

Разработка методики количественной оценки молекул TREC и KREC в цельной крови и сухих пятнах крови методом цифровой ПЦР

Слепцов А.А.¹, Орлов Д.С.¹, Огородников С.А.¹, Назаренко М.С.^{1,2}

- 1 – ФГБНУ Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Научно-исследовательский институт медицинской генетики 634050, г. Томск, Россия, ул. Набережная реки Ушайки, д. 10
- 2 – ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации 634050, г. Томск, Россия, Московский тракт, д. 2

Существует целый ряд патологических состояний, сопровождаемых сниженными показателями Т- и В-лимфоцитов. Оценка этих показателей является жизненно важной для новорожденных, так как без своевременной диагностики и терапии нарушение иммунитета может привести к инфекционным заболеваниям с тяжелым течением, инвалидизации и высокой летальности. Цель исследования заключалась в разработке высокочувствительного и прецизионного метода для подсчета количества наивных Т- и В-лимфоцитов на основе определения эксцизионных кольцевых молекул ДНК TREC и KREC методом цифровой ПЦР. В результате был разработан специфический набор праймеров и проб, позволяющий с высокой точностью определять количество молекул TREC и KREC, а также проводить подсчет количества ядросодержащих клеток. Предложенная методика демонстрирует высокую диагностическую специфичность и чувствительность. Методика может быть применена как скрининговая диагностика иммунодефицитных состояний новорожденных, так и для оценки иммунного статуса у взрослого населения при различных иммунопатологических состояниях.

Ключевые слова: неонатальный скрининг, цифровая ПЦР, иммунодефицитные заболевания.

Для цитирования: Слепцов А.А., Орлов Д.С., Огородников С.А., Назаренко М.С. Разработка методики количественной оценки молекул TREC и KREC в цельной крови и сухих пятнах крови методом цифровой ПЦР. *Медицинская генетика*. 2024; 23(10): 55-62.

Автор для корреспонденции: Слепцов А.А.; e-mail: alexei.sleptcov@medgenetics.ru

Финансирование. Исследование выполнено в рамках поисковых научных исследований 123041700028-8 от 17.04.2023 г.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 17.10.2024

Development of a method for quantitative assessment of TREC and KREC molecules in whole blood and dried blood spots using digital PCR

Sleptcov A.A.¹, Orlov D.S.¹, Ogorodnikov S.A.¹, Nazarenko M.S.^{1,2}

- 1 – Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Research Institute of Medical Genetics 10, Naberejnaya Ushaiki, Tomsk, 634050, Russian Federation
- 2 – Siberian State Medical University 2, Moskovsky trakt, Tomsk, 634050 Russian Federation

A reduction in the indices of T- and B-lymphocytes is a common feature of a number of pathological conditions. The assessment of these indices is of paramount importance in the context of newborns, as the absence of timely diagnosis and treatment can result in the development of severe infectious diseases, disability, and high mortality. The objective of this study was to develop a highly sensitive and precise method for enumerating naïve T- and B-lymphocytes based on the quantification of excision circular DNA molecules TREC and KREC through digital polymerase chain reaction. Consequently, a specific set of primers and probes was developed, enabling highly accurate determination of the number of TREC and KREC molecules and counting of the number of nucleated cells. The proposed method exhibits high diagnostic specificity and sensitivity, rendering it suitable for use in both screening diagnostics of immunodeficiency states in newborns and for assessing the immune status in adults with various immunopathological conditions.

Keywords: neonatal screenings, digital PCR, immunodeficiency diseases.

For citation: Sleptcov A.A., Orlov D.S., Ogorodnikov S.A., Nazarenko M.S. Development of a method for quantitative assessment of TREC and KREC molecules in whole blood and dried blood spots using digital PCR. *Medical genetics [Medicinskaya genetika]*. 2024; 23(10): 55-62. (In Russian)

Corresponding author: A.A. Sleptcov; e-mail: alexei.sleptcov@medgenetics.ru

Funding. The study was carried out according to scientific research 123041700028-8 dated 04/17/2023.

Conflict of Interest. The authors declare no conflict of interest.

Accepted: 17.10.2024

Введение

Адаптивный иммунитет является одним из важнейших аспектов жизнедеятельности человека, а Т- и В-лимфоциты выступают в качестве незаменимых компонентов этого процесса. В ходе лимфопоэза в клетках-предшественниках происходит процесс, известный как V(D)J-рекомбинация, в результате которого образуются эписомальные эксцизионные кольцевые ДНК. У Т-лимфоцитов образуются TREC (T cell receptor excision circle), а у В-лимфоцитов – KREC (kappa-deleting excision circle). В процессе рекомбинации эксцизионные фрагменты ДНК лигируются (закольцовываются), образуя «сигнальный стык» (signal joint), имеющий уникальную последовательность, специфичную для наивных $\alpha\beta$ Т-клеток и В-лимфоцитов [1], благодаря чему стала возможна специфическая оценка TREC и KREC, позволившая проводить мониторинг иммунного статуса [2]. Наиболее широкое применение методика приобрела при скрининге новорожденных на первичные иммунодефициты, поскольку существует достоверная корреляция между низкими концентрациями TREC и Т-клеточными лимфопениями [3]. Устойчивое увеличение количества TREC свидетельствует о формировании новых функциональных Т-клеток, что, в свою очередь, указывает на эффективность антиретровирусной терапии у пациентов с ВИЧ [4]. Наконец, подобная оценка позволяет проводить мониторинг состояния иммунитета после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток [5].

Наиболее распространенным методом количественной оценки TREC и KREC является полимеразная цепная реакция (ПЦР) в режиме реального времени [1, 6–8], имеющая существенный недостаток, заключающийся в том, что происходит экстраполяция порога флуоресцентного сигнала на количественную оценку, в результате чего методика менее аналитически чувствительна для обнаружения более низких количеств копий, что приводит к повышению числа ложноположительных и ложноотрицательных результатов при массовом скрининге. Кроме того, для расчета концентрации необходимо использовать внешние стандарты, а гетерогенная эффективность амплификации оказывает значительное влияние на конечный результат [9]. Цифровая ПЦР (цПЦР) лишена подобных недостатков, так как основана на детекции каждой целевой молекулы ДНК [10]. Дискретное и кластерное разделение результатов цПЦР обеспечивает высокую аналитическую чувствительность и специфичность.

Цель исследования заключалась в разработке высокопрецизионного метода одновременного определения молекул TREC, KREC и референсного гена *TRAC* в цельной крови и сухих пятнах крови методом цПЦР.

Методы

Для проведения эксперимента использованы обезличенные зашифрованные бланки с образцами сухих пятен крови здоровых новорожденных Томской области ($n=30$). Все новорожденные были доношенными со средним сроком гестации 38 ± 1 неделя. Срок забора материала в среднем составил 62 ± 8 часов. Средний вес новорожденных составил 3302 ± 371 гр. 47% новорожденных были женского пола.

Исследование одобрено этическим комитетом НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ. От родителей новорожденных получено информированное добровольное согласие на использование образцов пятен крови ребёнка, полученных в рамках неонатального скрининга, в исследовании.

Из бланка сухих пятен крови с помощью пинцета выбивалось 4 диска диаметром 3,2 мм, содержащих в среднем 3 мкл крови [11]. Образцы ДНК из сухих пятен крови выделены с использованием набора D-Blood (Биолабмикс) с модификациями: диски предварительно инкубировались при комнатной температуре в 1X PBS и 5mM 2-меркаптоэтанол в течение 30 минут. После получения ДНК добавляли 1 мкл 50 v/v глицерола и высушивали в концентраторе Concentrator plus (Eppendorf). К оставшемуся 1 мкл элюата добавляли 14 мкл 1X TE low EDTA буфера (СибЭнзим). Оценка количества ДНК проводилась на приборе Qubit 3 (Thermo), согласно протоколу производителя.

Этапы исследования: дизайн и синтез олигонуклеотидов, их проверка на специфичность и чувствительность *in silico* и *in vitro* с использованием контрольных ДНК. Заключительный этап разработки включал подбор оптимального протокола и формирование формул для расчета целевых молекул ДНК при использовании образцов сухих пятен крови. Всего было синтезировано 3 набора олигонуклеотидов для молекулы TREC, 5 – для KREC и 4 для участка гена *TRAC* (син. *TRA*, *TCRAC*), который не подвергается рекомбинации и может выступать в качестве референсного. Из них было отобрано по одному набору для каждого целевого фрагмента ДНК, отвечающего требованиям высокой специфичности, чувствительности, а также возможности их совместного мультиплексирования без сайд-эффектов, таких как off-target сигналы и кросс-димеризация.

Для одновременного измерения количества копий TREC, KREC и референсного гена *TRAC* методом цПЦП разработаны специфические праймеры и пробы (табл. 1). Олигонуклеотиды синтезированы в ДНК-Синтез (Россия). Цифровая ПЦП проводится в мультиплексной реакции с одновременным использованием трех пар олигонуклеотидов и зондов. Для четкой дискриминации получаемых капель на кластеры, соответствующие по содержанию целевого участка, в частности для TREC, использовался подход параллельно меченных проб, то есть в реакции использовалось эквимольное количество зонда для TREC, меченного двумя разными флуоресцирующими метками FAM и VIC (табл. 1). Данный подход позволяет получить два дополнительных кластера капель, содержащих молекулы ДНК TREC и TREC с *TRAC*. Конечная концентрация олигонуклеотидов составляет 900 нМ для каждого праймера и 250 нМ для каждой пробы.

Методика цПЦП выполнена на приборе QX200 Droplet Digital PCR System (BioRad) согласно протоколу производителя. Генерация капель проводилась с помощью реагентов Digital PCR Mastermix (RainSure) и Droplet Generation Oil (RainSure). Программа амплификации осуществлена, согласно рекомендациям производителя, на приборе CFX96 Touch (BioRad). Плазмида pGEM-TCRAC-sjTREC-sjKREC использовалась в качестве контроля для цПЦП [12]. Оценка результатов производилась в программе QuantaSoft software version 1.7.4 (BioRad). Для оценки количества копий TREC и KREC разработаны формулы (рис. 1). Количество копий целевой

молекулы ДНК (С) в 1 мл крови рассчитывается исходя из общего количества копий целевой молекулы ДНК, обнаруженной в 1 мкл ДНК (Target), объема выделенной ДНК в мкл, полученной из 1 мкл крови (bDNA) и умноженное на 1 мл (рис. 1.1). Общее количество копий целевой молекулы, обнаруженной в 1 мкл ДНК (Target) рассчитывается из разницы общего количества целевой молекулы ДНК, обнаруженной в 20 мкл реакционной смеси (хС) на количество мкл ДНК использованной в реакции цифровой ПЦП (iDNA). Объем выделенной ДНК в мкл, полученной из 1 мкл крови (bDNA) рассчитывается исходя из того факта, что диск диаметром 3,2 мм может впитывать в среднем до 3 мкл крови [11]. Таким образом, объем выделенной ДНК в мкл, полученной из 1 мкл крови (bDNA) рассчитывается из объема (мкл) использованного буфера для элюирования ДНК (tDNA), полученного из объема использованной крови в мкл, а именно 3 мкл крови на каждый панч (Р) (рис. 1.2). Расчет количества копий целевой молекулы ДНК на 1 ядросодержащую клетку (R) проводится стандартным путём, а именно отношением количества копий целевой молекулы ДНК к количеству копий референсного гена умноженным на диплоидный набор (2) хромосом нормальной клетки (рис. 1.3).

Результаты и обсуждение

Разработанная в настоящем исследовании методика (см. раздел Материалы и методы) оценки целевых молекул ДНК на основе цПЦП с помощью представленных

Таблица 1. Последовательность специфических праймеров и проб.

Table 1. Sequence of specific primers and probes.

Название	Последовательность (5'-3')	Tm (°C)
TREC_F	CTTTCAACCATGCTGACACC	56,4
TREC_R	CTTATTGCAACTCGTGAGAACG	58,7
TREC_FAM	FAM-TGAATGAAGAGCAGACAGGGCCC-BHQ1	66
TREC_HEX	HEX-TGAATGAAGAGCAGACAGGGCCC-BHQ1	66
KREC_F	TCTGTTCTCTTCCCTTAGTGG	59
KREC_R	CAGGAGCCAGCTCTTACC	56,9
KREC_FAM	FAM-TAGAGTTTCTGCACGGGCAGCA-BHQ1	64,8
TRAC_F	CCAGCTGAGAGACTCTAAATCC	59,1
TRAC_R	GTCTGTGATATACACATCAGAATCC	57
TRAC_HEX	HEX-AGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTCACCGA-BHQ1	66,4

Примечание: FAM и HEX – флуоресцирующие метки; BHQ1 – гаситель; Tm – температура плавления олигонуклеотида.

Note: FAM and HEX are fluorescent labels; BHQ1 is a quencher; Tm is the melting temperature of the oligonucleotide.

формул (см. рис. 1) позволяет оценить количество TREC и KREC на мкл крови, количество TREC и KREC относительно ядросодержащих клеток крови, а также соотношение TREC и KREC. Для проверки специфичности набора праймеров и проб использовались образцы ДНК культур индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) ICGi038-A, не содержащие TREC и KREC [13] и контрольная плаزمида pGEM-TCRAC-sjTREC-sjKREC [12]. По результатам проведенного тестирования специфичность составила 100% (рис. 2).

Для интерпретации и анализа результатов цПЦР по оценке целевых молекул ДНК у новорожденных использовалась схема по определению расположения и дискриминации кластеров капель при использовании мультиплексной цПЦР с тремя целевыми фрагментами ДНК (рис. 3).

Анализ целевых молекул ДНК методом цПЦР не предполагает построение стандартных кривых в отличие от ПЦР в режиме реального времени, однако су-

ществуют другие требования, которые применимы для анализа исключительно этим методом. Данные требования были разработаны первым производителем устройств для цПЦР компанией Bio-Rad и распространяются на все подобные устройства. Для исключения ложно-положительного результата необходимо наличие как минимум 3-х позитивных капель, и с той же целью принято, что при поиске редких мутаций или целевых молекул с низкой частотой необходимо наличие не менее 1500 копий референсного участка ДНК. При диплоидном наборе хромосом это будет соответствовать 750 клеткам, а предполагая минимум 3 позитивные капли по целевому фрагменту ДНК эксцизионных колец (ЭК), это будет соответствовать 1 ЭК на 250 клеток. Таким образом, данное соотношение является нижней границей детекции ЭК при низкой концентрации ДНК. При этом надо учитывать, что данное соотношение соответствует 400 ЭК на 100 тыс. ядросодержащих клеток.

$[1] \quad C = Target_{\mu l \text{ DNA}}^{copies} \times bDNA_{\mu l}^{blood} \times 1 \text{ ml}$	
$[2] \quad C = \left(\frac{x C_{rx}^{target}}{iDNA_{\mu l}} \times \frac{tDNA_{\mu l}^{total}}{3 \times P} \right) \times 1000$	
$[3] \quad R = \frac{x C_{rx}^{target} \times 2}{y C_{rx}^{TRAC}}$	$[4] \quad TK_{ratio} = \frac{t C_{rx}^{TREC}}{k C_{rx}^{KREC}}$

Рис. 1. Формулы оценки количества копий TREC и KREC методом цПЦР.

Примечание: 1 – формула расчета количества копий TREC или KREC на 1 мл крови (C), где Target – количество копий в 1 мкл ДНК, bDNA – количество ДНК, выделенной из 1 мкл крови; 2 – расширенная формула, где xC – общее количество копий TREC или KREC в реакции, iDNA – количество мкл ДНК, использованное в реакции dPCR, tDNA – объем ДНК в мкл, полученных при выделении из дисков, P – количество дисков диаметром 3,2 мм, использованных для выделения ДНК, цифра 3 – мкл крови, содержащейся в 3,2 мм диска; 3 – формула расчета количества копий TREC или KREC на единицу ядросодержащей клетки (R), где yC – количество копий TRAC в реакции; 4 – соотношение TREC и KREC (TKratio), где tC – общее количество копий TREC в реакции, а kC – KREC.

Fig. 1. Formulas for estimating the number of TREC and KREC copies using dPCR.

Note: 1 – formula for calculating the number of TREC or KREC copies per 1 ml of blood (C), where Target is the number of copies in 1 μl of DNA, bDNA is the amount of DNA isolated from 1 μl of blood; 2 – extended formula, where xC is the total number of TREC or KREC copies in the reaction, iDNA is the amount of μl of DNA used in the dPCR reaction, tDNA is the volume of DNA in μl obtained during isolation from disks, P is the number of 3.2 mm diameter disks used for DNA isolation, number 3 is μl of blood contained in a 3.2 mm disk; 3 – formula for calculating the number of TREC or KREC copies per unit of nucleated cell (R), where yC is the number of TRAC copies in the reaction; 4 – the ratio of TREC and KREC (TKratio), where tC is the total number of TREC copies in the reaction, and kC is KREC.

При высокой концентрации ДНК, наличии 20000 валидных капель (из них не более 18000 копий референсного гена и 3 копии целевой молекулы ДНК (TREC или KREC)) для обеспечения правильной оценки с использованием Пуассоновской статистики соотношение ЭК к ядросодержащим клеткам будет 1:3000, то есть 33 ЭК на 100 тыс. ядросодержащих клеток. Детектирующая способность ПЦР в режиме реального времени составляет 5000 ЭК на мл крови [7]. При использовании от 1 до 5 мкл образца ДНК при условии,

что 1 мкл ДНК был получен из 1 мкл крови, минимальная детектирующая способность (3 ЭК) цПЦР составляет от 600 до 3000 ЭК на мл крови. Соотношение объема ДНК и использованной крови не влияет на данную оценку, так как в формулу введена соответствующая поправка (рис. 1.1, 1.2).

Медиана детектированных копий TREC – 102 [Q0,25 68; Q0,75 228] и KREC – 46 [Q0,25 30; Q0,75 125] при использовании 1 мкл ДНК. Соотношение копий TREC/KREC составило 2,16. Отсюда, количе-

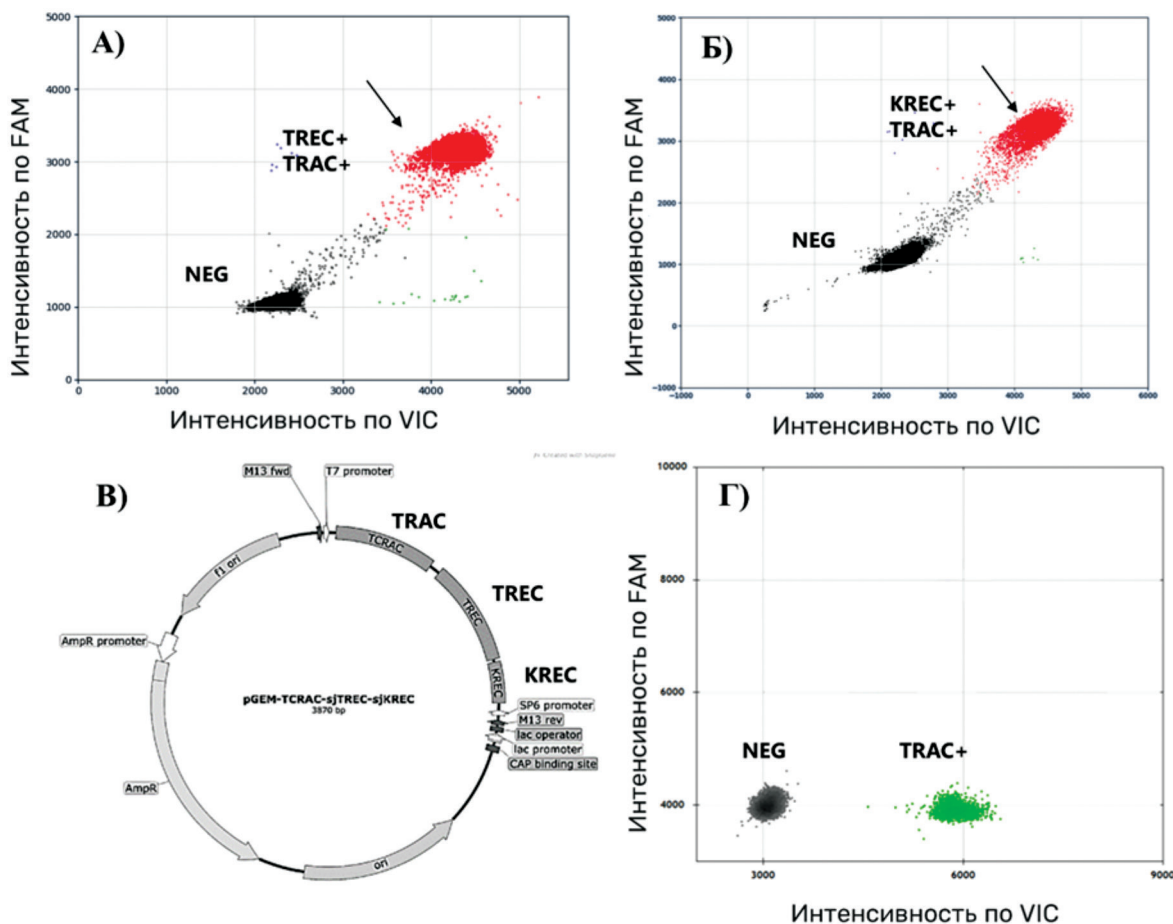


Рис. 2. Результаты кластерной дискриминации капель контрольных образцов. А) пример результата с использованием позитивной контрольной плазмиды pGEM-TCRAC-sjTREC-sjKREC для оценки одновременного содержания TREC и фрагмента TRAC в одной молекуле ДНК, Б) пример результата с использованием позитивной контрольной плазмиды pGEM-TCRAC-sjTREC-sjKREC для оценки одновременного содержания KREC и фрагмента TRAC в одной молекуле ДНК, В) схематическая структура контрольной плазмиды pGEM-TCRAC-sjTREC-sjKREC, Г) результат цПЦР с использованием культур ИПСК, не содержащих эксцизионные кольца.

Fig. 2. Results of cluster discrimination of droplets of control samples. А) example of the result using the positive control plasmid pGEM-TCRAC-sjTREC-sjKREC for the assessment of the simultaneous content of TREC and the TRAC fragment in one DNA molecule, Б) example of the result using the positive control plasmid pGEM-TCRAC-sjTREC-sjKREC for the assessment of the simultaneous content of KREC and the TRAC fragment in one DNA molecule, В) schematic structure of the control plasmid pGEM-TCRAC-sjTREC-sjKREC, Г) result of dPCR using iPSC cultures that do not contain excision rings

ство целевых молекул в мкл крови новорожденных составило в медиане 128 [Q0,25 85; Q0,75 285] копий для TREC и 57 [Q0,25 38; Q0,75 156] копий для KREC. Медиана количества референсного гена TRAC составила 16156 [Q0,25 10770; Q0,75 32379] копий в 1 мкл крови, следовательно, медиана клеток на 1 мкл крови составляла 8078 [Q0,25 5385; Q0,75 16189]. В целом, в экспериментальной выборке новорожденных медианные значения составили 1578 [Q0,10 703; Q0,90 7319] копий TREC и 711 [Q0,10 317; Q0,90 3297] копий KREC на 100 тыс. ядросодержащих клеток, что согласуется с литературными данными [14].

вила 8078 [Q0,25 5385; Q0,75 16189]. В целом, в экспериментальной выборке новорожденных медианные значения составили 1578 [Q0,10 703; Q0,90 7319] копий TREC и 711 [Q0,10 317; Q0,90 3297] копий KREC на 100 тыс. ядросодержащих клеток, что согласуется с литературными данными [14].

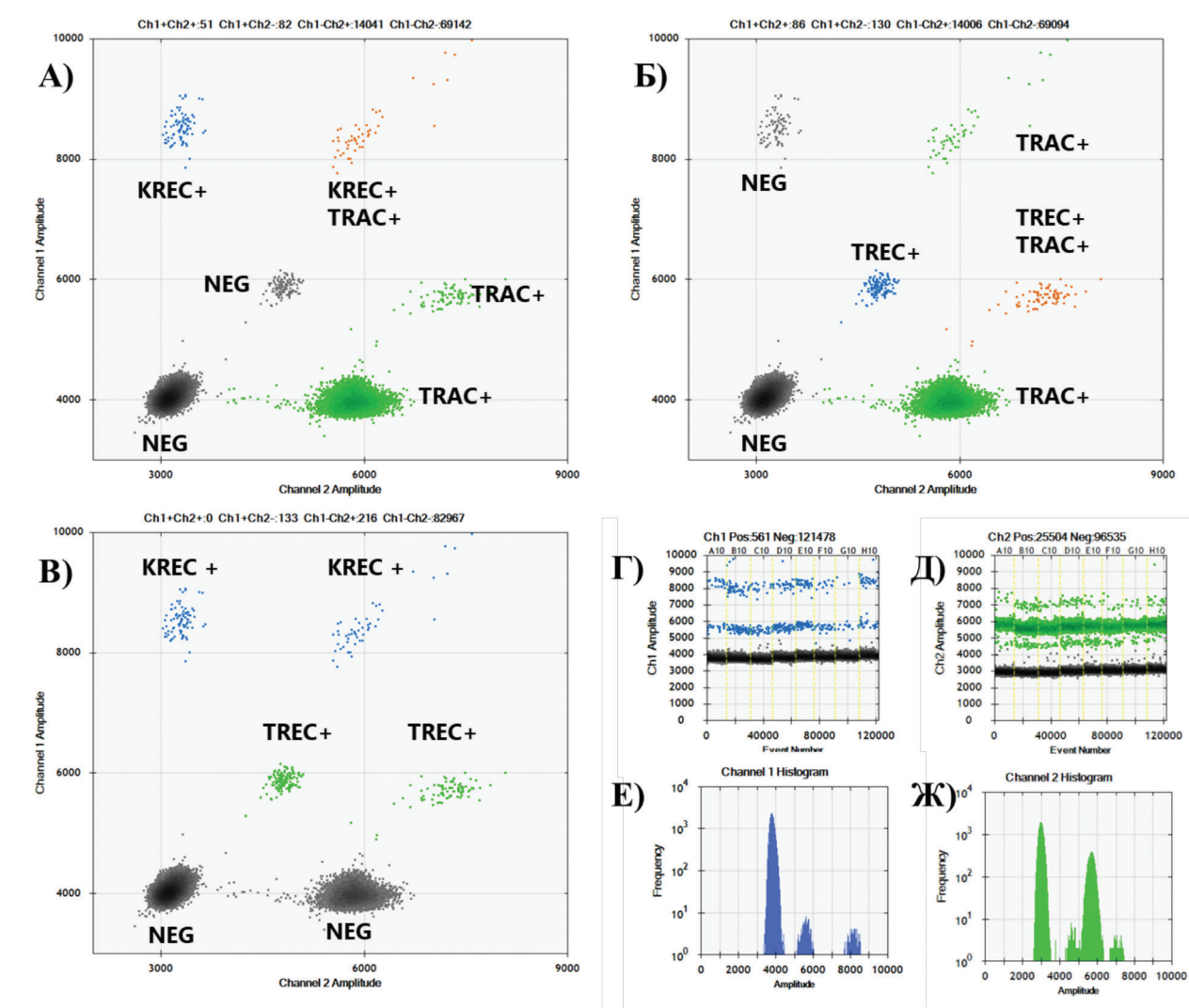


Рис. 3. Кластерная дискриминация капель, содержащих целевые молекулы по результатам цПЦР. а) кластерная дискриминация капель для абсолютной квантификации KREC и TRAC; б) кластерная дискриминация капель для абсолютной квантификации TREC и TRAC; в) кластерная дискриминация капель для оценки TKratio; г, е) гистограммы накопления по каналу FAM; д, ж) гистограммы накопления по каналу VIC/HEX.

Fig. 3. Cluster discrimination of droplets containing target molecules based on dPCR results. а) cluster discrimination of droplets for absolute quantification of KREC and TRAC; б) cluster discrimination of droplets for absolute quantification of TREC and TRAC; в) cluster discrimination of droplets for TKratio assessment; г, е) accumulation histograms for the FAM channel; д, ж) accumulation histograms for the VIC/HEX channel.

Ограничение интерпретации результатов

Данное исследование следует рассматривать с учетом ряда ограничений, и к результатам по оценке целевых молекул ДНК TREC и KREC у новорожденных следует относиться с осторожностью. Во-первых, было проведено одноцентровое ретроспективное исследование с использованием небольшого количества образцов, поэтому требуется дальнейшее многоцентровое изучение с большим размером выборки. Кроме того, показатели могут варьировать от метода к методу в широких диапазонах [15]. Для оценки количества копий целевых молекул ДНК был использован только один набор для выделения ДНК из сухих пятен крови, при этом возникла необходимость модифицировать протокол выделения ДНК из сухих пятен крови, рекомендованный производителем, в связи с низкой эффективностью выхода ДНК. Не исключается, что современные методы экстракции ДНК из сухих пятен крови потенциально могут улучшить эффективность предлагаемой методики [16]. Разработанная методика оценки целевых молекул ДНК с использованием цПЦР валидировалась только на положительных и отрицательных контрольных образцах, поэтому необходимо применить дополнительные методики, такие как сортировка клеток, чтобы сделать результаты более убедительными. Наконец, сроки забора материала согласно Приказу Министерства здравоохранения РФ от 21 апреля 2022 г. N 274н «Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи пациентам с врожденными и (или) наследственными заболеваниями» изменены, и в настоящее время забор материала осуществляется на 24–48 часы жизни доношенного новорожденного, в связи с чем нормальные показатели целевых молекул TREC и KREC необходимо рассмотреть относительно новых сроков забора материала.

Заключение

Разработанная методика количественной оценки TREC, KREC и TRAC методом цПЦР позволяет за один эксперимент оценить ряд показателей: количество молекул TREC и KREC на мкл крови, количество ядросодержащих клеток в образце ДНК, количество TREC и KREC относительно ядросодержащих клеток и соотношение TREC и KREC. Данные показатели являются абсолютными, так как цПЦР обеспечивает подсчет каждой молекулы целевой ДНК, что значительно повышает точность и применимость метода во многих областях, связанных оценкой иммун-

ного статуса. Требуется дальнейшая апробация методики на выборках большего объема для оценки фактических показателей TREC и KREC относительно ядросодержащих клеток с использованием предлагаемой методики.

Литература

- van Zelm M.C., Szczepanski T., van der Burg M. et al. Replication history of B lymphocytes reveals homeostatic proliferation and extensive antigen-induced B cell expansion. *J Exp Med.* 2007 Mar 19;204(3):645-655. doi: 10.1084/jem.20060964.
- Serana F., Chiarini M., Zanotti C. et al. 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. *J Transl Med.* 2013 May 9;11:119. doi: 10.1186/1479-5876-11-119.
- King J.R., Hammarström L. Newborn Screening for Primary Immunodeficiency Diseases: History, Current and Future Practice. *J Clin Immunol.* 2018 Jan;38(1):56-66. doi: 10.1007/s10875-017-0455-x.
- Drylewicz J., Vriskoop N., Mugwagwa T. et al. Reconstituting Longitudinal Naive T-Cell and TREC Dynamics during HIV-1 Infection. *PLoS One.* 2016 Mar 24;11(3):e0152513. doi: 10.1371/journal.pone.0152513.
- Törlén J., Gaballa A., Remberger M. et al. Effect of Graft-versus-Host Disease Prophylaxis Regimens on T and B Cell Reconstitution after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2019 Jun;25(6):1260-1268. doi: 10.1016/j.bbmt.2019.01.029.
- Barbaro M., Ohlsson A., Borte S. et al. Newborn Screening for Severe Primary Immunodeficiency Diseases in Sweden—a 2-Year Pilot TREC and KREC Screening Study. *J Clin Immunol.* 2017 Jan;37(1):51-60. doi: 10.1007/s10875-016-0347-5.
- 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;17(5):467-478. doi: 10.15789/1563-0625-2015-5-467-478.
- Черемохин Д.А., Шинвари Х., Дерябина С.С. и др. Анализ уровней TREC и KREC в образцах сухой крови новорожденных разного гестационного возраста и веса. *Acta Naturae.* 2022; 14 (1): 101-108. doi: 10.32607/actanaturae.11501.
- Huggett J.F., Cowen S., Foy C.A. Considerations for digital PCR as an accurate molecular diagnostic tool. *Clin Chem.* 2015 Jan;61(1):79-88. doi: 10.1373/clinchem.2014.221366.
- Hindson B.J., Ness K.D., Masquelier D.A. et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal Chem.* 2011 Nov 15;83(22):8604-10. doi: 10.1021/ac202028g.
- Hall E.M., Flores S.R., De Jesús V.R. Influence of Hematocrit and Total-Spot Volume on Performance Characteristics of Dried Blood Spots for Newborn Screening. *Int J Neonatal Screen.* 2015;1(2):69-78. doi: 10.3390/ijns1020069.
- Слепцов А.А., Медведев С.П., Назаренко М.С.; Томский НИМЦ. Рекомбинантная плазмидная ДНК pGEM-TCRAC-sjTREC-sjKREC, содержащая нуклеотидные последовательности локуса гена Т-лимфоцитарного α-рецептора и сигнальные фрагменты эксцизионных колец Т- и В-клеточного рецепторов. Патент №2807806 РФ. МПК C12Q 1/6809 C12N 15/70. № 2022132020; Заявл.08.12.22; Оpubл. 21.11.23., Бюл. № 33.

13. Zakharova I.S., Shevchenko A.I., Tmoyan N.A. et al. Induced pluripotent stem cell line ICGi038-A, obtained by reprogramming peripheral blood mononuclear cells from a patient with familial hypercholesterolemia due to compound heterozygous c.1246C>T/c.940+3_940+6del mutations in LDLR. *Stem Cell Res.* 2022 Apr;60:102702. doi: 10.1016/j.scr.2022.102702.
14. Седых А.В., Сайдгалина М.А., Останкова Ю.В., Тотолян А.А. Сравнительный анализ наборов реагентов для выделения ДНК из сухих пятен крови. *Медицинская иммунология.* 2023;25(6):1453-1462. doi: 10.15789/1563-0625-CAO-2895.
15. Vidal-Folch N., Milosevic D., Majumdar R. et al. A Droplet Digital PCR Method for Severe Combined Immunodeficiency Newborn Screening. *J Mol Diagn.* 2017 Sep;19(5):755-765. doi: 10.1016/j.jmoldx.2017.05.011.
8. Cheremokhin D.A., Shinwari K., Deryabina S.S., et al. Analiz urovney TREC i KREC v obraztsakh sukhoy krovi novorozhdennykh raznogo gestatsionnogo vozrasta i vesa [Analysis of the TREC and KREC Levels in the Dried Blood Spots of Healthy Newborns with Different Gestational Ages and Weights]. *Acta Naturae.* 2022;14 (1): 101-108. doi: 10.32607/actanaturae.11501 (In Russ.)
9. Huggett J.F., Cowen S., Foy C.A. Considerations for digital PCR as an accurate molecular diagnostic tool. *Clin Chem.* 2015 Jan;61(1):79-88. doi: 10.1373/clinchem.2014.221366.
10. Hindson B.J., Ness K.D., Masquelier D.A. et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal Chem.* 2011 Nov 15;83(22):8604-10. doi: 10.1021/ac202028g.
11. Hall E.M., Flores S.R., De Jesús V.R. Influence of Hematocrit and Total-Spot Volume on Performance Characteristics of Dried Blood Spots for Newborn Screening. *Int J Neonatal Screen.* 2015;1(2):69-78. doi: 10.3390/ijns1020069.
12. Sleptcov A.A., Medvedev S.P., Nazarenko M.S.; Tomsk National Research Medical Center. Rekombinantnaya plazmidnaya DNK pGEM-TCRAC-sjTREC- sjKREC, soderzhashchaya nukleotidnyye posledovatel'nosti lokusa gena T-limfotsitarnogo a-retseptora i signal'nyye fragmenty eksstizionnykh kolets T- i V-kletochnogo retseptorov [Recombinant plasmid DNA pGEM-TCRAC-sjTREC-sjKREC containing nucleotide sequences of the T-lymphocyte α -receptor gene locus and signal fragments of the excision rings of the T- and B-cell receptors]. Patent No. 2807806 of the Russian Federation. IPC C12Q 1/6809 C12N 15/70. No. 2022132020; Claimed 08.12.22; Published 21.11.23., Bulletin No. 33. (In Russ.)
13. Zakharova I.S., Shevchenko A.I., Tmoyan N.A. et al. Induced pluripotent stem cell line ICGi038-A, obtained by reprogramming peripheral blood mononuclear cells from a patient with familial hypercholesterolemia due to compound heterozygous c.1246C>T/c.940+3_940+6del mutations in LDLR. *Stem Cell Res.* 2022 Apr;60:102702. doi: 10.1016/j.scr.2022.102702.
14. Sedykh A.V., Saitgalina M.A., Ostankova Yu.V., Totolian A.A. Sravnitel'nyy analiz naborov reagentov dlya vydeleniya DNK iz sukhikh pyaten krovi [Comparative analysis of reagent kits for DNA extraction from dry blood stains]. *Meditsinskaya immunologiya [Medical Immunology (Russia)].* 2023;25(6):1453-1462. (In Russ.) <https://doi.org/10.15789/1563-0625-CAO-2895>
15. Vidal-Folch N., Milosevic D., Majumdar R. et al. A Droplet Digital PCR Method for Severe Combined Immunodeficiency Newborn Screening. *J Mol Diagn.* 2017 Sep;19(5):755-765. doi: 10.1016/j.jmoldx.2017.05.011.

References

1. van Zelm M.C., Szczepanski T., van der Burg M. et al. Replication history of B lymphocytes reveals homeostatic proliferation and extensive antigen-induced B cell expansion. *J Exp Med.* 2007 Mar 19;204(3):645-655. doi: 10.1084/jem.20060964.
2. Serana F., Chiarini M., Zanotti C. et al. 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. *J Transl Med.* 2013 May 9;11:119. doi: 10.1186/1479-5876-11-119.
3. King J.R., Hammarström L. Newborn Screening for Primary Immunodeficiency Diseases: History, Current and Future Practice. *J Clin Immunol.* 2018 Jan;38(1):56-66. doi: 10.1007/s10875-017-0455-x.
4. Drylewicz J., Vriskoop N., Mugwagwa T. et al. Reconciling Longitudinal Naive T-Cell and TREC Dynamics during HIV-1 Infection. *PLoS One.* 2016 Mar 24;11(3):e0152513. doi: 10.1371/journal.pone.0152513.
5. Törlén J., Gaballa A., Remberger M. et al. Effect of Graft-versus-Host Disease Prophylaxis Regimens on T and B Cell Reconstitution after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2019 Jun;25(6):1260-1268. doi: 10.1016/j.bbmt.2019.01.029.
6. Barbaro M., Ohlsson A., Borte S. et al. Newborn Screening for Severe Primary Immunodeficiency Diseases in Sweden—a 2-Year Pilot TREC and KREC Screening Study. *J Clin Immunol.* 2017 Jan;37(1):51-60. doi: 10.1007/s10875-016-0347-5.
7. Gordukova M.A., Oskorbin I.P., Mishukova O.V., et al. Razrabotka nabora reagentov dlya kolichestvennogo opredeleniya molekul DNK TREC i KREC v tsel'noy krovi i sukhikh pyatnakh krovi metodom mul'tipleksnoy PTSR v rezhime real'nogo vremeni [Development of real-time multiplex PCR for the quantitative determination of