. *Handbook of Medical Imaging. Vol. 1. Physics and Psychophysics*. Bellingham, 2000, pp. 751–769.
16. van der Spek J., Groenwold R. H. H., van der Burg M., van Montfrans J. M. TREC based newborn screening for severe combined immunodeficiency disease: A systematic review. *Journal of Clinical Immunology*, 2015, no. 4, no. 35, pp. 416–430. <https://doi.org/10.1007/s10875-015-0152-6>
17. Rechavi E., Lev A., Simon A. J., Stauber T., Daas S., Saraf-Levy T. [et al.] First year of Israeli Newborn Screening for severe combined immunodeficiency – Clinical achievements and insights. *Frontiers in Immunology*, 2017, no. 8, art. 1448. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01448>
18. Korsunskiy I. A., Blyuss O., Gordukova M., Davydova N., Gordleeva S., Molchanov R. [et al.] TREC and KREC levels as a predictors of lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry. *Frontiers in Physiology*, 2019, no. 9, art. 1877. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01877>
19. Kraus M., Lev A., Simon A. J., Levran I., Nissenkorn A., Levi Y. B. [et al.] Disturbed B and T cell homeostasis and neogenesis in patients with ataxia telangiectasia. *Journal of Clinical Immunology*, 2014, vol. 34, no. 5, pp. 561–572. <https://doi.org/10.1007/s10875-014-0044-1>
20. Patel J. P., Puck J. M., Srinivasan R., Brown C., Sunderam U., Kundu K., Brenner S. E., Gatti R. A., Church J. A. Nijmegen breakage syndrome detected by newborn screening for T cell receptor excision circles (TRECs). *Journal of Clinical Immunology*, 2015, vol. 35, no. 2, pp. 227–233. <https://doi.org/10.1007/s10875-015-0136-6>
21. Mandola A. B., Reid B., Sirror R., Brager R., Dent P., Chakroborty P., Bulman D. E., Roifman C. M. Ataxia telangiectasia diagnosed on newborn screening-case cohort of 5 years' experience. *Frontiers in Immunology*, 2020, vol. 10, art. 2940. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02940>
22. Fischer A., Provot J., Jais J.-P., Alcais A., Mahlaoui N. Autoimmune and inflammatory manifestations occur frequently in patients with primary immunodeficiencies. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2007, vol. 140, no. 5, pp. 1388–1393.e8. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.12.978>
23. Tangye S. G., Al-Herz W., Bousfiha A., Chatila T., Cunningham-Rundles Ch., Etzioni A. [et al.] Human Inborn Errors of Immunity: 2019 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee. *Journal of Clinical Immunology*, 2020, vol. 40, no. 1, pp. 24–64. <https://doi.org/10.1007/s10875-019-00737-x>

24. Recher M., Burns S. O., de la Fuente M. A., Volpi S., Dahlberg C., Walter J. E. [et al.] B cell-intrinsic deficiency of the Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) causes severe abnormalities of the peripheral B-cell compartment in mice. *Blood*, 2012, vol. 119, no. 12, pp. 2819–2828. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-09-379412>

25. Bylund J., MacDonald K. L., Brown K. L., Mydel P., Collins L. V., Hancock R. E. W., Speert D. P. Enhanced inflammatory responses of chronic granulomatous disease leukocytes involve ROS independent activation of NFκB. *European Journal of Immunology*, 2007, vol. 37, no. 4, pp. 1087–1096. <https://doi.org/10.1002/eji.200636651>

Информация об авторах

Полякова Екатерина Александровна – науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии (ул. Фрунзенская, 43, 223053, д. Боровляны, Минский р-н, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0002-0706-6622>. E-mail: polyakovakat86@gmail.com

Стёганцева Мария Владимировна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии (ул. Фрунзенская, 43, 223053, д. Боровляны, Минский р-н, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0002-8692-3767>. E-mail: Stsegantsevam@gmail.com

Гурьянова Ирина Евгеньевна – канд. биол. наук, заведующий лабораторией. Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии (ул. Фрунзенская, 43, 223053, д. Боровляны, Минский р-н, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0002-9696-3949>. E-mail: guryanovairina1985@gmail.com

Луцкович Дмитрий Викторович – науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии (ул. Фрунзенская, 43, 223053, д. Боровляны, Минский р-н, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0002-3998-8023>. E-mail: lutskovichdm@gmail.com

Скоповец Екатерина Ярославовна – мл. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии (ул. Фрунзенская, 43, 223053, д. Боровляны, Минский р-н, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0002-4510-6760>. E-mail: Skopovets@yandex.ru

Любушкин Александр Владимирович – мл. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии (ул. Фрунзенская, 43, 223053, д. Боровляны, Минский р-н, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0002-6127-7404>. E-mail: sasha36601@yandex.by

Володащук Татьяна Петровна – мл. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии (ул. Фрунзенская, 43, 223053, д. Боровляны, Минский р-н, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0003-1523-0725>. E-mail: tvolodashchik@gmail.com

Казак Виктория Игоревна – мл. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии (ул. Фрунзенская, 43, 223053, д. Боровляны, Минский р-н, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0003-2153-3204>. E-mail: vk250998@gmail.com

Скибо Юлия Валерьевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет (ул. Кремлевская, 18, г. Казань, Республика Татарстан, Российская Федерация). <https://orcid.org/0000-0001-8082-2511>. E-mail: yuliya_ksu@mail.ru

Белевцев Михаил Владимирович – канд. биол. наук, доцент, заместитель директора. Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии (ул. Фрунзенская, 43, 223053, д. Боровляны, Минский р-н, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0001-9533-4705>. E-mail: belevtcev_m@mail.ru

Information about the authors

Ekaterina A. Polyakova – Researcher. Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (43, Frunzenskaya Str., 223053, Borovliany, Minsk region, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0002-0706-6622>. E-mail: polyakovakat86@gmail.com

Maria V. Stegantseva – Ph. D. (Biol.). Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (43, Frunzenskaya Str., 223053, Borovliany, Minsk region, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0002-8692-3767>. E-mail: Stsegantsevam@gmail.com

Irina E. Guryanova – Ph. D. (Biol.), Head of the Laboratory. Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (43, Frunzenskaya Str., 223053, Borovliany, Minsk region, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0002-9696-3949>. E-mail: guryanovairina1985@gmail.com

Dmitry V. Lutskovich – Researcher. Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (43, Frunzenskaya Str., 223053, Borovliany, Minsk region, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0002-3998-8023>. E-mail: lutskovichdm@gmail.com

Katsiaryna Y. Skapavets – Junior Researcher. Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (43, Frunzenskaya Str., 223053, Borovliany, Minsk region, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0002-4510-6760>. E-mail: Skopovets@yandex.ru

Aliaksandr V. Liubushkin – Junior Researcher. Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (43, Frunzenskaya Str., 223053, Borovliany, Minsk region, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0002-6127-7404>. E-mail: sasha36601@yandex.by

Tatiana P. Volodashchik – Junior Researcher. Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (43, Frunzenskaya Str., 223053, Borovliany, Minsk region, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0003-1523-0725>. E-mail: tvolodashchik@gmail.com

Victoria I. Kazak – Junior Researcher. Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (43, Frunzenskaya Str., 223053, Borovliany, Minsk region, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0003-2153-3204>. E-mail: vk250998@gmail.com

Yulia V. Skibo – Ph. D. (Biol.), Senior Researcher. Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Privolzhsky) Federal University (18, Kremlevskaya Str., Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation). <https://orcid.org/0000-0001-8082-2511>. E-mail: yuliya_ksu@mail.ru

Mikhail V. Belevtsev – Ph. D. (Biol.), Associate Professor, Deputy Director. Republican Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (43, Frunzenskaya Str., 223053, Borovliany, Minsk region, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0001-9533-4705>. E-mail: belevtcev_m@mail.ru