

САЙТГАЛИНА
Мария Александровна

**ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ПАЦИЕНТОВ
ПРИ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЯХ С ПОМОЩЬЮ
КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОЛЕКУЛ ТРЕС И КРЕС
В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ**

3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика

3.2.7. Иммунология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в федеральном бюджетном учреждении науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научные руководители:

доктор медицинских наук профессор, академик РАН **Тотолян Арег Артемович**

кандидат биологических наук **Останкова Юлия Владимировна**

Официальные оппоненты:

Свитич Оксана Анатольевна - доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, директор;

Серебряная Наталья Борисовна - доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, лаборатория общей иммунологии, отдела иммунологии, заведующая.

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации

Защита состоится «18» июня 2024 года в 11:00 часов на заседании диссертационного совета 04.1.001.01 на базе федерального государственного бюджетного учреждения «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России (194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 4/2)

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

Автореферат разослан « » _____ 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат медицинских наук, доцент

Санников Максим Валерьевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Изучение показателей иммунитета при иммунных нарушениях включает исследования количества и функциональной активности основных компонентов иммунной системы. Совокупность количественных и функциональных показателей, отражающих состояния иммунной системы человека в данный момент времени, определяют как иммунный статус. (Зайцева Е.В. и др., 2020, Amaya-Uribe L. et al., 2019, Seidel M.G. et al., 2019)

Первичные иммунодефициты (ПИД) обусловлены генетическими дефектами, в то время как вторичные могут быть следствием развития заболевания, вызванного инфекцией вирусной или другой природы, а также могут быть связаны с применением лекарственных препаратов, с трансплантацией органов или стволовых клеток (Kazer S.W. et al., 2020, Mehta P. et al., 2020, Notarangelo L.D. et al., 2020, Tuano K.S. et al., 2021).

подавляющее большинство пациентов, страдающих иммунодефицитами, имеют нарушения в функционировании Т- и В-клеточного компартмента (Мухина А.А. и др., 2019, Jafarzadeh A. et al., 2021, Yang J. et al., 2021). Наиболее тяжелые проявления иммунодефицитных состояний наблюдают при ранней остановке дифференцировки предшественников лимфоцитов (King J.R. et al., 2018) **Ошибка! Источник ссылки не найден.** Раннее начало лечения способствует минимизации и предотвращению негативных последствий (Зайцева Е.В. и др., 2020, Notarangelo L.D et al., 2020).

В процессе созревания Т- и В- лимфоцитов формируются стабильные кольцевые ДНК-молекулы - эксцизионные кольца TREC и KREC, соответственно, которые являются суррогатными маркерами функциональной активности тимуса и костного мозга (King J.R. et al., 2018, Tessitore M.V. et al., 2017).

Методы, применяемые для определения дефектов Т- и В-клеточного звена иммунитета, такие как проточная цитометрия, мультиплексный анализ цитокинов, анализ экспрессии генов, секвенирование, моделирование межклеточного взаимодействия *in silico*, имеют ограниченное применение в клинической практике во многих регионах ввиду сложности и большой стоимости исполнения анализа, а также нехватки специалистов узкой специализации (Мухина А.А. и др., 2019, Heimall J.R et al., 2018, Seidel M.G et al., 2019).

Одним из методов диагностики Т- и В-клеточных иммунодефицитов является количественная оценка эксцизионных колец TREC и KREC в периферической крови с применением Real-time ПЦР (Kwok J.S.Y. et al., 2020, Profaiser T. et al., 2020, Yaz et al., 2020). Доступные на российском рынке наборы для количественного определения уровней молекул TREC и KREC в периферической крови имеют ряд ограничений. Все они направлены на диагностику иммунодефицитных состояний у новорожденных и детей, в то время как взрослая часть населения остается не охваченной. Кроме того,

существующие тест-системы направлены на выявление нарушений, опосредованных врожденными ошибками иммунитета, и не валидированы для диагностики иммунодефицитов, вызванных инфекционными процессами (Гордукова М.А. и др., 2015). Вышесказанное обуславливает актуальность количественной оценки уровней молекул TREC и KREC в периферической крови взрослых и детей с целью диагностики иммунодефицитных состояний, вызванных, в том числе, вирусными инфекциями, что отражено в теме исследования.

Степень разработанности темы

В настоящее время определение уровней TREC и KREC в периферической крови используют в разных странах мира как для скрининга первичных иммунодефицитов среди новорожденных, так и для диагностики нарушений, связанных с дефектами созревания Т- и В-лимфоцитов, у детей подростков и взрослых пациентов (Зайцева Е.В. и др., 2020, Мухина А.А. и др., 2019, Amaya-Uribe L. et al., 2019, Heimall J.R. et al., 2018, King J.R. et al., 2018, Kwok J.S.Y. et al., 2020, Profaizer T. et al., 2020, Yaz I. et al., 2020). Кроме того, анализ уровней TREC и KREC применяют для оценки функционирования иммунной системы после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, для изучения и оценки эффективности антиретровирусной терапии при ВИЧ-инфекции, а также терапии лимфопролиферативных заболеваний (King J.R. et al., 2018, Sánchez-Ramón S. et al., 2019). За последние несколько лет некоторые исследования были посвящены количественному анализу молекул TREC и KREC у COVID-инфицированных больных, однако, главным ограничением этих работ, по мнению самих авторов, является небольшой объем выборки пациентов, не охватывающий все возрастные группы населения (Khadzhieva M.B. et al., 2021)**Ошибка! Источник ссылки не найден.**

На сегодняшний день на российском рынке зарегистрированы две диагностические тест-системы для количественного определения эксцизионных колец TREC и KREC в периферической крови. Одной из них является набор реагентов для проведения ПЦР-анализа «НеоСкрин SMA/TREC/KREC» (РУ № РЗН 2022/17512 от 08.06.2022, «ДНК-технология», Москва), другой – ПЦР-система «ИММУНО-БИТ» (РУ № РЗН 2021/15873 от 29.11.2021, «АБВ-Тест», Москва). Также для количественной оценки TREC/KREC доступен набор реагентов «EnLite™ TREC-KREC kit» (PerkinElmer, Финляндия), который не зарегистрирован на территории России как медицинское изделие, но может применяться для научных исследований. Все доступные на российском рынке ПЦР-наборы для анализа уровней TREC/KREC в периферической крови используют один ген внутреннего контроля для нормирования количественных результатов. Как известно, не существует идеального нормировочного гена, постоянного в независимости от ткани и состояния клеток в анализируемом образце, оптимальным можно считать подход с одновременным использованием двух и более нормировочных генов (Kwok J.S.Y. et al., 2020).

Стоит отметить, что нам не удалось найти ни одного исследования, посвященного описанию референтных интервалов уровней TREC и KREC в периферической крови для разных возрастных групп населения на территории России, в то время как количественное содержание этих молекул может определяться этнической принадлежностью индивидуума, как было показано на популяции жителей Гонконга в исследовании J.S.Y Kwok и соавторов в 2020 году (Kwok J.S.Y. et al., 2020).

Цель исследования: оценить состояние иммунной системы взрослых лиц при острых и хронических вирусных инфекциях для прогноза тяжести течения и исхода заболеваний на основе разработанной тест-системы для количественного определения ДНК-молекул TREC и KREC в периферической крови.

Задачи исследования:

1. Разработать тест-систему для определения уровней молекул TREC и KREC в периферической крови у взрослых и детей на основе технологии ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени;
2. Определить основные аналитические и диагностические характеристики разработанной тест-системы;
3. Определить референтные интервалы содержания молекул TREC и KREC в периферической крови у людей разных возрастных групп;
4. Оценить уровни молекул TREC и KREC в крови ВИЧ-инфицированных лиц с разным уровнем вирусной нагрузки и применяемой терапией;
5. Оценить уровни молекул TREC и KREC в крови больных с инфекцией COVID-19 при разной степени тяжести состояния и разным исходом заболевания.

Научная новизна

Разработана оригинальная тест-система для количественной оценки ДНК-молекул TREC и KREC в периферической крови у взрослых и детей с детекцией результатов в режиме реального времени.

Впервые в тест-системе для количественной оценки ДНК-молекул TREC и KREC методом ПЦР в режиме реального времени использованы два гена «домашнего хозяйства» в качестве внутреннего контроля.

Впервые определены референтные интервалы содержания эксцизионных колец TREC и KREC в периферической крови в шести возрастных группах взрослого населения Санкт-Петербурга.

Впервые валидирована и апробирована тест-система для количественной оценки ДНК-молекул TREC и KREC в периферической крови у лиц с острой и хронической вирусной инфекцией.

Впервые проведена валидация ПЦР-анализа уровней TREC и KREC для прогноза тяжести течения и исхода заболевания в острый период у больных COVID-19, а также для оценки наличия/выраженности иммунодефицитного состояния у пациентов с хронической инфекцией (ВИЧ-

инфекцией) в зависимости от сроков с момента инфицирования, вирусной нагрузки, эффективности применяемой антиретровирусной терапии.

Впервые доказана прогностическая значимость оценки уровней TREC и KREC для определения тяжести течения и исхода инфекционных заболеваний.

Теоретическая и практическая значимость

Доказана отрицательная корреляция уровней молекул TREC в периферической крови с увеличением возраста человека, и отсутствие такой корреляции для уровней молекул KREC.

Определены референтные интервалы уровней молекул TREC и KREC в периферической крови у людей разных возрастных категорий.

Доказано достоверное снижение уровней молекул TREC и KREC у ВИЧ-инфицированных пациентов с длительным сроком с момента инфицирования, высокой вирусной нагрузкой, неэффективностью применяемой антиретровирусной терапии.

Доказано достоверное снижение уровней молекул TREC и KREC у тяжелых больных с новой коронавирусной инфекцией COVID-19.

Доказано достоверное снижение уровней молекул KREC у пациентов с новой коронавирусной инфекцией COVID-19 с летальным исходом по сравнению с выжившими больными.

Полученные результаты дают новые представления о механизмах инфекционного процесса при острых и хронических вирусных заболеваниях, а также свидетельствуют о прогностической значимости определения уровней TREC и KREC для определения тяжести течения и исхода инфекционных заболеваний.

Разработанная тест-система может быть использована для выявления нарушений в функционировании Т- и В-клеточного звеньев иммунитета с целью мониторинга эффективности применяемой антиретровирусной терапии у ВИЧ-инфицированных лиц; для прогноза тяжести течения и исхода заболевания в острый период у больных COVID-19.

Разработанная тест-система внедрена в качестве медицинского изделия «Набор реагентов для количественного определения эксцизионных колец TREC и KREC методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени (TREC/KREC-Amp PS)» с регистрационным удостоверением № МИ-RUBY-000031 на территории Российской Федерации и Республики Беларусь.

Положения, выносимые на защиту:

1) Разработана тест-система для определения уровней молекул TREC и KREC в периферической крови у взрослых и детей на основе технологии ПЦР в режиме реального времени. Проведена широкомасштабная валидация разработанного ПЦР-метода: показано влияние ошибок преаналитического этапа на получение валидных результатов, определены референтные интервалы содержания молекул TREC и KREC в периферической крови для разных возрастных групп населения,

показана диагностическая значимость метода для больных с установленным диагнозом первичный иммунодефицит;

2) Иммунодефицитные состояния у ВИЧ-инфицированных пациентов с высокой вирусной нагрузкой и вирусологической неэффективностью применяемой антиретровирусной терапии затрагивают Т- и В-лимфоцитарные звенья, что проявляется достоверно сниженными уровнями показателей TREC и KREC;

3) При COVID-19 оценка Т- и В-лимфоцитарных звеньев иммунной системы имеет диагностическую и прогностическую значимость: показана диагностическая значимость сниженных уровней TREC и KREC при тяжелой форме заболевания у лиц старше 30 лет; показана прогностическая значимость сниженного уровня показателя KREC для оценки исхода заболевания.

Методология исследования

Исследовательская работа проводилась с соблюдением всех правил научных исследований и основывалась на принципах биоэтики. Теоретическая основа работы состояла в анализе фундаментальных и прикладных исследований. Для реализации цели и задач научной работы были применены стандартные молекулярно-биологические, иммунологические и вирусологические методы, а также разработан оригинальный метод на основе Real-time ПЦР для количественной оценки уровней TREC и KREC в периферической крови. Выполнен сбор и систематизация материалов исследования, проведен статистический анализ данных, позволяющий сделать обоснованные выводы.

Соответствие диссертации паспортам научных специальностей

Соответствие диссертации паспорту научной специальности 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика. Основные научные положения диссертации соответствуют п.1, п.2, п.3, п.9, п.11, п.12 паспорта специальности 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности 3.2.7. Иммунология. Основные научные положения диссертации соответствуют п.3, п.5, п.6, п.9. паспорта специальности 3.2.7. Иммунология.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Достоверность полученных результатов исследований, проведенных автором, обеспечена репрезентативным объемом выборок обследованных пациентов (всего 7851 человек), достаточным количеством выполненных тестов с применением современных лабораторных методов и статистическим анализом полученных данных.

Материалы диссертации доложены и обсуждены на Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых с международным участием «Фундаментальные исследования в педиатрии» (Санкт-Петербург, 2021г.); Международной научно-практической конференции «Современные технологии в медицинском образовании», посвященной 100-летию Белорусского государственного медицинского университета (Минск, 2021г.);

Шестом российском конгрессе с международным участием "Молекулярные основы клинической медицины - возможное и реальное" (Санкт-Петербург, 2022г.); XII всероссийском ежегодном конгрессе «Инфекционные болезни у детей: диагностика, лечение и профилактика» (Санкт-Петербург, 2022г.); Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых с международным участием «VI Дальневосточный медицинский молодежный форум» (Хабаровск, 2022г.); Международной научно-практической конференции «Новое в диагностике, лечении и профилактике социально значимых инфекций» (Уфа, 2022г.); VII международной научно-практической конференции Прикаспийских государств «Актуальные вопросы современной медицины» (Астрахань, 2022г.); Конференции молодых ученых «Новости инфектологии, микробиологии и биотехнологии 2022», посвященной памяти и 90-летию со дня рождения Рахмановой Азы Гасановны (Санкт-Петербург, 2022); Российской научно-практической конференция «Управляемые и другие социально значимые инфекции: диагностика, лечение и профилактика» (Санкт-Петербург, 2023); XVII Всероссийском научном форуме с международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, 2023).

Личный вклад автора

Планирование темы, определение целей и задач исследования выполнено автором совместно с научными руководителями. Разработка метода количественной оценки кольцевых ДНК-молекул TREC и KREC в периферической крови на основе технологии ПЦР в режиме реального времени, проведение валидации метода для оценки иммунного статуса при инфекционных заболеваниях вирусной этиологии, выполнение лабораторных исследований, статистической обработки и анализа полученных результатов выполнено автором лично совместно с к.б.н. Останковой Ю.В.; в работе по оценке влияния ошибок преаналитического этапа на количественный результат анализа TREC/KREC совместно с автором участвовала м.н.с. лаборатории иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Седых Анна Васильевна. Работа по фенотипированию клеток периферической крови выполнена совместно с м.н.с. лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Коробовой Зоей Романовной. Автором написан текст диссертации и автореферата.

Реализация результатов работы

Получен патент на изобретение: Останкова Ю.В., Сайтгалина М.А., Любимова Н.Е., Тотолян А.А. «Способ лабораторной персонифицированной диагностики состояния иммунитета пациентов и набор олигодезоксирибонуклеотидных праймеров, и флуоресцентно меченых зондов, и стандартных образцов». Пат. 2786211 с1, 19.12.2022.,

заявка № 2022107106 от 17.03.2022. Патентообладатель Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера».

На основании представленного метода разработано медицинское изделие «Набор реагентов для количественного определения эксцизионных колец TREC и KREC методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени (TREC/KREC-Amp PS)», получено регистрационное удостоверение № МИ-RUBY-000031 от 11 января 2023 г.

Разработанный метод лабораторной оценки состояния иммунитета используется в практической и научно-исследовательской работе ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера».

Результаты настоящего исследования используются в учебном процессе кафедры иммунологии ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова».

В результате проведенного исследования подготовлен проект методических рекомендаций «Применение метода полимеразной цепной реакции для выявления первичных иммунодефицитов в целях прогноза и профилактики инфекционных осложнений» МР 3.3. -24 (на стадии утверждения).

Публикации результатов исследования

По теме диссертации опубликованы 22 печатные работы, в том числе 7 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 146 страницах, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, 3 глав результатов собственных исследований, обсуждения результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, включающего 107 источников, в том числе 18 отечественных и 89 зарубежных. Текст содержит 27 таблиц и 54 рисунка.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы. Материалом исследования служили образцы биологического материала, полученные от 7851 человека в ходе выполнения плановых или рутинных работ в медучреждениях Санкт-Петербурга, переданные в лабораторию молекулярной иммунологии ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера». Характеристика групп обследованных лиц представлена в таблице 1 и составлена согласно предварительному диагнозу лечащих врачей и/или сопроводительному описанию медучреждений, предоставивших биологический материал.

При работе с цельной кровью экстракцию геномной ДНК осуществляли из лейкоцитарных клеток с помощью комплектов реагентов «РИБО-преп» (ЦНИИ Эпидемиологии, Москва) согласно инструкции производителя. Экстракцию тотальной ДНК из сухих капель крови

проводили с использованием набора «Экстра-ДНК-Био» («Алкор-Био», Санкт-Петербург), согласно инструкции производителя.

Таблица 1. Объем обследованного материала.

Характеристика групп	Кол-во человек
Образцы сухих капель крови условно здоровых новорожденных	5219
Образцы пуповинной крови условно здоровых новорожденных	157
Образцы сухих капель крови условно здоровых лиц старше 18 лет	300
Образцы цельной крови условно здоровых лиц старше 18 лет	1017
Образцы крови пациентов с ПИД	30
Образцы цельной крови ВИЧ-инфицированных лиц	100
Образцы цельной крови пациентов с диагнозом COVID-19	1028
ВСЕГО	7851

С каждым образцом ДНК проводили ПЦР в режиме реального времени для количественной оценки содержания молекул TREC и KREC.

Для фенотипирования клеток периферической крови больных, инфицированных SARS-CoV-2 и ВИЧ, использовали метод многоцветной проточной цитометрии.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prizm 5, StatTech и Microsoft Excel 2010. Нормальность распределения полученных числовых данных проверяли с помощью двух критериев: Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка. Корреляционный анализ проводили с расчетом коэффициентов Спирмена, значение которых оценивали по шкале Чеддока. Для оценки статистически значимых различий между отдельными выборками применяли критерии Манна-Уитни, Краскела-Уоллиса, тест Данна, а также ROC-анализ с вычислением значения параметра AUC (Area Under the Curve).

Референтные интервалы (РИ) содержания молекул TREC и KREC в периферической крови рассчитывали непараметрическим методом, согласно рекомендациям Международной федерации клинической химии (International Federation of Clinical Chemistry - IFCC) и Государственного стандарта (ГОСТ) Р 53022.3-2008

Оценку влияния наиболее распространенных ошибок пробоподготовки при работе с сухими каплями крови на количественный результат ПЦР-анализа TREC/KREC проводили, анализируя 100 отобранных карт Гатри. Были выбраны карты Гатри с образцами крови, полученными от здоровых доношенных новорожденных, где одно пятно крови было нанесено корректно, в то время как другое пятно того же образца крови явно содержало признаки неправильного нанесения или высушивания образца.

Оценку диагностической значимости разработанного ПЦР-метода проводили с вычислением параметров диагностической чувствительности (Se) и диагностической специфичности (Sp) теста, показателей позитивной прогностической ценности (PPV) и негативной прогностической ценности (NPV), величину распространенности заболевания среди обследуемой выборки ($Prev$) и контр-распространенности ($coPrev$), а также отношения

правдоподобий для положительных ($LR+$) и для отрицательных ($LR-$) результатов.

Результаты собственных исследований

Разработка метода количественного анализа ДНК-фрагментов TREC и KREC в периферической крови на основе ПЦР в режиме реального

Для проведения ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени были подобраны олигонуклеотидные праймеры к структурам TREC и KREC таким образом, чтобы они фланкировали последовательность δ TREC- ψ Ja и intronRSS-Kde, соответственно, а также к фрагментам нормировочных генов: гена фермента гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы человека (HPRT) и гена белковой субъединицы р30 рибонуклеазы Р (RPP30). В пробе ДНК одновременно амплифицировали четыре генетических фрагмента: два целевых фрагмента TREC, KREC и два фрагмента нормировочных генов.

Для детекции результатов ПЦР использовали зонды TaqMan. По каналу детекции FAM регистрировали накопление ДНК-фрагмента TREC, по каналу детекции HEX регистрировали накопление ДНК-фрагмента KREC, по каналу Су5 - накопление фрагмента HPRT, по каналу ROX – фрагмента RPP30.

Для количественных расчетов в каждом запуске ПЦР амплифицировали пять калибраторов, представляющих собой серию десятикратных разведений плазмидной ДНК ($1-9 \cdot 10^8 - 10^4$ копий/мл), содержащей вставки нуклеотидных последовательностей двух целевых анализов и двух нормировочных генов. По результатам амплификации калибраторов выстраивали стандартные калибровочные кривые с помощью ПО амплификатора.

Описание аналитических характеристик модифицированного метода

Аналитическую чувствительность разработанного метода оценивали исходя из предела обнаружения и аналитического диапазона измерений концентраций ДНК TREC/KREC. Предел обнаружения метода составил 10^3 копий ДНК TREC/KREC на 1 мл анализируемого образца. Аналитический диапазон измерений ДНК TREC/KREC - от 10^3 до 10^8 копий/мл. Аналитическая чувствительность разработанного ПЦР-метода составила 10^3 копий ДНК TREC/KREC на 1 мл анализируемого образца. Линейность измерений наблюдали в интервале концентраций целевых фрагментов ДНК: от $1,29 \cdot 10^3$ до $8,49 \cdot 10^8$ копий/мл. При оценке точности измерений в 8 повторах с использованием разных амплификаторов, точность измерений на приборе планшетного типа («CFX96») составила 97,73 %, а на приборе роторного типа («Rotor-Gene 3000») - 96,22 %, что соответствует нормативным требованиям (90 – 110 %). Коэффициенты вариации измерений при испытаниях воспроизводимости при использовании разных амплификаторов не превышали 8 %.

Определение границ нормы уровней ДНК-молекул TREC и KREC в периферической крови

При определении границ нормы содержания целевых аналитов TREC и KREC в периферической крови взрослых людей добровольцы были разделены на шесть возрастных групп: 18-29 лет (n=120), 30-39 лет (n=118), 40-49 лет (n=132), 50-59 лет (n=135), 60-69 лет (n=111), и лица старше 70 лет (n=101). Была установлена достоверная отрицательная значимая зависимость ($r = -0,80$, P-value < 0,0001) концентрации молекул TREC в образцах крови от возраста участников исследования (Рисунок 1.А.). Парное сравнение возрастных групп позволило выявить достоверные различия в количественном содержании молекул TREC в образцах между разными возрастными группами (Рисунок 1.Б.).

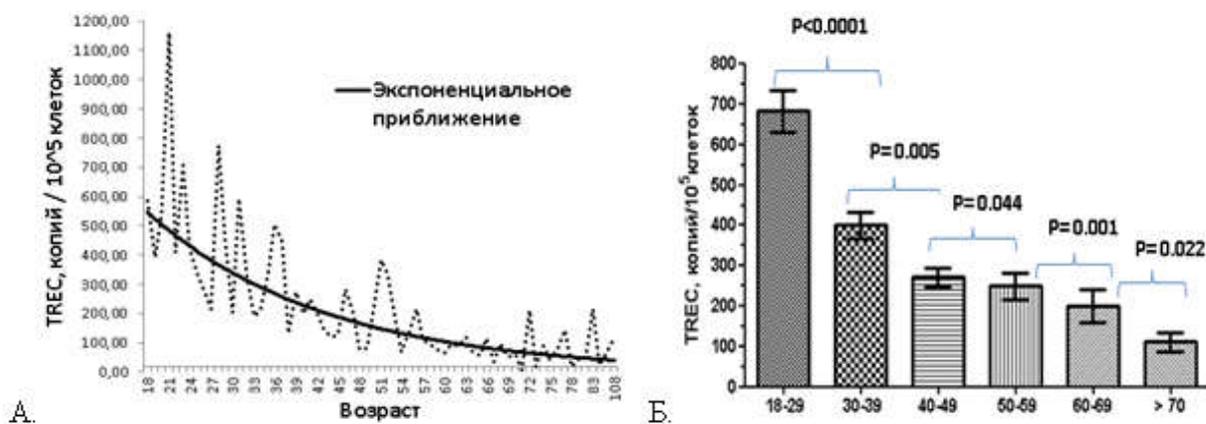


Рисунок 1. А. Обратная зависимость концентрации молекул TREC в образцах крови от возраста представителей популяции. Б. Диаграмма количественного содержания молекул TREC в образцах разных возрастных групп

Корреляционная зависимость содержания молекул KREC в образцах крови от возраста не установлена (Рисунок 2.А.). Статистически значимые различия между возрастными группами по параметру KREC не выявлены (Рисунок 2.Б.).

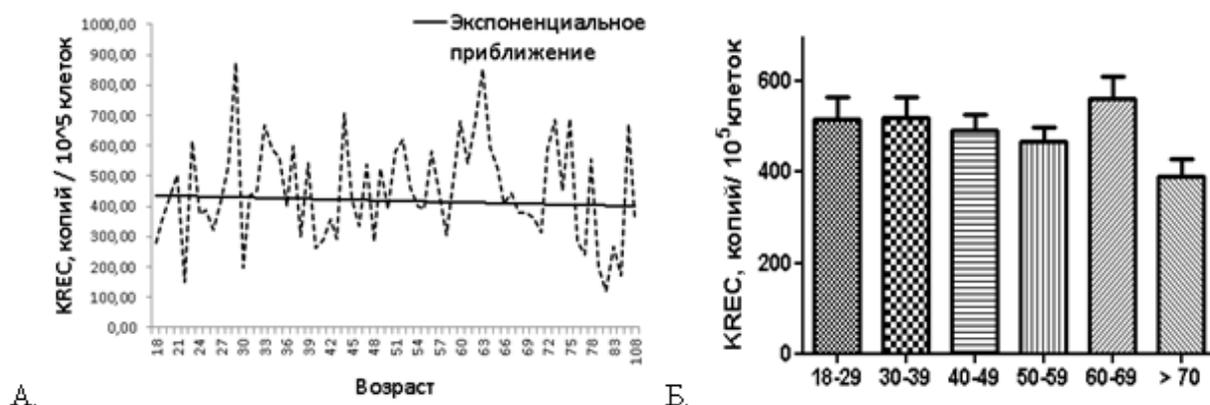


Рисунок 2. А. Зависимость концентрации молекул KREC в образцах крови от возраста представителей популяции. Б. Диаграмма количественного содержания молекул KREC в образцах разных возрастных групп

Границы нормы содержания анализатора TREC в периферической крови были установлены для каждой возрастной группы (Таблица 2).

Таблица 2. Референтные интервалы уровней молекул TREC в периферической крови для исследованных возрастных групп (значения указаны в копиях TREC на 10^5 клеток)

	18-29 лет	30-39 лет	40-49 лет	50-59 лет	60-69 лет	>70 лет
Медиана	553,30	252,70	191,30	131,10	74,87	44,71
Нижняя граница	44,91	23,60	18,27	13,98	12,54	11,43
Верхняя граница	2135,00	1597,00	1098,00	1543,00	1715,00	683,10

Для параметра KREC рассчитан единый референтный интервал для людей старше 18 лет: 49,90 – 1478,00 копий/ 10^5 клеток (медиана 385,7 копий/ 10^5 клеток).

В ходе работы были определены нижние границы норм содержания в крови TREC и KREC у здоровых доношенных новорожденных. Нижняя граница неонатальной нормы уровней TREC составила 892,6 копий/ 10^5 клеток, уровней KREC – 400,4 копий/ 10^5 клеток.

Достоверных различий уровней TREC и KREC в крови в зависимости от пола, как среди новорожденных, так и среди взрослых лиц в рамках возрастных групп не выявлено.

Особенности преаналитического этапа при количественном определении TREC/KREC в периферической крови

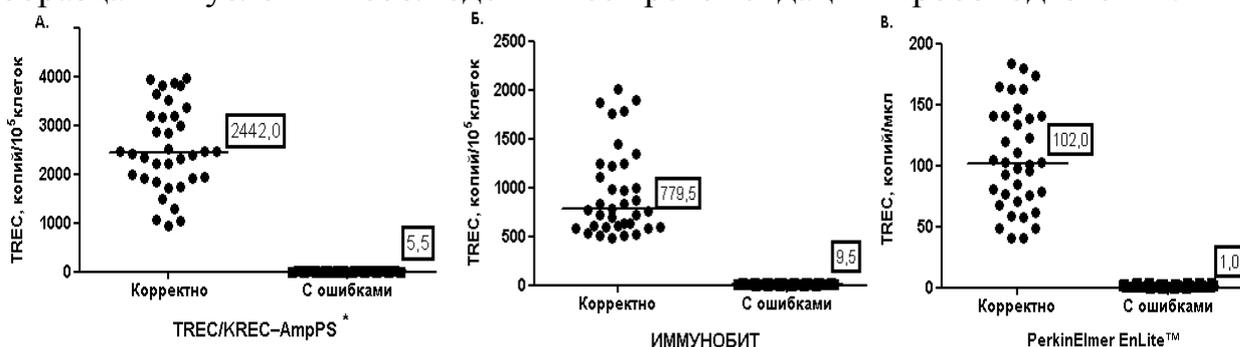
Среди ошибок подготовки сухих капель крови встречалось неполное заполнение кровью обозначенной окружности, неоднородная или недостаточная пропитка фильтра, многослойное нанесение крови на бланк, а также точечное нанесение капель дозатором, царапины и иные повреждения бумажного фильтра. Кроме того, некоторые карты содержали признаки неполного высушивания образца перед хранением и транспортировкой.

При параллельном анализе образцов, представленных двумя пятнами крови, одно из которых нанесено некорректно, были установлены достоверные различия между получаемыми результатами. На рисунке 3 представлена сравнительная оценка уровней TREC, рассчитанных для одних и тех же образцов крови новорожденных, нанесенных на карты Гатри с соблюдением протокола взятия биоматериала (корректно) и с допущением ошибок.

Во всех случаях уровень молекул TREC, определенный в образцах крови, взятых с нарушениями рекомендаций, был достоверно ниже рассчитанного в корректно взятых образцах ($p < 0,0001$), и был близок к нулевому значению.

Аналогичные данные получены при оценке уровней KREC в описанных выше образцах крови новорожденных: при нарушении

рекомендаций по сбору и хранению крови на картах Гатри. Уровни KREC оказывались значительно ниже ($p < 0,0001$) при сравнении с теми же образцами в условиях соблюдения всех рекомендаций пробоподготовки.



* разработанный метод ПЦР-анализа TREC/KREC и соответствующий набор реагентов обозначен как «TREC/KREC-Amp PS»

Рисунок 3. Сравнение уровней TREC, определенных с использованием разных наборов реагентов, в образцах крови новорожденных, нанесенных на карты Гатри с соблюдением рекомендаций (корректно) и с допущением ошибок: А) «TREC/KREC-Amp PS» (копий/ 10^5 клеток), НИИ им. Пастера; Б) «ИММУНОБИТ» (копий/ 10^5 клеток), АББ-Тест; В) «EnLite™ TREC-KREC kit» (копий/мкл), PerkinElmer. Числами на диаграммах обозначены медианные значения аналита

При использовании разработанного ПЦР-метода получали сопоставимые концентрации молекул и TREC, и KREC вне зависимости от объема крови (одного и того же образца), наносимого на бумажный фильтр. При сравнении медиан, рассчитанных для каждой группы образцов, значимых различий не выявлено ($P\text{-value} > 0,05$).

Показана достоверная корреляция между значениями аналитов TREC и KREC, определенными в пробах ДНК, полученной из карт Гатри, пропитанных разными объемами крови, полученной от одного и того же индивидуума. Коэффициент корреляции $r > 0,98$ свидетельствует об очень высокой силе связи полученных данных.

Оценка диагностической значимости метода при первичных иммунодефицитных состояниях

Были проанализированы пробы ДНК, выделенные из образцов сухих пятен крови, полученных от десяти новорожденных с диагнозом ПИД различного генеза (ОВИН, синдром CHARGE, ТКИД, ПИД недифференцированный, транзиторная гипогаммаглобулинемия детского возраста, агаммаглобулинемия). Для всех этих образцов были зафиксированы сниженные уровни молекул TREC и/или KREC в крови по сравнению с референтным нижним порогом.

Среди условно здоровых лиц с отсутствием диагноза иммунодефицит сниженные уровни молекул TREC/KREC или одновременно TREC и KREC регистрировали в 2 % случаев. Такие случаи считали ложноположительными. Сниженные уровни аналитов могут быть связаны с заболеваниями, не выявленными на момент обследования. Еще одной причиной

ложноположительных результатов, как было сказано выше, может являться неправильная пробоподготовка клинических образцов для анализа.

В таблице 3 приведены показатели диагностической информативности определения уровней TREC и KREC при обследовании лиц на наличие ПИД.

Таблица 3. Показатели диагностической информативности разработанного метода количественной оценки TREC и KREC при диагностике ПИД

Определяемый аналит	Se	Sp	PPV	NPV	LR+	LR-	Prev	coPrev	Acc
TREC	0,80	0,99	0,44	0,99	249,3	4,9	0,0032	0,9968	0,99
KREC	0,95	0,99	0,49	0,99	296,2	19,9	0,0032	0,9968	0,99
TREC+KREC	0,75	0,99	0,43	0,99	233,9	4,0	0,0032	0,9968	0,99

Оценка диагностической значимости метода при инфекционных заболеваниях

Уровни TREC и KREC у ВИЧ-инфицированных лиц

Анализ содержания TREC и KREC в образцах цельной крови, полученной от ВИЧ-инфицированных больных, показал достоверное снижение уровней целевых аналитов у длительное время инфицированных пациентов с вирусологической неэффективностью АРТ по сравнению с контрольной группой.

Площадь под ROC-кривой для параметра TREC составила $0,9997 \pm 0,0003$, при 95 % ДИ, $p < 0,0001$. Для параметра KREC площадь под ROC-кривой составила $0,9948 \pm 0,0024$, при 95 % ДИ, $p < 0,0001$. При этом статистически значимой разницы между уровнями ДНК TREC и KREC у здоровых людей и у лиц с впервые выявленным ВИЧ со сроком инфицирования менее одного года не выявлено (Рисунок 4)

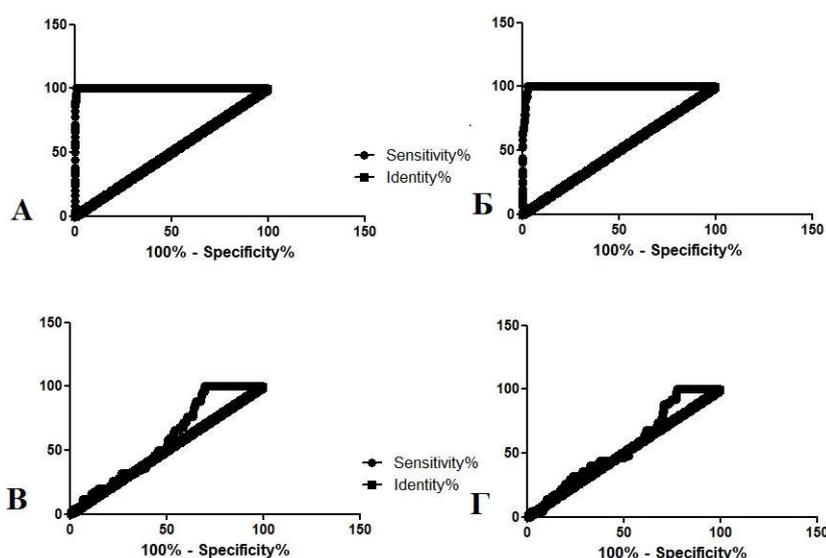


Рисунок 4. Изображение ROC-кривых, построенных при сравнении выборок условно здоровых лиц и ВИЧ-инфицированных взрослых больных: со сроком инфицирования более одного года и вирусологической

неэффективностью АРТ (с вирусной нагрузкой > 1000 копий/мл) по параметрам TREC (А) и KREC (Б); с недавно выявленной инфекцией ВИЧ (менее одного года с момента инфицирования) по параметрам TREC (В) и KREC (Г)

На рисунке 5 приведен корреляционный анализ уровней молекул TREC и KREC в крови ВИЧ-инфицированных лиц с уровнями CD45+CD3+CD19- и CD45+CD3-CD19+ лимфоцитов, соответственно.

Корреляционные коэффициенты r , указанные на рисунке 5, превышающие значение 0,7, свидетельствуют о высокой положительной связи между сравниваемыми параметрами.

В правой области точечных диаграмм сосредоточены точки, соответствующие группе пациентов, инфицированных менее одного года назад, не получавших терапию. Для них характерен преимущественно нормальный уровень Т- и В- лимфоцитов в крови и нормальный уровень молекул TREC и KREC.

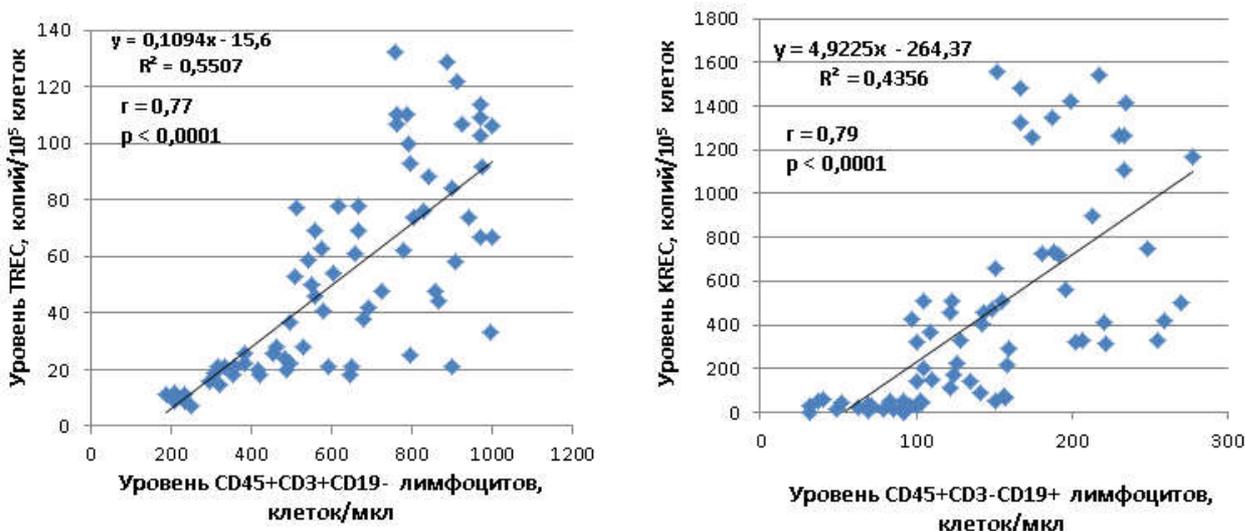


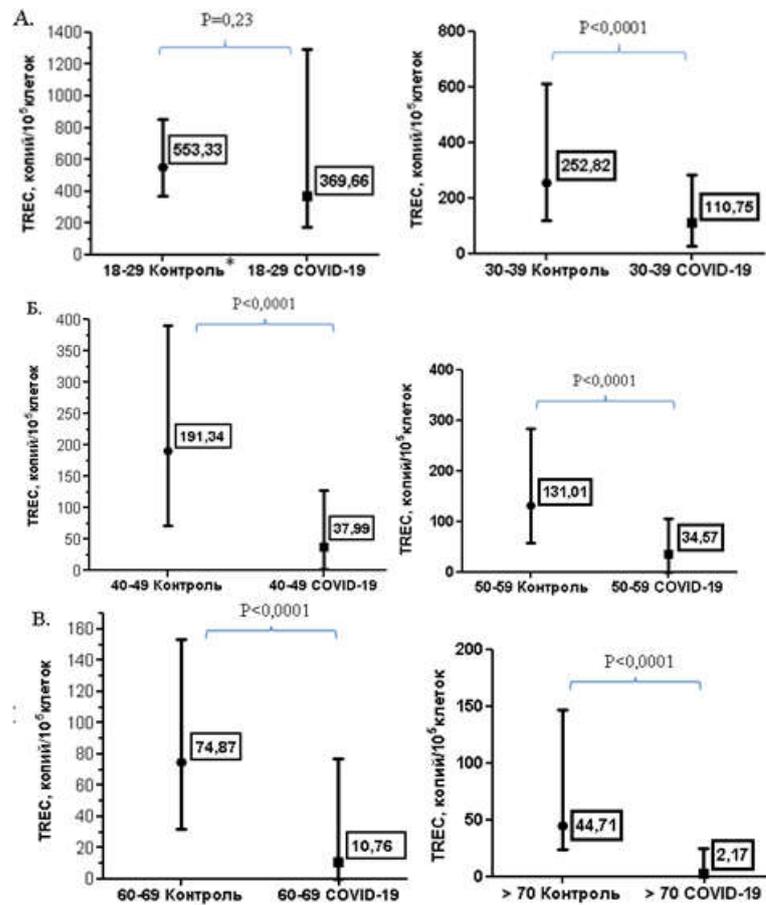
Рисунок 5. Корреляция уровней TREC с уровнями CD45+CD3+CD19- лимфоцитов (слева) и уровней KREC с уровнями CD45+CD3-CD19+ лимфоцитов (справа) в крови ВИЧ-инфицированных пациентов.

Уровни TREC и KREC у пациентов с новой коронавирусной инфекцией COVID-19

В группе инфицированных COVID-19 больных, все пациенты были распределены в шесть описанных выше возрастных групп: 18-29 лет (n=28), 30-39 лет (n=111), 40-49 лет (n=162), 50-59 лет (n=195), 60-69 лет (n=244), и лица старше 70 лет (n=288), где n – количество человек в группе.

Для всех возрастных групп кроме самой младшей (18-29 лет) уровни молекул TREC у больных были достоверно снижены относительно контрольных групп ($p < 0,0001$). Уровень молекул KREC у больных был также достоверно снижен ($p < 0,0001$).

На рисунках 6 и 7 представлены диаграммы сравнения медианных значений параметров TREC и KREC в образцах, полученных от больных с новой коронавирусной инфекцией, и образцах, полученных от контрольных групп.



* Интервалами на оси абсцисс обозначены возрастные диапазоны.

Рисунок 6. Сравнение уровней молекул TREC у больных COVID-19 и контрольных групп: А. 18-29 лет, 30-39 лет; Б. 40-49 лет, 50-59 лет; В. 60-69 лет, >70 лет.

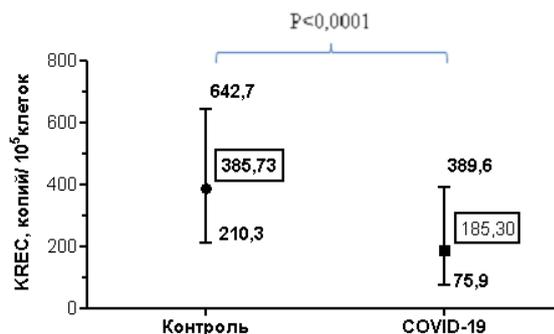


Рисунок 7. Сравнение уровней молекул KREC у больных COVID-19 и контрольной группы. На диаграмме представлены медианные значения с интерквартильным размахом, а также значение P-value

Установлена достоверная прямая корреляционная зависимость уровней молекул TREC с количеством CD45+CD3+CD19- Т-клеток (коэффициент корреляции Спирмена $r = 0,59$, $p < 0,0001$), а также уровней молекул KREC с

количеством CD45+CD3-CD19+ В-клеток в периферической крови ($r=0,66$, $p<0,0001$). На рисунке 8 представлен корреляционный анализ уровней эксцизионных колец и лимфоцитов соответствующего фенотипа.

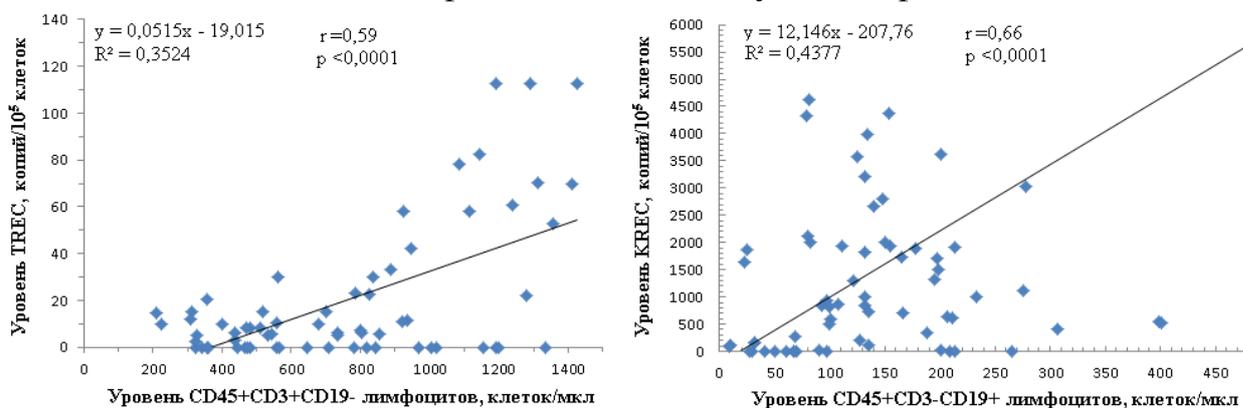


Рисунок 8. Корреляция уровней молекул TREC с уровнем CD45+CD3+CD19- лимфоцитов (слева) и корреляция молекул KREC с уровнем CD45+CD3-CD19+ лимфоцитов (справа) в крови тяжелых и крайне тяжелых больных COVID-19. На диаграммах представлены уравнения аппроксимирующих функций, коэффициенты достоверности аппроксимации (R^2), корреляционные коэффициенты Спирмена (r) и критерии уровня значимости p -value

Корреляционные коэффициенты r , указанные на рисунке 8, превышающие значение 0,5, свидетельствуют об умеренной положительной связи сравниваемых параметров.

Корреляционный анализ с вычислением коэффициентов Спирмена позволяет утверждать, что пол пациента не влияет ни на степень тяжести болезни ($r = -0,066$), ни на уровни молекул TREC ($r = -0,083$) и KREC ($r = 0,026$) в периферической крови.

Присутствует достоверная слабая отрицательная корреляционная зависимость между тяжестью течения заболевания и уровнями молекул TREC в образцах крови пациентов ($r=-0,153$; $p=0,000002$). Однако модуль коэффициента корреляции принимает значение близкое к 0,1 что позволяет говорить лишь об очень слабой взаимосвязи. При этом достоверной зависимости значений аналита KREC от тяжести течения инфекции не выявлено.

Среди умерших пациентов в 63,7% случаев уровни молекул TREC/KREC были снижены относительно соответствующих возрастных норм. В 20,9% случаев у таких пациентов были одновременно снижены и TREC, и KREC. При этом абсолютное количество лимфоцитов у таких пациентов также находилось ниже границы нормы.

Статистический анализ показал достоверное снижение медианных значений концентраций молекул KREC у пациентов с летальным исходом по сравнению с выжившими ($p=0,0019$), (Рисунок 9). Достоверных различий уровней молекул TREC между выборками умерших и выздоровевших не выявлено ($p=0,3289$).

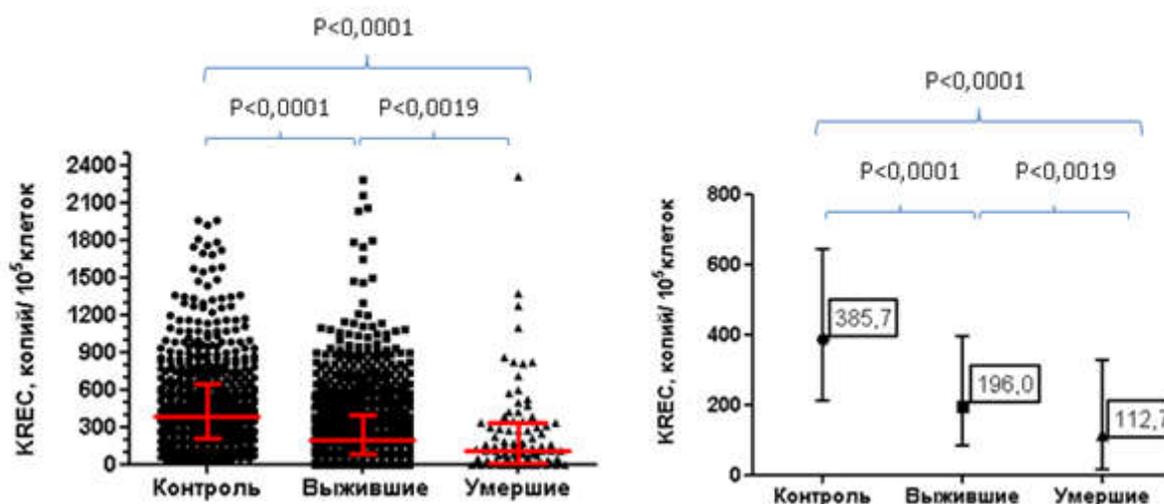


Рисунок 9. Сравнение уровней молекул KREC между группами здоровых, выживших после перенесенной новой коронавирусной инфекции COVID-19 и умерших людей. Слева представлен разброс всех полученных значений, справа - медианные значения с интерквартильным размахом. Над группами обозначены P-value, полученные при сравнении соответствующих выборок

Прогностическая модель наступления смерти пациентов в зависимости от уровня KREC в крови является статистически значимой ($p < 0,0001$) при проведении ROC-анализа между летальными и выжившими пациентами COVID-19 до 60 лет. На рисунке 10 приведена полученная ROC-кривая.

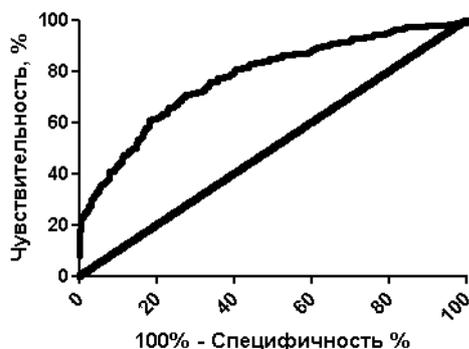


Рисунок 10. ROC-кривая, характеризующая зависимость вероятности наступления летального исхода пациента с COVID-19 до 60 лет от уровня KREC

Величина параметра площадь под кривой AUC (area under the curve) при этом достигает значения 0,77 (95% ДИ: 0,74-0,80), что говорит о хорошем качестве прогностической модели. При выборе порогового значения KREC (точка cut-off) 48,55 копий/10⁵ клеток (то есть в тех случаях, когда аналит KREC снижен относительно установленного референтного интервала) чувствительность прогностической модели наступления смерти составила 25,7 %, специфичность – 97,6 %. Таким образом, пациенты с уровнем KREC выше значения 48,55 копий/10⁵ клеток находятся вне зоны риска летального исхода с вероятностью 97,6 %.

Можно предположить, что выявленное нами снижение уровней молекул TREC и KREC при ВИЧ-инфекции и новой коронавирусной инфекции COVID-19 отражает общую реакцию иммунной системы, и может быть также определено при других инфекционных заболеваниях.

ВЫВОДЫ

1. Разработана тест-система для количественной оценки молекул TREC и KREC в периферической крови у взрослых и детей на основе технологии ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени;

2. Предел обнаружения разработанного метода составил 10^3 копий ДНК TREC/KREC на 1 мл анализируемого образца крови; аналитический диапазон измерений метода составил 10^3 - 10^8 копий ДНК TREC/KREC на 1 мл образца; аналитическая чувствительность метода - 10^3 копий/мл; линейность измерений метода лежит в диапазоне от $1,29 \cdot 10^3$ до $8,49 \cdot 10^8$ копий/мл; коэффициенты вариации при испытаниях воспроизводимости результатов не превышают 8%;

3. Референтные интервалы уровня TREC у разных возрастных групп составили (копий/ 10^5 клеток): 44,91 – 2135,00 у лиц 18-29 лет; 23,60 – 1597,00 у лиц 30-39 лет; 18,27 – 1098,00 у лиц 40-49 лет; 13,98 – 1543,00 у лиц 50-59 лет; 12,54 – 1715,00 у лиц 60-69 лет, 11,43-683,10 у лиц старше 70 лет. Нижняя граница нормы уровня молекул TREC в крови новорожденных составила 892,6 копий/ 10^5 клеток. Уровень KREC у взрослых лиц разных возрастных групп постоянен и составил 49,90 – 1478,00 копий/ 10^5 клеток. Нижняя граница нормы уровня молекул KREC в крови новорожденных составила 400,4 копий/ 10^5 клеток;

4. Установлена достоверная прямая корреляция уровней TREC с количеством CD45+CD3+CD19- Т-клеток ($r=0,77$ для ВИЧ-инфицированных лиц, $r=0,59$ для COVID-19 инфицированных лиц, $p<0,0001$), уровней KREC с количеством CD45+CD3-CD19+ В-клеток ($r=0,79$ для ВИЧ-инфицированных лиц, $r=0,66$ для COVID-19 инфицированных лиц, $p<0,0001$) в периферической крови. Показана диагностическая значимость ПЦР-метода количественного определения молекул TREC и KREC при первичных иммунодефицитах ($Se=0,80$, $Sp=0,99$, $Acc=0,99$ для TREC; $Se=0,95$, $Sp=0,99$, $Acc=0,99$ для KREC);

5. Показаны достоверно сниженные уровни молекул TREC и KREC у ВИЧ-инфицированных лиц с высокой вирусной нагрузкой и вирусологической неэффективностью применяемой антиретровирусной терапии ($AUC=0,99$, $Se=0,99$, $Sp=0,99$ для TREC и для KREC);

6. Установлены достоверно сниженные уровни TREC и KREC у пациентов с тяжелым течением новой коронавирусной инфекции COVID-19 ($p<0,0001$). Установлена достоверная отрицательная корреляция между тяжестью течения заболевания и уровнем молекул TREC ($r=-0,153$; $p<0,0001$). Показана информативность определения уровня KREC для прогноза исхода заболевания в острый период у больных COVID-19 до 60 лет

(AUC=0,77, Sp=0,98 при пороговом значении уровня KREC в точке cut-off - 48,55 копий/10⁵ клеток).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Рекомендуется использование разработанной тест-системы для определения уровней молекул TREC и KREC в периферической крови врачам-иммунологам и врачам-инфекционистам для выявления нарушений в функционировании Т- и В-клеточного звеньев иммунитета с целью уточнения диагноза и планирования терапии у пациентов с подозрением на первичный иммунодефицит; с целью мониторинга эффективности применяемой антиретровирусной терапии у ВИЧ-инфицированных лиц; для прогноза тяжести течения и исхода заболевания в острый период у больных COVID-19.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Перспективным направлением продолжения работы является установление референтных интервалов количественного содержания молекул TREC и KREC у детей от 1 года до 17 лет, не охваченных в настоящем исследовании, а также установление норм содержания молекул TREC и KREC в периферической крови у людей в зависимости от их этнической или расовой принадлежности. Кроме того, в качестве перспектив разработки темы можно рассматривать изучение влияния других различных острых и хронических инфекций на процессы лимфоцитарного неогенеза, и оценку возможности использования уровней TREC и KREC в крови пациентов при таких заболеваниях в качестве диагностических и прогностических маркеров развития тяжелых состояний и летальных исходов.

Статьи в научных изданиях, входящих в перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, а также международных базах данных, для опубликования основных научных результатов диссертации по специальностям 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика и 3.2.7. Иммунология:

1. Сайтгалина М.А. Модифицированный метод количественного определения уровней TREC и KREC в периферической крови у больных с иммунодефицитными состояниями / М.А. Сайтгалина, Ю. В. Останкова, Н. Е. Любимова, А. В. Семенов, Р. Н. Кузнецова, А. А. Тотолян // Инфекция и иммунитет.- 2022. - Т.12, №5. - С.981-996. doi: 10.15789/2220-7619-MMF-2039
2. Сайтгалина М. А. Определение референтных интервалов циркулирующих в крови эксцизионных колец TREC и KREC у лиц старше 18 лет / М.А. Сайтгалина, Н. Е. Любимова, Ю.В. Останкова, Р.Н. Кузнецова, А.А. Тотолян // Медицинская иммунология.- 2022. - Т.24, №6. - С.1227-1236. doi: 10.15789/1563-0625-DOR-2587

3. Сайтгалина М.А. Особенности преаналитического этапа при количественном определении TREC/KREC в периферической крови / М.А. Сайтгалина, Ю.В. Останкова, А.В. Седых, А.А. Тотолян / Медицинская иммунология. – 2023. – Т.25, №6. – С. 1441-1452. doi: 10.15789/1563-0625-FOT-2909

4. Сайтгалина М.А. Оценка уровней молекул TREC и KREC у больных COVID-19 с разной степенью тяжести течения заболевания / М.А. Сайтгалина М.А., Ю.В. Останкова, Н.А. Арсентьева, З.Р. Коробова и др. // Инфекция и иммунитет. - 2023. - Т. 13, №5. - С. 873-884. doi: 10.15789/2220-7619-AOT-16937

5. Сайтгалина М.А. Значимость определения уровней молекул TREC и KREC в периферической крови для прогноза исхода заболевания COVID-19 в острый период / М.А. Сайтгалина, Ю.В. Останкова, Н.А. Арсентьева, З.Р. Коробова и др. // Российский иммунологический журнал. - 2023. - Т. 26, №4. - С. 611-618. doi: 10.46235/1028-7221-14714-LOT

6. Седых А.В. Сравнительный анализ наборов реагентов для выделения ДНК из сухих пятен крови / А.В. Седых, М.А. Сайтгалина, Ю.В. Останкова, А.А. Тотолян // Медицинская иммунология. – 2023. – Т.25, №6. – С. 1453-1462. doi:10.15789/1563-0625-CAO-2895

7. Сайтгалина М.А. Определение нижних границ нормы для показателей TREC и KREC у новорожденных с использованием набора реагентов «TREC/KREC-AMP PS» / М.А. Сайтгалина, Н.Е. Любимова, Ю.В. Останкова, Р.Н. Кузнецова и др. // Клиническая лабораторная диагностика. – 2023. - Т.68, №10. – С. 644-649. doi: 10.51620/0869-2084-2023-68-10-644-649

Тезисы докладов в научных журналах и сборниках материалов конференций и симпозиумов:

8. Сайтгалина М.А. Модифицированный метод количественного определения молекул TREC и KREC в периферической крови / М.А. Сайтгалина, Ю.В. Останкова // Журнал инфектологии. – 2022. – Т.14, №4. – С. 89-90.

9. Сайтгалина М.А. Оценка воспроизводимости результатов количественного определения молекул TREC и KREC в образцах крови с помощью разработанной тест-системы/ М.А. Сайтгалина, Ю.В. Останкова// Журнал инфектологии.- 2022. - Т.14, №5. - С.68.

10. Сайтгалина М.А. Оценка точности измерений метода количественного определения молекул TREC и KREC на основе Real-time ПЦР / М.А. Сайтгалина, Ю.В. Останкова//Журнал инфектологии.- 2022. - Т.14, №5. - С.68-69.

11. Сайтгалина М.А. Применение Real-time ПЦР для количественного определения молекул TREC и KREC в крови ВИЧ-инфицированных пациентов/ М.А. Сайтгалина, Ю.В. Останкова // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии.- 2023. - Т.15, №1. - С.82-83.

12. Сайтгалина М.А. Применение Real-time ПЦР для количественного определения молекул TREC и KREC в периферической

крови/ М.А. Сайтгалина, Ю.В. Останкова, Н.Е. Любимова // Сборник материалов VI российского конгресса с международным участием «Молекулярные основы клинической медицины – возможное и реальное», 2022.– С. 148-150.

13. Сайтгалина М.А. Способ персонифицированной лабораторной диагностики состояния иммунитета человека / М.А. Сайтгалина, Ю.В. Останкова // Сборник статей Всероссийской межведомственной научно-практической конференции, посвящённой 100-летию со дня рождения академика В.Д. Белякова От теории саморегуляции к мировой самоизоляции: современные вызовы эпидемиологической науке и практике, 2022 - 151-155.

14. Сайтгалина М.А. Анализ уровней молекул TREC и KREC в периферической крови больных COVID-19 с летальным исходом / М.А. Сайтгалина, Ю.В. Останкова // Молекулярная диагностика. Сборник трудов / колл. авт. Москва: АО "САЙЕНС МЕДИА ПРОДЖЕКТС", 2023. – С.458-459.

15. Сайтгалина М. А. Оценка уровней эксцизионных колец TREC и KREC в периферической крови у пациентов с COVID-19/ Сайтгалина М.А. // Сборник материалов Всероссийского терапевтического конгресса с международным участием "Боткинские чтения", 2023 –С.236.

16. Сайтгалина М. А. Количественное определение молекул TREC и KREC в крови ВИЧ-инфицированных пациентов/ Сайтгалина М.А. // Сборник материалов Всероссийского терапевтического конгресса с международным участием "Боткинские чтения", 2023 –С.237.

17. Сайтгалина М.А. Определение референтных интервалов уровней TREC и KREC у новорожденных в Гвинейской Республике / М.А. Сайтгалина, Ю.В. Останкова // Сборник материалов IV Международной научно-практической конференции "Противодействие новой коронавирусной инфекции и другим инфекционным заболеваниям". – 2023. –С. 266-268.

18. Saitgalina M.A Quantification of TREC and KREC molecules in patients with COVID-19 by Real-time PCR/ Сборник тезисов международной научно-практической конференции: "Современные тенденции развития инфектологии, медицинской паразитологии, эпидемиологии и микробиологии", 2023. – С. 33.

19. Saitgalina M.A Quantitative analysis of TREC and KREC levels in the blood of HIV-infected patients/ Сборник тезисов международной научно-практической конференции: "Современные тенденции развития инфектологии, медицинской паразитологии, эпидемиологии и микробиологии", – С.34.

20. Сайтгалина М.А. Оценка уровней эксцизионных колец TREC и KREC в крови ВИЧ-инфицированных пациентов / М.А. Сайтгалина, Ю.В. Останкова // Журнал инфектологии. – 2023. – Т.15, №1 (Прилож. 1). – С. 148-149.

21. Сайтгалина М.А. Количественное определение молекул TREC и KREC у больных с COVID-19 / М.А. Сайтгалина // Журнал инфектологии. – 2023. – Т.15, №1 (Прилож. 1). – С. 148.

22. Сайтгалина М.А., Останкова Ю.В. Количественное определение ДНК-молекул TREC и KREC в крови больных COVID-19 с летальным исходом// Журнал инфектологии -2023. – Т. 15, №2 – С. 111-112.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АРТ – антиретровирусная терапия
ВИЧ – вирус иммунодефицита человека
ГОСТ - государственный стандарт
ДИ – доверительный интервал
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
МКА – моноклональные антитела
ОВИН – общая вариабельная иммунная недостаточность
ПЦР – полимеразная цепная реакция
ПИД – первичный иммунодефицит
РИ - референтные интервалы
РНК - рибонуклеиновая кислота
ТКИД - тяжелый комбинированный иммунодефицит
ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота
AUC – area under the curve
coPrev. - Contr Prevalence
DBS - dried blood spots
IFCC - International Federation of Clinical Chemistry
KREC - Kappa-deleting recombination excision circles
LR - likelihood ratio
NPV – negative predictive values
PPV – positive predictive values
Prev. - Prevalence
Se – sensitivity
Sp – specificity
TREC – T-cell receptor excision circle