

С.С. Дерябина^{1, 2, 3}, И.А. Тузанкина^{2, 3, 4}, Е.В. Власова⁴, М.А. Болков^{2, 3}, В.Н. Шершнёв^{3, 5}¹ Клинико-диагностический центр «Охрана здоровья матери и ребенка», Екатеринбург, Российская Федерация² Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Российская Федерация³ Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, Российская Федерация⁴ Областная детская клиническая больница № 1, Екатеринбург, Российская Федерация⁵ Институт промышленной экологии Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Российская Федерация

Неонатальный скрининг на тяжелую комбинированную иммунную недостаточность в России: прекрасное далёко или завтрашняя реальность?

Контактная информация:

Дерябина Светлана Степановна, заведующая лабораторией молекулярной диагностики КДЦ «Охрана здоровья матери и ребенка», младший научный сотрудник Института иммунологии и физиологии УрО РАН, младший научный сотрудник Уральского федерального университета имени первого Президента России Б.Н. Ельцина

Адрес: 620041, Екатеринбург, ул. Флотская, д. 52, тел.: +7 (343) 374-31-10, e-mail: ssderiabina@gmail.com

Статья поступила: 18.02.2017 г., принята к печати: 27.02.2017 г.

Массовое обследование новорожденных в России на пять наследственных заболеваний не отвечает требованиям, предъявляемым мировым сообществом к программе неонатального скрининга. Успехи в развитии лабораторных диагностических технологий, активное внедрение в медицинскую практику достижений генетики и молекулярной биологии дают возможность пересмотра списка нозологий, входящих в национальную программу неонатального скрининга путем замены заболевания либо включения новых нозологий. В статье обсуждается возможность включения в программу скрининга новорожденных в России генетического тестирования на тяжелую комбинированную иммунную недостаточность. Обсуждаются результаты ретроспективного исследования маркеров наивных Т и В лимфоцитов — TREC и KREC — в группе детей с иммунозависимой патологией, развившейся на первом году жизни.

Ключевые слова: тяжелая комбинированная иммунная недостаточность, первичный иммунодефицит, неонатальный скрининг, TREC, KREC.

(Для цитирования: Дерябина С. С., Тузанкина И. А., Власова Е. В., Болков М. А., Шершнёв В. Н. Неонатальный скрининг на тяжелую комбинированную иммунную недостаточность в России: прекрасное далёко или завтрашняя реальность? Вопросы современной педиатрии. 2017; 16 (1): 59–66. doi: 10.15690/vsp.v16i1.1696)

АКТУАЛЬНОСТЬ

Несмотря на значительный прогресс в области диагностики и лечения первичных иммунодефицитов, наблюдаемый в последнее время во многих странах мира, большая часть российских больных с тяжелыми формами иммунной недостаточности умирают недиагностированными [1–3]. Как и для всех редких заболеваний, основной проблемой первичных иммунодефицитов в Российской Федерации является гиподиагностика, обусловленная как отсутствием настороженности специалистов первичного звена, особенно педиатров, так и малодоступностью современных методов молекулярно-генетического анализа в повседневной клинической практике.

Особенностью клинических проявлений первичной иммунной недостаточности является то, что они неспецифичны для конкретных нозологических форм: это могут быть симптомы банальных инфекций бронхолегочной системы, ЛОР-органов или кожи. Настораживающим фактором в этом случае служит необычно тяжелое или атипичное течение заболевания, а также отсутствие ответа на стандартные терапевтические воздействия [3]. Первичные иммунодефициты могут иметь маски

гастроинтестинальных симптомов, аутоиммунных проявлений, злокачественных новообразований [4].

Наиболее опасной среди первичных иммунодефицитов признана группа тяжелых комбинированных иммунодефицитов (или тяжелой комбинированной иммунной недостаточности, ТКИН). При этой патологии наблюдается выраженная недостаточность клеточно-опосредованного иммунитета. У детей резко снижено количество лимфоцитов в лимфоидной ткани. Тимус имеет вид фетального органа, сохраняя эндодермальные стромальные клетки, но лимфоидные стволовые клетки в нем практически отсутствуют. Таким образом, иммунная система этих пациентов не способна противостоять различным инфекционным агентам, что приводит к раннему развитию рецидивирующих инфекционных заболеваний, в том числе генерализованной БЦЖ-инфекции, и быстрому летальному исходу [5].

Единственным эффективным методом лечения больных с ТКИН является трансплантация клеток костного мозга, в настоящее время — гемопоэтических стволовых клеток. Эффективность этой процедуры напрямую зависит от возраста пациента: общая выживаемость через 5 лет после трансплантации составляет более 94%

у детей с ТКИН, прооперированных в возрасте до 3,5 мес, при условии отсутствия инфекционных процессов на протяжении этого срока. До недавнего времени дети, подвергшиеся пересадке клеток костного мозга в возрасте старше 3,5 мес и пережившие активный инфекционный процесс, имели немногим более 50% общей выживаемости [6].

Более 10 лет назад усилиями Европейского общества иммунодефицитных состояний (European society for immunodeficiencies, ESID) был создан европейский регистр больных первичными иммунодефицитами, который объединил 26 государств и включил в себя более 10 тыс. человек из национальных регистров этих стран [7]. В 2014 г. регистр включал данные уже 19 тыс. пациентов с диагнозом первичного иммунодефицита из 126 зарегистрированных на территории Европы центров первичных иммунодефицитов [8].

В Российской Федерации, по данным региональных регистров, на учете у иммунологов состоит около 1,5 тыс. пациентов с диагнозом «Первичный иммунодефицит», хотя, по мнению специалистов, реальное количество таких больных на порядок выше [3, 9]. По словам заведующей отделением иммунологии ФНКЦ ДГОИ им. Д. Рогачёва доктора медицинских наук, профессора А. Ю. Щербины, «в России ежегодно рождается около 200 детей с первичным иммунодефицитом» [10].

Отсутствие точного диагноза у таких больных означает безвозвратную потерю времени для назначения адекватной патогенетически обоснованной терапии, развитие необратимых повреждений внутренних органов и, как следствие, невозможность вернуть человека на иной, качественно новый уровень жизни [5, 11].

Благодаря возросшему в последнее время вниманию к данной проблеме со стороны Всемирной организации здравоохранения и международных медицинских организаций (ESID, JProject*, JMF**) отмечается постепен-

ное исчезновение «диагностического провала» среди больных первичными иммунодефицитами за счет появления надежных методов диагностики тяжелой комбинированной иммунной недостаточности [12, 13]. Во многих странах мира разрабатываются и внедряются в национальные программы массового обследования новорожденных новые, более эффективные методы скринирования иммунодефицитных состояний. Тем самым подчеркивается значительный потенциал этой превентивной стратегии здравоохранения [12, 13].

К настоящему времени неонатальный скрининг на ТКИН полностью реализован в 41 штате США (данные Jeffrey Modell Foundation по состоянию на сентябрь 2016 г.) и находится в стадии разработки еще в нескольких других штатах. Израиль также выполняет скринирование на ТКИН в рамках государственной программы [14], несколько пилотных проектов осуществляются в странах Европы, Ближнего Востока и Азии [15–17].

Поскольку в России эпидемиологических исследований на ТКИН не проводилось, популяционная частота заболеваний этой группы остается неизвестной. Кроме того, отсутствуют данные по фенотипическим и генотипическим особенностям российских пациентов с первичными иммунодефицитами, что затрудняет создание и планирование эффективной комплексной системы превентивных мероприятий по дифференциальной, пресимптоматической и пренатальной диагностике этих заболеваний.

НЕОНАТАЛЬНЫЙ СКРИНИНГ В РОССИИ И В МИРЕ: ВЧЕРА, СЕГОДНЯ, ЗАВТРА

Массовое обследование новорожденных, или неонатальный скрининг, — самый простой и перспективный метод для раннего обнаружения тяжелой наследственной патологии. Начавшись в США в 60-х годах прошлого столетия с биохимического теста на выявление фенилке-

Svetlana S. Deryabina^{1, 2, 3}, Irina A. Tuzankina^{2, 3, 4}, Elena V. Vlasova⁴, Mikhail A. Bolkov^{2, 3}, Viktor N. Shershnev^{3, 5}

¹ Medical Center «Health Care of Mother and Child», Ekaterinburg, Russian Federation

² Institute of Immunology and Physiology, Ekaterinburg, Russian Federation

³ Ural Federal University n.a. 1st President of Russian Federation B.N. Yeltsin, Ekaterinburg, Russian Federation

⁴ Sverdlovsk Regional Children Clinical Hospital № 1, Ekaterinburg, Russian Federation

⁵ Institute of Industrial Ecology, Ekaterinburg, Russian Federation

Neonatal Screening for Severe Combined Immune Deficiency in Russia: Glorious Future or Tomorrow's Reality?

Mass screening of newborns in Russia for five hereditary diseases does not meet the requirements of the world community for the neonatal screening program. Success in the development of laboratory diagnostic technologies and active introduction of achievements in genetics and molecular biology into medical practice allow for the revision of the list of nosologies included in the national neonatal screening program by replacing the disease or adding new nosologies. The article discusses the possibility of including genetic testing for severe combined immune deficiency in the Newborn Screening Program in Russia. The results from a retrospective study of markers of naive T- and B-lymphocytes (TREC and KREC) in the group of children with immuno-dependent pathology developed in the first year of life are discussed.

Key words: severe combined immune deficiency, primary immunodeficiency, neonatal screening, TREC, KREC.

(For citation: Deryabina Svetlana S., Tuzankina Irina A., Vlasova Elena V., Bolkov Mikhail A., Shershnev Viktor N. Neonatal Screening for Severe Combined Immune Deficiency in Russia: Glorious Future or Tomorrow's Reality? *Voprosy sovremennoi pediatrii — Current Pediatrics*. 2017; 16 (1): 59–66. doi: 10.15690/vsp.v16i1.1696)

* Долгосрочная информационная кампания, инициированная Восточноевропейским центром педиатрической и инфекционной иммунологии (ECE IPI CTR) в сотрудничестве с отделением инфекционной и педиатрической иммунологии Университета в Дебрецене (Венгрия), имеющая своей целью проведение встреч специалистов в области диагностики, лечения и ведения регистра больных с первичными иммунодефицитами.

** Международная некоммерческая организация (Jeffrey Modell Foundation, США) для поддержки фундаментальных и клинических исследований в области первичных иммунодефицитов. Основана V. и F. Modell в память об их умершем сыне.

тонурии [18], эта технология получила широкое распространение в политике национального здравоохранения большинства стран мира. В мае 2000 г. комитет общественной и профессиональной политики Европейского общества генетики человека (European society of human genetics, ESHG) опубликовал разработанную экспертами 15 европейских стран систему правил, стандартов и мер безопасности для организации и проведения генетических скрининговых программ [19]. В числе критериев, необходимых для включения болезни в программу скрининга указано, что она должна иметь четко очерченные клинические и биохимические проявления, представлять собой значимую проблему с высокой вероятностью наступления инвалидизации и смертности в случае позднего выявления, встречаться с частотой не менее 1:10 000–15 000 новорожденных, иметь приемлемую и корректную для пациента и общества процедуру скрининга, а также готовое, апробированное лечение, эффективное на доклиническом этапе [19–21].

На сегодняшний день программы неонатального скрининга внедрены более чем в 50 государствах мира и насчитывают около 50 скринируемых наследственных заболеваний (нозологий) [22].

Необходимо признать, что ни в Европе, ни в США — первой стране мира, внедрившей массовое обследование, в настоящее время не существует достаточно обоснованного подхода к ранжированию скринируемых наследственных болезней. Работы специалистов по изучению программ неонатального скрининга в различных странах показали значительную гетерогенность списка скринируемых нозологий и многообразие самой организационной структуры существующего тестирования [22].

Массовое обследование новорожденных в Российской Федерации началось в середине 80-х годов с исследования на фенилкетонурию. С середины 90-х годов в программу скрининга был включен врожденный гипотиреоз, а с 2006 г. еще 3 дополнительных нозологии — галактоземия, муковисцидоз и адреногенитальный синдром [23]. В 2012 г. в связи с приобретением tandemного масс-спектрометра в Свердловской области был запущен проект расширенного неонатального скрининга, в котором к основным 5 наследственным болезням обмена было добавлено еще 11 [24].

Метод tandemной масс-спектрометрии имеет значительные преимущества по сравнению с предыдущими биохимическими технологиями, так как заметно уменьшает время, необходимое для обработки образцов, и может выявлять широкий спектр патологических состояний, связанных с нарушением метаболических процессов в организме, путем анализа одной капли крови [25]. Однако вопрос целесообразности автоматического включения в программу скрининга наследственных нарушений метаболизма до сих пор обсуждается мировой и российской научной общественностью [25, 26].

В Свердловской области за период 2012–2014 гг. тестирование на генетические заболевания обмена веществ методом tandemной масс-спектрометрии прошли более 150 тыс. новорожденных, выявлено 9 больных по 7 различным нозологиям. Таким образом, суммарная частота выявления патологии по 16 наследственным заболеваниям в популяции Свердловской области составила 1 случай на 1130 детей, рожденных живыми (при среднем общероссийском показателе 1 больной ребенок на 1000) [27].

С 2015 г. массовый скрининг на наследственные болезни обмена в Свердловской области заменен на селективный. Теперь, согласно протоколу проведения

обследования детей на наследственные болезни обмена, тестированию методом tandemной масс-спектрометрии подлежат «дети отделений патологии новорожденных, палат интенсивной терапии и реанимационных отделений, по показаниям — дети инфекционных, гастроэнтерологических, неврологических, педиатрических, эндокринологических отделений» [28].

Непродолжительное время массового обследования, а также финансовые трудности, приводящие к периодическим остановкам реализации программы систематического скринирования новорожденных, не позволили сделать научно обоснованных выводов о частоте распространения отдельных форм наследственных болезней обмена в популяции. Однако полученный опыт проведения расширенного неонатального скрининга способствовал пониманию того, что на современном этапе массовое скринирование новорожденных только по 5 заболеваниям не отвечает требованиям, предъявляемым мировым сообществом к программе неонатального скрининга [22, 25]. Оставаться на достигнутом уровне применения политики скринирования населения на генетическую патологию означает неминуемую остановку в развитии всей системы национального здравоохранения. Сегодняшние успехи в развитии лабораторных диагностических технологий и активное внедрение в медицинскую практику достижений генетики и молекулярной биологии позволяют говорить о возможности расширения спектра скринируемых врожденных и наследственных заболеваний в России.

Наследственные заболевания — кандидаты на включение в национальную программу неонатального скрининга

На сегодняшний день имеется несколько заболеваний, рассматриваемых в качестве кандидатов для включения в российскую программу скрининга новорожденных. Три из них [недостаточность биотинидазы (Biotinidase deficiency, BTD), дефицит средне- и длинноцепочечной ацетил-коэнзим А-дегидрогеназ (Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase, MCAD; Long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, LCHAD)] относятся к наследственным болезням обмена, выявляемым с помощью метода tandemной масс-спектрометрии, четвертый кандидат [тяжелый комбинированный иммунодефицит (Severe combined immunodeficiency, SCID, или ТКИИ)] — из группы первичных иммунодефицитов. Все упомянутые заболевания присутствуют в программах неонатального скрининга ряда стран [12, 22], в некоторых государствах вопрос о необходимости их включения в программу неонатального скрининга находится в стадии рассмотрения [29].

Однако необходимо понимать, что диагностическая процедура — это только первый этап программы неонатального скрининга — полномасштабной системы мероприятий, включающей в себя, помимо диагностики, обязательное генетическое консультирование семьи, дополнительные лабораторные или клинические исследования для подтверждения (исключения) диагноза, обеспечение больного ребенка лекарственными препаратами, постоянное мониторирование его состояния и т. п. [19].

В настоящее время ни одна из трех наследственных болезней обмена, рассматриваемых в качестве кандидатов на включение в список обязательного скринирования, не имеет доказательной базы в виде результатов научных исследований с указанием предполагаемой частоты и четкими пояснениями необходимости проведения тестирования населения на данное заболевание.

Согласно полученным суммарным результатам скрининга (как массового, так и селективного), распростра-

ненность заболеваний с дефектами митохондриального β -окисления (MCAD, LCHAD) является достаточно низкой среди популяции Свердловской области, что совпадает с общероссийскими данными (частота дефицита среднецепочечной ацетил-коА-дегидрогеназы оценивается как 1:58 000, длинноцепочечной ацетил-коА-дегидрогеназы — 1:280 000) [30].

Предполагаемая частота третьего кандидата — недостаточности биотинидазы — составляет 1:35 000–40 000 новорожденных [31, 32], однако в Российской Федерации до сих пор не зарегистрирован биотин — основное лекарственное средство для лечения дефицита биотинидазы. Это ставит под сомнение целесообразность включения данной нозологии в национальную программу неонатального скрининга в ближайшее время [32, 33].

Тестирование на ТКИН — первое исследование в практике неонатального скрининга, основанное на анализе ДНК ребенка, — является самой серьезной и тяжелой формой первичных иммунодефицитов [12, 13]. С целью получения фактов, способствующих теоретическому и практическому обоснованию необходимости внедрения неонатального скрининга на ТКИН и другие формы первичных иммунодефицитов, в Свердловской области была проведена научная работа, результаты которой мы предлагаем рассматривать как основной аргумент для доказательства актуальности проведения подобных исследований в популяционном масштабе.

ПРОФИЛАКТИКА И ЛЕЧЕНИЕ ПЕРВИЧНЫХ ИММУНОДЕФИЦИТОВ: ПЕРВООЧЕРЕДНЫЕ ЗАДАЧИ СОВРЕМЕННОГО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ

Повышенная восприимчивость новорожденных к инфекции зачастую является общей проблемой в неонатологии и по праву считается одной из самых главных уязвимостей ребенка в неонатальный период жизни. Согласно текущей статистике, инвазивные неонатальные инфекции являются причиной почти 36% случаев ежегодной ранней младенческой смертности [34]. Выжившие после сепсиса новорожденные имеют повышенный риск длительного пребывания в стационаре, развития бронхолегочной дисплазии и плохо поддающихся коррекции отклонений в психомоторном развитии [34, 35].

Результаты недавних исследований [36] ясно показывают, что «зерно» различных иммунологически опосредованных заболеваний, впервые проявляющихся в зрелом возрасте, закладывается в раннем послеродовом периоде жизни. Именно на протяжении этого периода иммунная система новорожденного подвергается тонкой самонастройке с помощью различных функциональных «клавиш» и в условиях прямой стимуляции факторами окружающей среды [36, 37].

Ежегодно в Свердловской области в консультации специалиста-иммунолога нуждаются около 15 тыс. детей с патологическими нарушениями функционирования иммунной системы, нередко находящиеся уже в состоянии крайней тяжести по причине манифестации инфекционных, воспалительных, аутоиммунных и пролиферативных проявлений иммунозависимой патологии (данные не опубликованы).

Особого внимания заслуживают дети, родившиеся на малом сроке гестации (до 32 нед) или с экстремально низкой массой тела. Распространенность сепсиса новорожденных обратно коррелирует с гестационным возрастом и массой тела при рождении [35]; следовательно, дети, рожденные преждевременно, могут быть отнесены к группе риска по развитию инфекций. Поскольку состояние иммунодефицита у недоношенных детей не подвер-

галось всесторонней оценке до начала скринирования на данную патологию, в настоящее время такие дети рассматриваются как имеющие повышенный риск развития инфекций и требуют соответствующих условий выхаживания [37, 38]. В этом контексте незрелость иммунной системы как фактор, имеющий временный эффект, обусловленный гестационным возрастом, трудноотделим от специфических факторов, связанных с состоянием здоровья недоношенных новорожденных: врожденных аномалий, инфекционных, эндокринных осложнений и нарушений обмена веществ [36]. Поэтому крайне важно иметь алгоритм уточнения дефектных механизмов, лежащих в основе иммунных реакций у новорожденных, который будет способствовать раннему распознаванию пациентов с врожденной иммунной недостаточностью.

Количественная оценка TREC в диагностике тяжелой комбинированной иммунной недостаточности

Одним из современных и перспективных методов оценки пролиферации лимфоцитов является определение кольцевых структур ДНК (TREC и KREC), образующихся при реаранжировке T- и B-клеточного рецепторов лимфоцитов и содержащих определенные константные последовательности нуклеотидов, по которым их можно обнаружить [39, 40].

Молекула TREC (T-cell receptor excision circle) — это побочный продукт T-клеточной дифференциации, происходящей в тимусе во время формирования T-клеточного рецептора (T-cell receptor, TCR) [39]. Суть генетической рекомбинации, приводящей к формированию зрелых генов на основе предсуществующих генетических сегментов (V — варибельного, D — формирующего разнообразие, J — соединительного), состоит в сближении случайных сегментов, а после двойных разрывов ДНК — в сшивке этих сегментов с формированием зрелого V-гена. При этом генетический материал, расположенный между ними (который и называется TREC), образует петлю, вырезается и замыкается в кольцо. Данная эпизомальная структура ДНК образуется на конечном этапе дифференцировки T-клеток, встречается в 70% всех тимоцитов, экспрессирующих $\alpha\beta$ -TCR, стабильна и не реплицируется во время митоза, что позволяет использовать ее в качестве суррогатного маркера адекватной аутологической пролиферации T-лимфоцитов [12, 13, 40].

Количество копий TREC в образце ДНК измеряется с помощью количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени и отражает число наивных T-клеток, вышедших из тимуса в кровоток. Здоровые новорожденные имеют приблизительно 1 TREC на 10 T-клеток, что отражает высокий уровень наивных T-лимфоцитов в крови, в то время как дети более старшего возраста и взрослые имеют примерно 1 на 100 или 1000 T-клеток, что связано с «разбавлением» T-клеточного пула путем митотического деления [40]. Новорожденные дети с ТКИН имеют очень низкие или неопределяемые уровни TREC [12, 13, 41]. Именно это позволяет выявлять заболевание на первой неделе жизни ребенка — задолго до манифестации клинических проявлений болезни.

Скрининг-тест на определение TREC является высокочувствительным, специфичным и экономически эффективным методом массового обследования новорожденных [42]. Любой генетический дефект, который нарушает развитие T-клеток, индуцирует их апоптоз или блокирует их дифференцировку в тимусе, приводит к T-клеточной лимфопении и низкому уровню TREC. Таким образом, количественная оценка уровня TREC позволяет выявить

детей с типичной ТКИН, а также с другими заболеваниями, затрагивающими численность и функционирование Т-клеточного звена иммунной системы (например, синдром Ди Джорджи или синдром Чардж) [12, 43].

KREC в качестве универсального маркера В-клеточной пролиферации

Проблема идентификации больных с В-клеточными дефектами иммунной системы, приводящими к развитию не менее тяжелых и угрожающих жизни состояний (агаммаглобулинемия Брутона, гипериммуноглобулинемия М, ТКИН с отсутствием В-клеток), в настоящее время решается скринингом на KREC (Kappa-deleting recombination excision circle) [13, 44].

KREC — аналог кольцевой молекулы TREC, образуемой в процессе созревания В-клеток в костном мозге. Формирование разнообразия В-клеточного рецептора легких цепей иммуноглобулинов [V(D)J — рекомбинация IGK-локуса] приводит к образованию эксцизионных колец KREC. Кодированная часть рекомбинантной последовательности (Coding joint) остается при этом в геноме, предотвращая последующие перестройки в локусе IGK, а сигнальный элемент (Signal joint KREC) вырезается, замыкается в кольцо и остается в клетке в виде экстрахромосомной единицы ДНК. Как и в случае TREC, KREC не может реплицироваться в клетке, является стабильной структурой и встречается более чем в 50% В-лимфоцитов [13, 44, 45].

Тестирование новорожденных на KREC потенциально полезно для выявления больных с дефектами раннего созревания В-клеток в костном мозге, поскольку позволяет незамедлительно начать заместительную терапию иммуноглобулинами. Основной целью заместительной терапии является профилактика бактериальных инфекций, предотвращение повреждений внутренних органов больного и повышение качества его жизни [46]. Кроме того, введение иммуноглобулинов экономически оправдано, так как снижает число госпитализаций и обращений к экстренным службам медицинской помощи, позволяет избежать назначения дорогостоящих антибиотиков и пропуска рабочего времени школьниками и работающими взрослыми [46, 47].

Большим преимуществом является возможность комбинировать тесты на TREC и KREC в реакции мультиплексной полимеразной цепной реакции [13]. Такая комбинация тестов позволяет обнаруживать суммарно больше первичных иммунодефицитов, чем при отдельном тестировании TREC или KREC, благодаря чему появляется возможность на основании результата скрининга своевременно приступить к адекватной патогенетически обоснованной терапии больных детей, что в конечном итоге приведет к снижению заболеваемости и младенческой смертности, обусловленной данными нозологиями [13].

НЕОНАТАЛЬНЫЙ СКРИНИНГ В СВЕРДЛОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Тестирование на ТКИН в Свердловской области и предпосылки внедрения в программу неонатального скрининга

В ходе пилотного исследования, выполненного нашей группой в 2014–2016 гг., было проведено определение TREC и KREC в сухих пятнах крови, взятой на тест-бланки для неонатального скрининга у детей с клиническими проявлениями первичного иммунодефицита на первом году жизни. Исследование проводили с помощью отечественной мультиплексной тест-системы TREC&KREC, разработанной в Институте химической биологии и фундаменталь-

ной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск) и Новосибирском государственном исследовательском университете совместно с ГБУЗ «Детская городская клиническая больница № 9 (ДГКБ № 9) им. Г. Н. Сперанского (Москва) [48].

В исследование включали архивные тест-бланки с пятнами сухой крови детей, развивших лимфопению на первом году жизни, имевших случаи тяжелых инфекций в анамнезе, а также пациентов с врожденными пороками развития. В общей сложности нами было проанализировано содержание TREC и KREC в образцах сухой крови 117 новорожденных [49]. В ходе исследования были определены референсные значения маркеров TREC и KREC в сухих пятнах крови условно-здоровых новорожденных: среднее количество TREC (в копиях на 10 000 лейкоцитов) составило 641,9 копий, среднее количество KREC (копий на 10 000 лейкоцитов) составило 147,3. Установлено, что количество копий данных маркеров у пациентов с расстройствами иммунной системы существенно ниже, чем в контрольной группе, либо вообще не определяется, что соответствует данным, полученным зарубежными авторами [12, 40].

Клинический случай: количественное определение TREC и KREC в сухом пятне крови у ребенка с X-сцепленной агаммаглобулинемией

Мальчик П., наблюдается в отделении клинической иммунологии ОДКБ № 1 г. Екатеринбурга с 6 мес. Ребенок от 2-й беременности (от первой — девочка, здорова), роды в срок. Масса при рождении — 3390 г, длина — 53 см. Вакцинация против гепатита В и БЦЖ проведена в роддоме. Находился на грудном вскармливании до 3-месячного возраста.

Анамнез заболевания: в возрасте 3,5 мес перенес респираторную вирусную инфекцию, экссудативный отит, в 4 мес — серозный менингит, сопровождавшийся мелкой папулезной сыпью, которая была расценена как проявление острой аллергической реакции (аллерген не установлен), в 5 мес — острую вирусную инфекцию с ларинготрахеитом и рецидивом серозного менингита. Уровень иммуноглобулинов в периферической крови в возрасте 4 мес: IgA 0,05 г/л (референсные значения 0,1–0,4 г/л [50]), IgM 0,2 г/л (0,4–1,8 г/л), IgG 0,75 г/л (1,2–12,8 г/л).

После проведения антибактериальной терапии мальчик был выписан из районной больницы в удовлетворительном состоянии и направлен на консультацию к иммунологу в отделение клинической иммунологии ОДКБ № 1, где ему было проведено углубленное иммунологическое исследование. Выявлено отсутствие CD19+ лимфоцитов и сохраняющаяся гипогаммаглобулинемия (IgA — не обнаружено, IgM 0,6 г/л, IgG < 0,7 г/л).

На основании клинических и лабораторных данных мальчику в возрасте 6 мес был поставлен диагноз «Первичный иммунодефицит, агаммаглобулинемия с дефицитом В-клеток», назначена регулярная заместительная терапия внутривенными иммуноглобулинами в дозе 0,4 г/кг в режиме насыщения до повышения уровня IgG до 8,0 г/л.

Из архива лаборатории неонатального скрининга была запрошена фильтровальная карточка (тест-бланк) с сухими пятнами крови, взятой на 4-е сут жизни ребенка. Ретроспективное исследование количества копий кольцевых участков ДНК Т- и В-клеточного рецепторов лимфоцитов (TREC и KREC) в образце ДНК, выделенной из сухого пятна крови, показало полное отсутствие KREC в генетическом материале при нормальном количестве

копий TREC. Это явилось косвенным подтверждением наличия генетической причины дефекта В-клеточного компонента иммунной системы ребенка.

Х-сцепленная агаммаглобулинемия (болезнь Брутона) (OMIM 300300) является одним из наиболее тяжелых иммунодефицитных состояний. Заболевание представляет собой высокую подверженность инфекционным агентам в сочетании с аутоиммунными заболеваниями и характеризуется нарушением созревания В лимфоцитов. Причиной заболевания являются мутации в гене, кодирующем нерецепторную тирозинкиназу Брутона (B-cell tyrosine kinase, Btk), играющую важную роль в созревании и функционировании В лимфоцитов и других клеток крови [51].

С целью генетической верификации клинического диагноза мы амплифицировали фрагменты геномной ДНК пробанда, охватывающие кодирующую последовательность гена *BTK* с примыкающими участками интронов. При секвенировании данных фрагментов во втором экзоне гена была обнаружена делеция 13 нуклеотидов, приводящая к сдвигу рамки считывания и преждевременной остановке синтеза тирозинкиназы (неопубликованные данные). Семье было предложено молекулярно-генетическое исследование на носительство данной мутации у матери и сестры пробанда. Проведенная ДНК-диагностика подтвердила наличие вышеуказанной микроделеции в гене *BTK* у членов семьи женского пола. В семье пациента П. возможна пренатальная диагностика следующей беременности. Кроме того, семья имеет важную информацию для старшей дочери: девочка является носителем измененного гена, и знание данной особенности своего генетического профиля позволит в будущем грамотно подойти к вопросу планирования семьи с точки зрения передачи мутантного аллеля следующему поколению.

В представленном клиническом случае своевременное тестирование ДНК, выделенной из сухого пятна крови новорожденного П. на KREC, могло бы значительно сократить время до постановки правильного диагноза, а раннее назначение патогенетически обоснованной терапии (в данном случае заместительной терапии иммуноглобулинами) — предупредить развитие тяжелых инфекций у мальчика в первые месяцы жизни.

Диагностика первичных иммунодефицитов у детей с летальными исходами на первом году жизни

В исследование по определению уровней TREC и KREC были включены также дети раннего возраста ($n = 43$), умершие на территории Свердловской области в 2012–2014 гг. по причине бактериальной или вирусной инфекции на первом году жизни [52]. Низкие количества TREC и/или KREC были обнаружены в 37% случаев. У одного ребенка был подтвержден клинический диагноз синдрома микроделеции 22-й хромосомы (синдром Ди Джорджи). У 5 детей с низкими уровнями TREC/KREC были выявлены изменения нуклеотидной последовательности в гене активации рекомбиназы *RAG1*. При этом две обнаруженные мутации описаны в международной базе по мутациям (Human gene mutation database, HGMD) [53] как ассоциированные с фенотипом ТКИН и повышенным риском развития неходжкинских лимфом, а третий вариант представляет собой ранее не описанную миссенс-мутацию, приводящую к преждевременной остановке синтеза белка [52]. Подобные находки подтверждают нашу гипотезу о том, что тестирование новорожденных на ТКИН позволит верифицировать нозологические синдромы первичных иммунодефицитов как причины случаев

ранней детской смерти, а также случаев смертности в других возрастных группах. В настоящее время регистрация этих случаев проводится по фенотипическим проявлениям заболеваний, что снижает статистическую величину распространения первичных иммунодефицитов.

Условия внедрения неонатального скрининга на тяжелый комбинированный иммунодефицит в Свердловской области

Очевидно, что для введения дополнительного тестирования на ТКИН в России по программе массового скринингирования новорожденных потребуются значительные дополнительные финансовые ресурсы для реализации и работы расширенной программы скрининга. Однако включение данного заболевания в качестве дополнительной нозологии в программу селективного скрининга на наследственные болезни обмена, существующей в настоящее время в Свердловской области, вполне может быть реализовано без дополнительных условий, поскольку инфраструктура для скрининга новорожденных уже существует: имеются хорошо отлаженный протокол скрининга и логистики вокруг сбора пятен крови и их транспортировки в лабораторию неонатального скрининга Клинико-диагностического центра «Охрана здоровья матери и ребенка» (Екатеринбург).

Существующая отечественная мультиплексная тест-система TREC&KREC пригодна для оценки функционирования иммунной системы новорожденных в формате селективного скрининга, однако для использования метода в рамках массового скрининга необходима его модификация, в частности переход от использования ручного «раскапывания» реагентов к полной автоматизации этапов реакции, что позволит достигнуть высокого уровня стандартизации массовых ПЦР-исследований.

Современная иммунологическая служба, специализирующаяся на лечении пациентов с первичными иммунодефицитными состояниями, выявленных на основании клинических данных, уже существует в ОДКБ № 1 г. Екатеринбурга. Как правило, пациенты с ТКИН, прошедшие процедуру трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, полностью выздоравливают в течение одного года и нуждаются в дальнейшем только в ежегодном получении консультации иммунолога [54].

Таким образом, наличие существующей программы и отработанного алгоритма скринирования новорожденных на наследственные заболевания, а также высокопрофессиональной иммунологической службы в Свердловской области в основном достаточно, чтобы приспособить диагностику, лечение и последующие меры мониторингирования притока вновь выявленных пациентов с ТКИН и другими Т-клеточными лимфопениями и агаммаглобулинемией.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Тяжелая комбинированная иммунная недостаточность — заболевание, которое на сегодняшний день во всем мире признано предотвратимым при условии обязательного включения тестирования на ТКИН в программу массового обследования новорожденных. Внедрение данной методики в программу скринирования российских новорожденных позволит вывести диагностику врожденных дефектов иммунитета в стране на качественно новый уровень: сократится количество случаев госпитализации детей с тяжелыми инфекциями; уменьшатся расходы на длительное лечение детей с тяжелыми воспалительными процессами; снизятся показатели детской заболеваемости и смертности, в т.ч. по таким нозологиям, как

пневмония и другие бронхолегочные заболевания, доля которых в общей структуре младенческой смертности остается стабильно высокой. «Редкость» таких наследственных заболеваний, зачастую обусловленная низким уровнем диагностического процесса в стране и отсутствием настороженности специалистов первичного звена, не должна априори умалять их огромную значимость среди «больших» общегосударственных проблем. И наша задача как грамотных докторов, как думающих родителей, как активных граждан России — сделать так, чтобы наши дети были защищены от всех предотвратимых заболеваний и имели право полного доступа к качественным

услугам здравоохранения независимо от региона проживания и редкости поставленного диагноза.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

С. С. Дерябина <http://orcid.org/0000-0001-5614-5944>

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ярцев М.Н., Яковлева К.П., Плахтиенко М.В. Первичная иммунная недостаточность по данным Регистра первичных иммунодефицитных состояний Института иммунологии ФМБА России // *Педиатрия. Приложение к журналу Consilium Medicum*. — 2006. — Т. 8. — № 1 — С. 4–9. [Yartsev MN, Yakovleva KP, Plakhtienko MV. Pervichnaya immunnaya nedostatochnost' po dannym Registra pervichnykh immunodefitsitnykh sostoyanii Instituta immunologii FMBA Rossii. *Pediatriya. Prilozhenie k zhurnalu Consilium Medicum*. 2006;8(1):4–9. (In Russ).]
2. Кондратенко И.В. Первичные иммунодефициты // *Медицинская иммунология*. — 2005. — Т. 7. — № 5–6 — С. 467–476. [Kondratenko IV. Pervichnye immunodefitsity. *Medical Immunology (Russia)*. 2005;7(5–6):467–476. (In Russ).]
3. Латышева Е.А. Первичные иммунодефициты: состояние проблемы на сегодняшний день. JMF-центры в России // *Вопросы современной педиатрии*. — 2013. — Т. 12. — № 6 — С.73–77. [Latysheva EA. Primary immunodeficiency: status of a problem today. Russian network of JMF-centers. *Current pediatrics*. 2013;12(6):73–77. (In Russ).] doi: 10.15690/vsp.V12i6.877.
4. Щербина А.Ю. Маски первичных иммунодефицитных состояний: проблемы диагностики и терапии // *Российский журнал детской гематологии и онкологии*. — 2016. — Т. 3. — № 1 — С. 52–58. [Shcherbina AYU. Masks of primary immunodeficiency disorders: diagnostic and therapeutic problems. *Russian Journal of Children Hematology and Oncology*. 2016;3(1):52–58. (In Russ).] doi: 10.17650/2311-1267-2016-3-1-52-58.
5. Тузанкина И.А. К вопросу диагностики иммунопатологии // *Медицинская иммунология*. — 2010. — Т. 12. — № 6 — С. 485–496. [Tuzankina IA. K voprosu diagnostiki immunopatologii. *Medical Immunology (Russia)*. 2010;12(6):485–496. (In Russ).]
6. Pay SY, Logan BR, Griffit LM, et al. Transplantation outcomes for severe combined immunodeficiency, 2000–2009. *N Engl J Med*. 2014;371(5):434–446. doi: 10.1056/NEJMoa1401177.
7. Abedi M. Report from the ESID registry of primary immunodeficiencies. *The Source*. 2003;February/March:8–9.
8. Mahlaoui N, Gathmann B, Kindle G, et al. The European Society for Immunodeficiencies (ESID) Registry: recent advancements in the epidemiology of Primary Immunodeficiencies and how does that translate in clinical care. *Rare diseases and orphan drugs*. 2014;1(4 Suppl 4):25–27.
9. Буйнова С.Н., Шинкарева В.М., Павлова Т.Б. Создание регистра первичных иммунодефицитов у детей Иркутской области // *Сибирский медицинский журнал*. (Иркутск). — Т. 133. — № 2 — С. 83–86. [Buynova SN, Shinkareva VM, Pavlova TB. Creating a registry of primary immunodeficiencies in children of Irkutsk Region. *Sibirskii meditsinskii zhurnal (Irkutsk, Russia)*. 2015;133(2):83–86. (In Russ).]
10. Генетические исследования. [Geneticheskie issledovaniya. (In Russ).] Доступно по: <http://www.fondpodsolnuh.ru/kids/info.xl?id=12114>. Ссылка активна на 09.02.2017.
11. Сизякина Л.П., Андреева И.И. Создание регистра пациентов как эффективный инструмент диагностики первичных иммунодефицитов // *Педиатрическая фармакология*. — 2013. — Т. 10. — № 5 — С. 94–96. [Sizyakina LP, Andreeva II. Register of patients as an effective method of diagnosing primary immunodeficiencies. *Pediatric pharmacology*. 2013;10(5):94–96. (In Russ).] doi: 10.15690/pf.V10i5.831.
12. Kwan A, Abraham RS, Currier R, et al. Newborn screening for combined immunodeficiency in 11 screening programs in the United States. *JAMA*. 2014;312(7):729–738. doi: 10.1001/jama.2014.9132.
13. Borte S, von Döbeln U, Fasth A, et al. Neonatal screening for severe primary immunodeficiency diseases using high-throughput triplex real-time PCR. *Blood*. 2012;119(11):2552–2555. doi: 10.1182/blood-2011-08-371021.
14. Somech R, Lev A, Simon AJ, et al. Newborn screening for severe T and B cell immunodeficiency in Israel: a pilot study. *Isr Med Assoc*. 2013;15(8):404–409.
15. Audrain M, Thomas C, Mirallie S, et al. Evaluation of the T-cell receptor excision circle assay performances for severe combined immunodeficiency neonatal screening on Guthrie cards in a French single centre study. *Clin Immunol*. 2014;150(2):137–139. doi: 10.1016/j.clim.2013.11.012.
16. Adams SP, Rashid S, Premachandra T, et al. Screening of neonatal UK dried blood spots using a duplex TREC screening assay. *J Clin Immunol*. 2014;34(3):323–330. doi: 10.1007/s10875-014-0007-6.
17. Chien YH, Chiang SC, Chang KL, et al. Incidence of severe combined immunodeficiency through newborn screening in a Chinese population. *J Formos Med Assoc*. 2015;114(1):12–16. doi: 10.1016/j.jfma.2012.10.020.
18. MacCreedy RA. Phenylketonuria screening programs. *N Engl J Med*. 1963;269(1):52–53. doi: 10.1056/nejm196307042690117.
19. Захарова Е.Ю. Программы массового скрининга: технические, социальные и этические вопросы // *Медицинская генетика*. — 2006. — Т. 5. — № 3 — С. 21–23. [Zakharova EYu. Programmy massovogo skringinga: tekhnicheskie. Sotsial'nye i eticheskie voprosy. *Meditsinskaya genetika*. 2006;5(3):21–23. (In Russ).]
20. Wilson JM, Jungner YG. *Principles and practice of screening for disease*. Geneva: World Health Organization; 1968. p. 7–151.
21. Andermann A, Blancquaert I, Beauchamp S, Dyré V. Revisiting Wilson and Jungner in the genomic age: a review of screening criteria over the past 40 years. *Bull World Health Organ*. 2008;86(4):317–319. doi: 10.2471/BLT.07.050112.
22. Therrell B, Padilla C, Loeber J, et al. Current status of newborn screening worldwide: 2015. *Semin Perinatol*. 2015;39(3):171–187. doi: 10.1053/j.semperi.2015.03.002.
23. Приказ Минздравсоцразвития России от 22.03.2006 г. №185 «О массовом обследовании новорожденных детей на наследственные заболевания». [Decree of Ministry of Health Care and Social Development of the Russian Federation №185 «O massovom obsledovanii novorozhdennykh detei na nasledstvennye zabolevaniya» dated 22 Mar 2006. (In Russ).] Доступно по: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_103237/. Ссылка активна на 09.02.2017.
24. Приказ МЗ Свердловской области от 02.03.2012 г. № 166п «О совершенствовании массового обследования новорожденных детей на наследственные заболевания на территории Свердловской области». [Decree of Sverdlovsk Region Ministry of Health Care № 166–p «O sovershenstvovanii massovogo obsledovaniya novorozhdennykh detei na nasledstvennye zabolevaniya na territorii Sverdlovskoi oblasti» dated 02 Mar 2012. (In Russ).] Доступно по: <http://ekb4.info/ekaterinburg8/prikaz16.htm>. Ссылка активна на 28.04.15.

25. Pandor A, Eastham J, Beverley C, et al. Clinical effectiveness and cost-effectiveness of neonatal screening for inborn errors of metabolism using tandem mass spectrometry: a systematic review. *Health Technol Assess.* 2004;8(11):1–121. doi: 10.3310/hta8120.
26. Black H. Newborn screening report sparks debate in USA. *Lancet.* 2005;365(9469):1453–1454. doi: 10.1016/S0140-6736(05)66401-X.
27. Новиков П.В. Неонатальный скрининг на наследственные болезни обмена веществ и его перспективы в Российской Федерации // *Справочник заведующего КДЛ.* — 2014. — № 2 — С. 24–36. [Novikov PV. Neonatal'nyi skrining nasledstvennykh boleznei obmena veshchestv i ego perspektivy v Rossiiskoi Federatsii. *Spravochnik zaveduyushchego KDL.* 2014;(2):24–36. (In Russ).]
28. Приказ МЗ Свердловской области от 10.11.2015 № 1769п «О диагностике наследственных болезней обмена веществ у детей методом tandemной масс-спектрометрии на территории Свердловской области» [Decree of Sverdlovsk Region Ministry of Health Care № 1769–p «O diagnostike nasledstvennykh boleznei obmena veshchestv u detei metodom tandemnoi mass-spektrometrii na territorii Sverdlovskoi oblasti» dated 10 Nov 2015. (In Russ).] Доступно по: <http://minzdrav.midural.ru/uploads/document/2400/1769p.pdf>. Ссылка активна на 09.02.2017.
29. Institute of Health Economics. *Newborn blood spot screening for galactosemia, tyrosinemia type I, homocystinuria, sickle cell anemia, sickle cell/beta-thalassemia, sickle cell/hemoglobin C disease, and severe combined immunodeficiency.* Edmonton (AB): Institute of Health Economics; 2016.
30. Байдакова Г.В. Алгоритмы дифференциальной диагностики наследственных болезней обмена веществ, сопровождающихся нарушениями метаболизма аминокислот и ацилкарнитинов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — М.; 2012. — 24 с. [Baidakova GV. *Algoritmy differentsial'noi diagnostiki nasledstvennykh boleznei obmena veshchestv, soprovozhdayushchikhsya narusheniyami metabolizma aminokislot i atsilkarnitinov.* [dissertation abstract] Moscow; 2012. 24 p. (In Russ).]
31. Wolf B. Biotinidase deficiency: new directions and practical concerns. *Curr Treat Options Neurol.* 2003;5(4):321–328. doi: 10.1007/s11940-003-0038-4.
32. Abstracts of the Annual Symposium of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism. Geneva, Switzerland. August 30–September 2, 2011. Mikhaylova SV, Baydakova GV, Zakharova EY. High single mutation frequency for biotinidase deficiency in Russia. *J Inherit Metab Dis.* 2011;34 Suppl 3:122.
33. Зыков В.П., Бондаренко Е.С., Ширеторова Д.Ч., и др. Диагностика и лечение наследственных заболеваний нервной системы у детей. — М.: Триада-Х; 2008. — 224 с. [Zykov VP, Bondarenko ES, Shiretorova DCh, et al. *Diagnostika i lechenie nasledstvennykh zabolevanii nervnoi sistemy u detei.* Moscow: Triada-X; 2008. 224 p. (In Russ).]
34. Zasada M, Kwint P, Durlak W, et al. Development and maturation of the immune system in preterm neonates: results from a whole genome expression study. *Biomed Res Int.* 2014;2014:498318. doi: 10.1155/2014/498318.
35. Shane AL, Stoll BJ. Neonatal sepsis: progress towards improved outcomes. *J Infect.* 2014;68 Suppl 1:S24–32. doi: 10.1016/j.jinf.2013.09.011.
36. Holt PG, Jones CA. The development of the immune system during pregnancy and early life. *Allergy.* 2000;55(8):688–697. doi: 10.1034/j.1398-9995.2000.00118.x.
37. Adkins B, Leclerc C, Marshall-Clarke S. Neonatal adaptive immunity comes of age. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(7):553–564. doi: 10.1038/nri1394.
38. Huenecke S, Fryns E, Wittekindt B, et al. Percentiles of lymphocyte subsets in preterm infants according to gestational age compared to children and adolescents. *Scand J Immunol.* 2016;84(5):291–298. doi: 10.1111/sji.12474.
39. Douek DC, McFarland RD, Keiser PH, et al. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV–infection. *Nature.* 1998;396(6712):690–695. doi: 10.1038/25374.
40. Verbsky JW, Baker MW, Grossman WJ, et al. Newborn screening for severe combined immunodeficiency; the Wisconsin experience (2008–2011). *J Clin Immunol.* 2012;32(1):828. doi: 10.1007/s10875-011-9609-4.
41. Verbsky J, Thakar M, Routes J. The Wisconsin approach to newborn screening for severe combined immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;129(3):622–627. doi: 10.1016/j.jaci.2011.12.004.
42. Livak F, Schatz DG. T-cell receptor alpha locus V(D)J recombination by-products are abundant in thymocytes and mature T cells. *Mol Cell Biol.* 1996;16(2):609–618. doi: 10.1128/mcb.16.2.609.
43. Modell V, Knaus M, Modell F. An analysis and decision tool to measure cost benefit of newborn screening for severe combined immunodeficiency (SCID) and related T-cell lymphopenia. *Immunol Res.* 2014;60(1):145–152. doi: 10.1007/s12026-014-8485-4.
44. Nakagawa N, Imai K, Kanegane H, et al. Quantification of k-deleting recombination excision circles in Guthrie cards for the identification of early B-cell maturation defects. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;128(1):223–225.e2. doi: 10.1016/j.jaci.2011.01.052.
45. van Zelm MC, Szczepanski T, van der Burg M, van Dongen JJ. Replication history of B lymphocytes reveals homeostatic proliferation and extensive antigen-induced B cell expansion. *J Exp Med.* 2007;204(3):645–655. doi: 10.1084/jem.20060964.
46. Gardulf A, Nicolay U. Replacement IgG therapy and self-therapy at home improve the health-related quality of life in patients with primary antibody deficiencies. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2006;6(6):434–442. doi: 10.1097/01.all.0000246619.49494.41.
47. Selected Abstracts from the 100th J Project Meeting, Antalya, Turkey, March 12–14, 2014. Bolkov M, Tuzankina I, Karakina M, Deryabina S. Economic efficiency of screening of newborns in the Ural region. *J Clin Immunol.* 2014;34(6):720. doi: 10.1007/s10875-014-0065-9.
48. Гордукова М.А., Оскорбин И.П., Мишукова О.В., 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 // *Медицинская иммунология.* — 2015. — Т. 17. — № 5 — С. 467–478. [Gordukova MA, Oskorbin IP, Mishukova OV, et al. Development of real-time multiplex PCR for the quantitative determination of TREC's and KREC's in whole blood and in dried blood spots. *Medical Immunology (Russia).* 2015;17(5):467–478. (In Russ).] doi: 10.15789/1563-0625-2015-5-467-478.
49. Дерябина С.С., Тузанкина И.А., Власова Е.В., Шершнева В.Н. Количественная оценка кольцевых структур TREC и KREC у детей с нарушениями функции иммунной системы на первом году жизни // *Медицинская генетика.* — 2015. — № 2 — С. 53–54. [Deryabina SS, Tuzankina IA, Vlasova EV, Shershnev VN. Kolichestvennaya otsenka kol'tsevykh struktur TREC i KREC u detei s narusheniyami funktsii immunnoi sistemy na pervom godu zhizni. *Meditsinskaya genetika.* 2015;(2):53–54. (In Russ).]
50. *Иммунология детского возраста* / Под ред. А.Ю. Щербины, Е.Д. Пашанова. — М.: ИД МЕДПРАКТИКА-М; 2006. — 432 с. [Immunologiya detskogo vozrasta. Ed by Shcherbina A.Yu., Pashanov E.D. Moscow: ID MEDPRAKTIKA-M; 2006. 432 p. (In Russ).]
51. Vetrie D, Vorechovsky I, Sideras P, et al. The gene involved in X-linked agammaglobulinemia is a member of the src family of protein-tyrosine kinases. *Nature.* 1993;361(6409):226–233. doi: 10.1038/361226a0.
52. Дерябина С.С., Тузанкина И.А., Власова Е.В., и др. Ретроспективная диагностика первичных иммунодефицитных состояний у детей в Свердловской области // *Медицинская иммунология.* — 2016. — Т. 18. — № 6 — С. 583–588. [Deryabina SS, Tuzankina IA, Vlasova EV, et al. Retrospective diagnosis of primary immunodeficiencies for children in Sverdlovsk Region. *Medical Immunology (Russia).* 2016;18(6):583–588. (In Russ).] doi: 10.15789/1563-0625-2016-6-583-588.
53. hgmd.cf.ac.uk [Internet]. The Human Gene Mutation Database [cited 2017 Feb 22]. Available from: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>.
54. Chapel H, Prevot J, Gaspar HB, et al. Primary immune deficiencies — principles of care. *Front Immunol.* 2014;5:627. doi: 10.3389/fimmu.2014.00627.