

И.А. Корсунский^{1,2,3}, А.П. Продеус^{1,2}, А.Г. Румянцев¹, М.А. Гордукова²,
А.А. Корсунский^{2,3}, Д.А. Кудлай⁴, М.Л. Филипенко⁵, А.М. Шустер¹

СКРИНИНГ НОВОРОЖДЕННЫХ НА ПЕРВИЧНЫЕ ИММУНОДЕФИЦИТЫ И ГРУППУ РИСКА ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫХ РАССТРОЙСТВ, ТРЕБУЮЩИХ ДИСПАНСЕРНОГО НАБЛЮДЕНИЯ

¹ФГБУ «Научный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» МЗ РФ, ²ГБУЗ «Детская городская больница № 9 им. Г.Н. Сперанского» ДЗМ, ³ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова МЗ РФ, ⁴АО «Генериум», биофармацевтическая компания, Москва; ⁵ФГБОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», г. Новосибирск, РФ



Популяционный скрининг новорожденных позволяет выявить детей до манифестации тяжелых врожденных заболеваний, для которых доступно эффективное лечение и/или профилактика серьезных осложнений. Первичные иммунодефицитные состояния (ПИДС) представляют собой гетерогенную группу врожденных нарушений иммунитета, большинство из которых проявляется в младенчестве и раннем детском возрасте и приводит к высокой заболеваемости и смертности. Количество идентифицированных ПИДС достигло 400 заболеваний с широким спектром клинических фенотипов и различных патофизиологических механизмов нарушения клеточной регуляции многоклеточного организма хозяина. В статье представлены эволюция и результаты скрининга новорожденных на ПИДС различными тестами: от анализа крови с подсчетом количества лимфоцитов до определения вырезанного кольца Т-клеточного рецептора (T-cell receptor excision circle – TREC) и Каппа-рекомбинантного кольца (Kappa recombining excision circles – KREC), а также тестов, основанных на исследовании белка, таргетном секвенировании, секвенировании следующего поколения (NGS), включая полногеномное секвенирование. Представлены результаты неонатального скрининга на ПИДС с использованием отечественных тестов на TREC и KREC у 17 476 новорожденных. Группа вероятного ПИДС составила 0,09%, группа ПИДС – 0,017% обследуемых, что является основанием для рекомендации внедрения неонатального скрининга на ПИДС в Российской Федерации.

Ключевые слова: скрининг новорожденных, первичные иммунодефициты, TREC, KREC, секвенирование следующего поколения.

Цит.: И.А. Корсунский, А.П. Продеус, А.Г. Румянцев, М.А. Гордукова, А.А. Корсунский, Д.А. Кудлай, М.Л. Филипенко, А.М. Шустер. Скрининг новорожденных на первичные иммунодефициты и группу риска иммунорегуляторных расстройств, требующих диспансерного наблюдения. *Педиатрия*. 2019; 98 (3): 49–54.

I.A. Korsunsky^{1,2,3}, A.P. Prodeus^{1,2}, A.G. Rumyantsev¹, M.A. Gordukova²,
A.A. Korsunsky^{2,3}, D.A. Kudlay⁴, M.L. Filipenko⁵, A.M. Schuster¹

SCREENING OF NEWBORNS FOR PRIMARY IMMUNODEFICIENCIES AND RISK GROUPS FOR IMMUNOREGULATORY DISORDERS REQUIRING FOLLOW-UP

¹National Scientific-Practical Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology n.a. D. Rogachev; ²G.N. Speransky City Children's Hospital № 9; ³I.M. Sechenov First Moscow State Medical University; ⁴Generium, Biopharmaceutical Company, Moscow; ⁵Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russia

Контактная информация:

Корсунский Илья Анатольевич – к.м.н., врач аллерголог-иммунолог, зав. центром аллергологии и иммунологии ГБУЗ Детская городская больница № 9 им. Г.Н. Сперанского ДЗМ
Адрес: Россия, 123317, г. Москва, Шмитовский проезд, 29
Тел.: (903) 571-77-85, **E-mail:** iliakors@gmail.com
Статья поступила 27.04.19,
принята к печати 20.05.19.

Contact Information:

Korsunsky Ilya Anatolyevich – Ph.D., allergist-immunologist, head of Allergology and Immunology Center, G.N. Speransky City Children's Hospital № 9
Address: Russia, 123317, Moscow, Shmitovskiy proezd, 29
Tel.: (903) 571-77-85, **E-mail:** iliakors@gmail.com
Received on Apr. 27, 2019,
submitted for publication on May 20, 2019.

Population screening of newborns allows to identify children before the onset of severe congenital diseases for which effective treatment and/or prevention of serious complications is available. Primary immunodeficiency states (PIDs) are a heterogeneous group of congenital immune disorders, most of which manifest in infancy and early childhood and lead to high morbidity and mortality. The number of identified PIDs reached 400 diseases with a wide range of clinical phenotypes and various pathophysiological mechanisms of impaired cellular regulation of a multicellular host organism. The article presents evolution and results of screening newborns for PIDs with various tests: from a blood test with counting the number of lymphocytes to determining T-cell receptor excision circle – TREC) and Kappa recombining excision circles – KREC, as well as tests based on the study of protein, targeted sequencing, sequencing of the next generation (NGS), including full-cell sequencing. Results of neonatal screening for PIDs using domestic tests for TREC and KREC in 17,476 infants are presented. The group of probable PIDs amounted to 0,09%, the group of PIDs – 0,017% of subjects, which is the basis for recommending the introduction of neonatal screening for PIDs in the Russian Federation.

Keywords: newborn screening, primary immunodeficiency, TREC, KREC, next generation sequencing.

Quote: I.A. Korsunsky, A.P. Prodeus, A.G. Rumyantsev, M.A. Gordukova, A.A. Korsunsky, D.A. Kudlay, M.L. Filipenko, A.M. Schuster. Screening of newborns for primary immunodeficiencies and risk groups for immunoregulatory disorders requiring follow-up. *Pediatrics*. 2019; 98 (3): 49–54.

До недавнего времени было невозможно идентифицировать детей с ПИДС до появления клинических симптомов, после чего у детей обычно возникают осложнения в виде тяжелых инфекций, аутоиммунных и опухолевых заболеваний, приводящих к смертельным исходам [1]. Открытие более 300 генетических мутаций, приводящих к ПИДС, привело к революционным изменениям раздела «Болезни иммунной системы» в МКБ 11, представленным ВОЗ 18.06.2018 г. к реализации и переводу на национальные языки. В мае 2019 г., после одобрения на 72-й сессии ВОЗ, государства-члены ВОЗ начнут представлять отчеты с использованием МКБ 11 с 1.01.2022 г.

Тяжелая комбинированная иммунная недостаточность (ТКИН) и ряд комбинированных ПИДС являются неотложными иммунологическими состояниями, которые без ранней неонатальной диагностики и трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) в первые 3 месяца жизни приводят к летальному исходу. Реально в этом помочь может только неонатальный скрининг и, возможно, в ближайшем будущем неинвазивный пренатальный скрининг на ПИДС. В случаях тяжелых ПИДС скрининг новорожденных на Т-клеточную лимфопению является идеальной стратегией для выявления заболеваний. Полный анализ крови с определением количества лимфоцитов оказался малоинформативным, скрининг пуповинной крови на популяционный состав Т-клеток методом проточной цитометрии занимает много времени и имеет высокую стоимость [2]. Позднее был разработан анализ количества TREC, специфический для нативных Т-клеток [3], и использован для популяционного анализа на ТКИН и другие формы Т-клеточной лимфопении [4].

10 лет назад – в 2008 г. – было начато новое пилотное исследование неонатального скрининга на ТКИН в США, которое в итоге стало общенациональным, охватив >92% новорожденных

[5]. С 2014 г. появились первые публикации эффективности популяционного скрининга на ТКИН [6], в течение последних 5 лет исследования охватили детей развитых стран Европы, Японии, Саудовской Аравии, Бразилии и Ирана. Анализ многочисленных исследований, выполненных тестами различных производителей на TREC, показал, что частота ТКИН у новорожденных в 2 раза выше, чем предполагалось ранее и составляет 2 на 100 000 новорожденных. Кроме того, Т-лимфопения сопровождается множественные врожденные аномалии, материнские инфекции и аутоиммунные заболевания и, что очень важно, синдром делеции 22g и трисомию 21, комбинированную иммунную недостаточность (КИН) и атаксию-телеангиэктазию, что является основой для формирования групп риска из детей, нуждающихся в долгосрочном клиническом наблюдении [7].

Подобно Т-клеткам, В-клетки также подвергаются перестройке, итогом которой является образование эписомальной кольцевой ДНК, называемой KREC. В 2011 г. этот маркер нативных В-клеток был впервые использован для неонатального скрининга агаммаглобулинемии, общей вариабельной иммунной недостаточности (ОВИН) и других В-клеточных расстройств [8]. Мультиплексный анализ TREC и KREC позволил в 2 раза увеличить количество диагностированных больных и прочих лиц, нуждающихся в наблюдении. Помимо больных с В-клеточным дефицитом, в группе наблюдения оказались пациенты с синдромами ломкости хромосом, синдромом Ниймеген и даже дефицит ADA [9]. В то же время в группу риска не удастся включить те случаи, когда молекулярные дефекты находятся ниже по ходу перестройки рецепторов Т- и В-клеток.

Мультиплексный анализ TREC и KREC может быть использован для диагностики и мониторинга ПИДС и других расстройств иммунной системы, включая инфекции, опухо-

ли и аутоиммунные/аутовоспалительные заболевания [10–12].

Материалы и методы исследования

Для решения поставленной задачи было проведено исследование, одобренное локальным этическим комитетом ГБУЗ ДГКБ № 9 им. Г.Н. Сперанского ДЗМ.

Основу работы составило изучение связи количества TREC и KREC в сухих пятнах крови на картах неонатального скрининга и в периферической крови пациентов, их иммунного статуса, клинического состояния и диагноза.

Количество TREC и KREC было оценено с помощью количественной ПЦР с детекцией в режиме реального времени. Исследование состояло из следующих этапов: получение стандартных плазмидных образцов, получение калибраторов, количественный анализ TREC, KREC и альбумина [13].

Получение стандартных плазмидных образцов.

Фрагменты TREC, KREC и альбумина для конструирования стандартных образцов амплифицировали с помощью праймеров в следующих условиях: реакционная смесь ПЦР объемом 50 мкл содержала: 1х буфер для Taq-полимеразы (65 mM Tris-HQ (pH 8,9); 16 mM (NH₄)₂SO₄; 0,05% Tween 20; 3,5 mM MgCl₂), 0,2 mM дНТФ, 50 нг геномной ДНК человека, 1 е.а. Taq-полимеразы (Биосан), 0,5 е.а. Pfu-полимеразы (Биосан). Амплификацию проводили в амплификаторе «Терцик» (ДНК-технология) согласно следующей программе: 3 мин при 95 °С начальной денатурации, 35 циклов: 10 с при 95 °С для денатурации, 10 с при 60 °С для гибридизации праймеров, 40 с при 72 °С для элонгации.

Продукты амплификации с праймерами TREC3/TREC4 длиной 1192 п.н., IL17Ra3/IL17Ra4 длиной 455 п.н. и KREC3/KREC4 длиной 482 п.н. гидролизовали эндонуклеазой рестрикции HindIII (Сибэнзим, г. Новосибирск) и лигировали с вектором pBluscriptII SK(+), гидролизованным той же эндонуклеазой, в течение 3 ч с 100 ед. акт. T4 ДНК-лигазы (Биосан). Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* штамма XL1-Blue (Stratagene).

У плазмидных клонов, отобранных по результатам рестрикционного анализа, для подтверждения структуры определяли нуклеотидную последовательность вставки секвенированием по методу Сенгера. Секвенирование было выполнено на автоматическом секвенаторе ABI 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) с использованием набора Big dye 3.1 (Центр коллективного пользования «Геномика», ИХБФМ СО РАН). Плазмидные ДНК (pST-TREC, pST-KREC и pST-IL17RA) выделяли из 100 мл ночной культуры в среде LB с помощью QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN) согласно инструкции фирмы-производителя.

Получение калибраторов. Концентрацию полученных стандартных плазмидных ДНК определяли спектрофотометрически и флуорометрически (набор Qubit™ BR, Invitrogen), а именно: 2 мкг ДНК подвергали гидролизу эндонуклеазой рестрикции EcoRI для линейаризации. Полученные линейные стандарты разводили до концентрации 10⁷–10¹ копий плазмид-

ной ДНК на мкл в стерильном буфере, содержащем 10 mM TrisHCl pH 7,6 и ДНК фага лямбда 5 нг на мкл. Концентрацию ДНК в полученных стандартах уточняли с использованием цифровой ПЦР на платформе QX100™ Droplet Digital™ PCR System (Bio-Rad, США) согласно инструкциям фирмы-производителя. Для этого готовили 20 мкл ПЦР-смеси, содержащей исследуемую ДНК (<66 нг на 20 мкл), 1X ПЦР-смесь (Bio-Rad), 300 нМ олигонуклеотидные праймеры и 100 нМ Taq-man зонд. Для получения микрокапель 20 мкл приготовленной ПЦР-смеси и 70 мкл масла для генерации капель помещали в соответствующие лунки картриджа DG8. 40 мкл полученных микрокапель переносили 96-луночную ПЦР-плашку, запечатывали фольгой и помещали в амплификатор. Программа амплификации: 96 °С – 10 мин и далее 50 циклов 96 °С – 15 с, 60 °С – 40 с с финальным прогревом в течение 10 мин при 98 °С. После этого микрокапли подвергали считыванию с помощью прибора Droplet Reader, полученные данные обрабатывали в программе QuantaSoft (Bio-Rad, США).

Количественный анализ TREC и KREC методом ПЦР-РВ. Для количественного анализа TREC и KREC проводили мультиплексную ПЦР-РВ. Смесь для ПЦР (объемом 25 мкл) содержала олигонуклеотидные праймеры TREC2fo, TREC2re, KREC3 и KREC4 – 0,3 мкМ; IL17RA-U и IL17RA-R – 0,25 мкМ, флуоресцентно-меченые зонды TRECp2 и KREC4P – 0,2 мкМ, IL17RA-P – 0,15 мкМ, а также 1х буфер для Taq-полимеразы (65 mM Tris-Ha (pH 8,9); 16 mM (NH₄)₂SO₄; 0,05% Tween 20; 3,5 mM MgCl₂), 0,2 mM дНТФ, 1 е.а. Taq-полимеразы («Биосинтек», Россия) и геномную ДНК человека. Реакцию амплификации проводили в амплификаторах CFX96 (Bio-Rad, США), Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Австралия) и ABI 7500 (Applied Biosystems, США) согласно следующей программе: 15 мин при 95 °С начальной денатурации для активации фермента, 4 цикла: 10 с при 95 °С для денатурации, 30 с при 61 °С для гибридизации праймеров, 15 с при 72 °С для элонгации, далее 39 циклов: 10 с при 95 °С, 30 с при 60 °С, съём флуоресцентного сигнала на каналах FAM/HEX/ROX, 15 с при 72 °С. Для каждого образца анализ проводили в трех повторениях, для построения калибровочной кривой использовали стандартные образцы 10⁷, 10⁵, 5 · 10³ копий на мл. Количество копий анализируемых ДНК мишеней рассчитывали по формуле, выведенной из графика калибровочной кривой с помощью программного обеспечения к соответствующему прибору.

Клиническую интерпретацию количества копий TREC/KREC проводили с учетом определенных геном-эквивалентов ядродержащих клеток крови (альбумин) по формуле: количество TREC/KREC = (кол-во копий TREC/KREC) на мл/кол-во копий альбумина) · 200 000 (для экстракции с помощью комплекта реагентов «АмплиПрайм РИБО-преп»).

Прогностическая оценка мультиплексного анализа TREC/KREC проведена с помощью субпопуляционного анализа периферической крови методом проточной цитофлуориметрии [12].

Анализ субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови методом проточной цитоф-

луометрии проводили на проточном цитофлуометре FACS Canto II (Becton Dickinson, США) с использованием программного обеспечения FACSDiva v7.0. Суспензия клеток метилась следующими моноклональными антителами: CD3, CD19+, CD3-CD(16+56)+, CD3+CD4+, CD3+CD8+ (Becton Dickinson, США) а также соответствующими изотипическими контролями. Для исследования внутриклеточных маркеров клетки, предварительно окрашенные антителами к мембранным антигенам, были пермеабелизованы с применением IntraPrep™ Permeabilization Reagent (Immunotech, Франция), а затем окрашены изотипическим контролем или моноклональными антителами к Foxp3-PC5, (eBioscience, США), Granzyme B (Serotec, Великобритания) в соответствии с методиками производителей.

С целью установления референсных значений TREC и KREC у детей разного возраста были отобраны 282 ребенка (140 мальчиков и 142 девочки) в возрасте от 0 мес до 18 лет. Все дети – пациенты клинко-диагностического центра и стационарных отделений ГБУЗ ДГКБ № 9 им. Сперанского, обратившиеся к врачу с неиммунологическими и неинфекционными заболеваниями. У всех детей был тщательно собран анамнез и проведено лабораторное обследование, направленное на исключение иммунологических и инфекционных патологий [11].

Для референсных значений TREC/KREC новорожденных был проведен анализ количества TREC и KREC в сухих пятнах крови 120 здоровых новорожденных, чьи данные семейного анамнеза, клинического осмотра, результаты иммунологических исследований, а также показатели общих анализов крови и мочи соответствовали возрастным нормам и исключали течение каких-либо хронических или острых инфекционных заболеваний. Таким образом, были определены референсные значения: $5 \cdot 10^2$ для TREC и $1 \cdot 10^2$ для KREC.

В период с 1 ноября 2017 г. по 30 сентября 2018 г. было проведено скрининговое обследование 17 476 родившихся в родильных домах Московской области младенцев. В 14 952 случаях результатом анализа были нормальные значения TREC и KREC, тогда как в 2524 случаях показатели TREC и/или KREC были снижены и поэтому потребовалось повторное исследование. Таким образом, было выполнено 20 000 анализов уровней TREC и KREC в сухих пятнах крови на картах неонатального скрининга.

Результаты и их обсуждение

В 131 случае в повторных анализах также были выявлены незначительно сниженные уровни TREC и/или KREC, а в крови 16 новорожденных TREC и/или KREC были существенно ниже референсных значений либо не детектировались вообще. Таким образом, 95 мальчиков и 52 девочки, из которых только 3 младенца родились раньше срока, потребовали углубленного обследования и наблюдения.

В 131 случае показатели были снижены незначительно. Эти дети взяты под контроль

участковыми педиатрами районных поликлиник, к которым прикреплены эти пациенты.

В 16 случаях показатели TREC и/или KREC были существенно ниже референсных значений, что позволило выделить их в группу риска иммунодефицитных состояний.

Развернутое иммунологическое обследование методом проточной цитофлуометрии 9 младенцев из этой группы не выявило каких-либо отклонений в иммунном статусе. Последующее исследование количества TREC и KREC в периферической крови этих детей также не выявило каких-либо отклонений. В показателях общих анализов крови была выявлена лейко- и лимфопения разной степени тяжести. В настоящий момент рост и развитие этих детей проходят без особенностей.

Родители 4 детей от углубленного обследования отказались. Из выписок из амбулаторных карт районных поликлиник известно следующее:

1) ребенок К. – стойкая лейкопения с рождения, постоянные отводы от вакцинации. За период с 5 до 10 мес 6 эпизодов ОРВИ, один из них с обструктивным бронхитом без лихорадки; в 3 мес ветряная оспа. Ребенок обследован в октябре 2018 г. в больнице по месту жительства: показатели гуморального иммунитета – IgA 0,17 г/л (норма 0,36–1,65 г/л), IgM 0,92 г/л (норма 0,46–1,9 г/л), IgG 6,54 г/л (норма 3,5–10 г/л), биохимический анализ крови – ЛДГ 874 Ед, остальные показатели в пределах нормы. В общем анализе крови – лейкопения сохраняется;

2) ребенок П. – был госпитализирован из родильного дома в отделение патологии новорожденных с диагнозом: «двусторонняя очаговая пневмония в нижних долях обоих легких, неизвестной этиологии. Дыхательная недостаточность II степени», находился на длительном стационарном лечении;

3) ребенок Г. – патологическая потеря веса на 2-й день после рождения, к данному времени медленный набор веса. До 1 года 4 эпизода ОРВИ, в 5 мес перенес ветряную оспу;

4.) ребенок С. – на 3-й день жизни был госпитализирован в отделение реанимации и интенсивной терапии с диагнозом внутриутробной инфекции неясной этиологии. На момент осмотра в возрасте 2 мес можно отметить синдактилию обеих стоп и короткую шею. Ребенок обследуется неврологом и кардиологом на предмет врожденных пороков развития.

Поскольку родители перечисленных выше 4 детей от углубленного обследования отказались, принято решение контролировать их состояние через участковых педиатров.

3 младенца сразу после рождения были госпитализированы из родильных домов в отделения реанимации и интенсивной терапии областных и районных больниц с диагнозом бактериальной инфекции и в течение следующих 6–11 дней умерли от бактериального сепсиса. Возможностей для углубленного иммунологического обследования этих детей не было.

Таким образом, показано, что младенцы со сниженными показателями TREC и/или KREC в сухих пятнах крови на картах неонатального скрининга относятся к группе риска по развитию тяжелых инфекционных заболеваний. К ним должно быть проявлено пристальное внимание неонатологов и иммунологов [14].

По нашим данным, в группу риска ПИДС после второго контроля могут быть отнесены 16 из 17 476 обследованных новорожденных (0,091%), 3 из погибших больных (0,017%) соответствуют международным данным о распространенности тяжелых ПИДС с клеточными или комбинированными дефектами.

Заключение

Практика пренатального и неонатального скрининга новорожденных во всем мире получила развитие в XXI веке в связи с разработкой методов генетического и молекулярного анализа, что позволяет на диагностическом уровне провести раннюю диагностику тяжелых инвалидизирующих и/или смертельных заболеваний, определить тактику поведения семьи и медицинских работников в отношении плода и новорожденного и провести плановую работу по мониторингу детей группы риска и их лечению, включая ТГСК и/или другие регулирующие клеточные технологии. ПИДС представляют собой гетерогенную группу клеточных расстройств, определяющих развитие широкого спектра заболеваний от младенчества до глубокой старости. Сегодня методом выбора неонатального скрининга ПИДС является мультиплексный анализ количества TREC и KREC в сухих клетках крови

на картах неонатального скрининга, используемых в программе неонатального скрининга в Российской Федерации. Международные скрининги ПИДС и некоторые представленные в статье исследования в нашей стране свидетельствуют о том, что предполагаемый объем диагностированных пациентов с ПИДС способен превысить объем выявляемых 5 наследственных заболеваний в Российской Федерации. Кроме этого, мультиплексный анализ TREC/KREC позволит выделить группу риска новорожденных и детей раннего возраста, требующих специального диспансерного наблюдения с исключением и/или контролем эволюции клеточных расстройств с целью предупреждения и/или коррекции заболеваний [14].

В эпоху развития геномных исследований вполне вероятно, что ПИДС будут диагностированы на пренатальном уровне с помощью секвенирования ДНК плода, полученной из материнской плазмы во время беременности. В дополнение к хромосомной анеуплоидии с помощью этих исследований можно диагностировать субхромосомные делеции и дупликации, включая синдром Ди Джорджи (22q11), синдром Кри-дю-Чат (5p) и делеции, связанные с синдромами Прадера-Вилли и Анильмана [15].

Конфликт интересов: исследование выполнено при финансовой поддержке компании Октафарма.

Korsunsky I.A.  0000-0002-7822-2477
Rumyantsev A.G.  0000-0002-1643-5960
Gordukova M.A.  0000-0002-3948-8491
Korsunsky A.A.  0000-0002-9087-1656
Kudlay D.A.  0000-0003-1878-4467
Filipenko M.L.  0000-0002-8950-5368

Литература

1. Capucine Picard, Waleed Al-Herz, Aziz Bousfiha, Jean-Laurent Casanova, Talal Chatila, Mary Ellen Conley, Charlotte Cunningham-Rundles, Amos Etzioni, Steven M. Holland, Christoph Klein, Shigeaki Nonoyama, Hans D. Ochs, Eric Oksenhendler, Jennifer M. Puck, Kathleen E. Sullivan, Mimi L K. Tang, Jose Luis Franco, H. Bobby Gaspar. Primary Immunodeficiency Diseases: an Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency 2015. *Journal of Clinical Immunology*. 2015; 35: 696–726.
2. Collier F, Tang M, Ponsonby AL, Vuillermin P. Flow cytometric assessment of cord blood as an alternative strategy for population-based screening of severe combined immunodeficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2013; 131 (4): 1251–1252.
3. Douek DC, McFarland RD, Keiser PH, Gage EA, Massey JM, Haynes BF, Polis MA, Haase AT, Feinberg MB, Sullivan JL, Jamieson BD, Zack JA, Picker LJ, Koup RA. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature*. 1998; 17 (39): 690–695.
4. Chan K, Puck JM. Development of population-based newborn screening for severe combined immunodeficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2005; 115: 391–398.
5. Dorsey M, Puck J. Newborn Screening for Severe Combined Immunodeficiency in the US: Current Status and Approach to Management. *Int. J. Neonatal Screen*. 2017; 3 (2): 15.
6. Kwan A, Abraham RS, Currier R, Brower A, Andruszewski K, Abbott JK, Baker M, Ballou M, Bartoshesky LE, Bonilla FA, Brokopp C, Brooks E, Caggana M, Celestin J, Church JA, Comeau AM, Connolly JA, Cowan MJ, Cunningham-Rundles C, Dasu T, Dave N, De La Morena MT, Duffner U, Fong CT, Forbes L, Freedenberg D, Gelfand EW, Hale JE, Hanson IC, Hay BN, Hu D, Infante A, Johnson D, Kapoor N, Kay DM, Kohn DB, Lee R, Lehman H, Lin Z, Lorey F, Abdel-Mageed A, Manning A, McGhee S, Moore TB, Naides SJ, Notarangelo LD, Orange JS, Pai SY, Porteus M, Rodriguez R, Romberg N, Routes J, Ruehle M, Rubenstein A, Saavedra-Matiz CA, Scott G, Scott PM, Secord E, Seroogy C, Shearer WT, Siegel S, Silvers SK, Stiehm ER, Sugerman RW, Sullivan JL, Tanksley S, Tierce ML 4th, Verbsky J, Vogel B, Walker R, Walkovich K, Walter JE, Wasserman RL, Watson MS, Weinberg GA, Weiner LB, Wood H, Yates AB, Puck JM, Bonagura VR. Newborn screening for severe combined immunodeficiency in 11 screening programs in the United States. *Journal of the American Medical Association*. 2014; 312: 729–738.
7. King JR, Hammarström L. Newborn Screening for Primary Immunodeficiency Diseases. History, Current and Future practice. *J. Clin. Immunol*. 2018; 38: 56–66.
8. Nakagawa N, Imai K, Kanegane H, Sato H, Yamada M, Kondoh K, Okada S, Kobayashi M, Agematsu K, Takada H, Mitsuiki N, Oshima K, Ohara O, Suri D, Rawat A, Singh S, Pan-Hammarström Q, Hammarström L, Reichenbach J, Seger R, Ariga T, Hara T, Miyawaki T, Nonoyama S. Quantification of κ -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.
9. Корсунский И.А., Пушкова Е.С., Зимин С.Б., Гордучкова М.А., Давыдова Н.В., Продеус А.П., Корсунский А.А. Выявление синдрома Ниймеген с помощью исследования уровней TREC и KREC методом ПЦР в режиме реального времени. *Доктор.Ру. Педиатрия*. 2017; 15 (144): 30–32.
10. Образцов И.А., Продеус А.П., Румянцев А.Г. Экзационные кольца Т-клеточного рецептора и рекомбинационные кольца В-делеционного элемента: иммунобиология, подходы к оценке применения в клинической практике.

Российский иммунологический журнал. 2015; 9 (18) (3): 250–251.

11. Корсунский И.А., Гордукова М.А., Козлов И.Г., Продеус А.П., Корсунский А.А. Клинические и эпидемиологические аспекты первичных иммунодефицитных состояний и их раннего обнаружения. Медицинская иммунология. 2017; 19 (5): 505–512.

12. Korsunskiy IA, Blyuss O, Gordukova MA, Davydova NV, Gordleeva SY, Molchanov R, Asmanov AI, Peshko D, Zinovieva NV, Zimin SB, Lazarev VV, Salpagarova A, Filipenko ML, Kozlov IG, Prodeus AP, Korsunskiy AA, Hsu P, Munblit DB. TREC and KREC levels as a predictors of lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry. *Frontiers in Physiology*. 2018. doi: 10.3389/fphys.2018.01877.

13. Гордукова М.А., Оскорбин И.П., Мишукова О.В.,

Зимин С.Б., Зиновьева Н.В., Давыдова Н.В., Смирнова А.С., Никитина И.А., Корсунский И.А., Филипенко М.Л., Продеус А.П. 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.

14. Корсунский И.А., Гордукова М.А., Смирнова А.С., Мунблит Д.Б., Давыдова Н.В., Козлов И.Г., Продеус А.П., Корсунский А.А., Румянцев А.Г. Целесообразность неонатального скрининга первичных иммунодефицитных состояний. *Русский медицинский журнал*. 2018; 9: 29–32.

15. Wong FC, Lo YM. Prenatal diagnosis innovation: genome sequencing of maternal plasma. *Annu. Rev. Med.* 2016; 67: 419–432.

© Коллектив авторов, 2019

DOI: 10.24110/0031-403X-2019-98-3-54-59
<https://doi.org/10.24110/0031-403X-2019-98-3-54-59>

Д.Н. Балашов, С.Н. Козловская, С.А. Радыгина, А.Л. Лаберко, Э.Р. Султанова,
 А.Н. Шелихова, Ю.А. Родина, А.Ю. Щербина, А.А. Масчан

УСПЕХИ ПРОВЕДЕНИЯ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПРИ СИНДРОМЕ ВИСКОТТА–ОЛДРИЧА

Национальный Медицинский Исследовательский Центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева, Москва, РФ



Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) является доступным радикальным методом лечения синдрома Вискотта–Олдрича (СВО). Цель исследования – оценка эффективности ТГСК при СВО на основе технологии клеточного моделирования трансплантата с редукцией токсичности подготовительной терапии. Материалы и методы исследования: с 2012 по 2018 гг. проведено 40 ТГСК от совместимого неродственного (n=24) и гаплодидентичного (n=16) доноров при СВО с применением метода TCRαβ+/CD19+ деплеции трансплантата для профилактики реакции трансплантат против хозяина (РТПХ). У всех пациентов использованы режимы кондиционирования с редуцированной токсичностью на основе тресульфана (42 г/м²) и флударбина (150 мг/м²); у 29 пациентов в качестве дополнительного алкилирующего агента применяли мельфалан (140 мг/м²), а у 22 из них к терапии были добавлены Г-КСФ и плериксафор. Во всех случаях в качестве серотерапии использовали антиtimoцитарный глобулин. Результаты: медиана наблюдения за пациентами составила 23 мес (1,2–23,6 мес). Частота развития РТПХ – 22,5%, при полном отсутствии тяжелых форм (III–IV стадии) данного осложнения. Общая выживаемость во всей исследуемой когорте пациентов с СВО составила 92,4%. Причиной летальных исходов являлись вирусные (n=2) и бактериальные инфекции (n=1). Показатели общей выживаемости, частоты развития РТПХ не имели статистически значимых различий при ТГСК от неродственного и гаплодидентичного доноров. Наибольшая эффективность ТГСК за счет редукции частоты развития дисфункций трансплантата была продемонстрирована у пациентов после кондиционирования с Г-КСФ и плериксафором; бессобытийная выживаемость в этой группе составила 95,5%. Заключение: в настоящее время ТГСК при СВО является эффективным методом терапии. Высокие показатели выживаемости при трансплантации от альтернативных

Контактная информация:

Балашов Дмитрий Николаевич – д.м.н., ведущий научный сотрудник отдела оптимизации лечения и профилактики осложнений трансплантации гемопоэтических стволовых клеток ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» МЗ РФ, зав. отделением трансплантации гемопоэтических стволовых клеток № 2 ФГБУ «ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» МЗ РФ
 Адрес: Россия, 117997, ГСП-7, Москва, ул. Саморы Машела, 1
 Тел.: (926) 579-18-17, E-mail: bala8@yandex.ru
 Статья поступила 27.04.19, принята к печати 20.05.19.

Contact Information:

Balashov Dmitriy Nikolayevich – MD., leading researcher of Department of Optimization of Treatment and Prevention of Complications of Hematopoietic Stem Cell Transplantation, National Scientific-Practical Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology n.a. D. Rogachev
 Address: Russia, 117997, Moscow, SPS-7, Samory Mashela str., 1
 Tel.: (926) 579-18-17, E-mail: bala8@yandex.ru
 Received on Apr. 27, 2019, submitted for publication on May 20, 2019.