



<https://doi.org/10.34883/PI.2022.11.3.003>
УДК 616-097:577.213.32



Полякова Е.А.✉, Стёганцева М.В., Луцкович Д.В., Белевцев М.В.
Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии
и иммунологии, Минск, Беларусь

Оценка состояния звеньев Т- и В-клеточного иммунитета на основе использования технологии определения эксцизионных колец ДНК Т- и В-клеточного рецептора (TREC/KREC)

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Полякова Е.А. – концепция и дизайн исследования; Стёганцева М.В. – обзор литературы, концепция создания калибраторов; Луцкович Д.В. – моделирование конструкции плазмидных стандартов; Белевцев М.В. – контроль выполнения исследования, редактирование.

Подана: 06.06.2022

Принята: 05.09.2022

Контакты: polyakovakat86@gmail.com

Резюме

Цель. Разработать эффективный молекулярно-биологический метод количественного определения кольцевых фрагментов ДНК Т- и В-клеточного рецептора в периферической крови для диагностики нарушений состояния клеточного иммунитета.

Материалы и методы. Объектом исследования служили образцы периферической крови 20 здоровых детей в возрасте 9,0 (1,0–15,0) года и 30 детей с первичным и вторичным иммунодефицитом в возрасте 7,16 (0,1–18,0) года, контингент которых включал пациентов с диагнозами «первичный иммунодефицит» (n=21) и «вторичный иммунодефицит» после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (n=9).

Результаты. Согласно полученным результатам, созданные калибраторы характеризовались высокой стабильностью и воспроизводимостью получаемых при их использовании результатов. В результате валидации разработанной технологии, в основе которой лежит полимеразная цепная реакция в реальном времени, установлено, что данная технология лабораторного исследования обладает высокой чувствительностью, специфичностью и эффективностью.

Заключение. Разработанная технология позволяет выявить различные виды нарушений с вовлечением иммунного механизма, которые сопровождаются дефицитом Т- и В-клеточного звена иммунитета.

Ключевые слова: TREC, KREC, полимеразная цепная реакция в реальном времени

Polyakova E.✉, Stegantseva M., Lutskevich D., Belevtsev M.
Republican Scientific and Practical Center of Children's Oncology, Hematology
and Immunology, Minsk, Belarus

Evaluation of T- and B-cell Immunity Based on the T- and B-cell Receptor DNA Excision Circles (TREC/KREC) Detection Technology

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Polyakova E. – concept and design of the study; Stegantseva M. – literature review, concept of calibrators design; Lutskevich D. – modeling the design of plasmid standards; Belevtsev M. – control of the study, editing.

Submitted: 06.06.2022

Accepted: 05.09.2022

Contacts: polyakovakat86@gmail.com

Abstract

Purpose. Develop an effective molecular-biological method for quantitative determination of T- and B-cell receptor DNA circle fragments in peripheral blood to diagnose cellular immunity disorders.

Materials and methods. Subjects of the study were peripheral blood samples of 20 healthy children aged 9.0 (1.0–15.0) years and 30 children with primary and secondary immunodeficiency aged 7.16 (0.1–18.0) years, whose contingent included patients diagnosed with primary immunodeficiency (n=21) and secondary immunodeficiency after hematopoietic stem cell transplantation (n=9).

Results. According to the results obtained, the created calibrators were characterized by high stability and reproducibility of the results obtained when using them. As a result of the validation of the developed technology based on "real-time" polymerase chain reaction, it was found that this technology of laboratory examination has high sensitivity, specificity and efficiency.

Conclusion. The developed technology makes it possible to identify various types of disorders with involvement of the immune mechanism, which are accompanied by deficiency of T- and B-cell immunity.

Keywords: TREC, KREC, real-time polymerase chain reaction

■ ВВЕДЕНИЕ

Кольцевые фрагменты ДНК Т-клеточного рецептора (TREC) (с англ. T-cell receptor excision circles) и В-клеточного рецептора (KREC) (с англ. kappa-deleting recombination excision circles) представляют собой продукты рекомбинации, которые образуются на ранних этапах формирования Т- и В-клеточного рецепторов [1]. Поскольку TREC и KREC не способны к репликации и сохраняются после каждого клеточного деления в клетке, определение их количественного содержания в периферической крови может быть использовано для оценки состояния продукционной функции тимуса и костного мозга [2]. Определение TREC и KREC при неонатальном скрининге в Соединенных Штатах Америки (США) и европейских странах демонстрирует, что данный



способ выявления дефицита иммунитета при первичных иммунодефицитах (ПИД) является эффективной технологией и позволяет выявить детей на ранних стадиях заболевания [3–6]. Данный метод может быть также использован для оценки восстановления Т- и В-клеточного звена иммунитета у пациентов после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) [7–9]. В мире существует несколько разработанных тест-систем: одни из них позволяют определять только TREC, другие – как TREC, так и KREC одновременно [5, 10]. На территории Республики Беларусь данные наборы реагентов не зарегистрированы и использование их в настоящее время не представляется возможным.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработать эффективный молекулярно-биологический метод количественного определения кольцевых фрагментов ДНК Т- и В-клеточного рецептора в периферической крови для диагностики нарушений состояния клеточного иммунитета.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили образцы периферической крови 20 здоровых детей в возрасте 9,0 (1,0–15,0) года и 30 детей с первичным и вторичным иммунодефицитом в возрасте 7,16 (0,1–18,0) года, контингент которых включал пациентов с диагнозами «первичный иммунодефицит» (n=21) и «вторичный иммунодефицит» после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (n=9).

Для полимеразной цепной реакции были использованы праймеры и зонды: прямой праймер ALB (5'-tgaacaggcgaccatgctt-3'), обратный праймер (5'-ctctcctctcagaagtggtgcatat-3'), проба (5'-FAM-tgctgaacattcaccttccatgcaga-BHQ1-3'), для TREC – прямой праймер (5'-ccatgctgacacctctggtt-3'), обратный праймер (cttcattcacggttctcacga), проба (HEX-cacgggtgatgcataggcacctgc-BHQ1-3'), для KREC – прямой праймер (5'-tcagcgccattacgtttct-3'), обратный праймер (5'-gtgagggacagcagcc-3'), проба (5'-ROX-ccagctcttaccctagagtttctgcacgg-BHQ2-3') (Праймтех, Беларусь) [11–13].

Количество TREC и KREC определяли методом ПЦР-РВ с использованием амплификатора CFX96 (Bio-Rad, США).

В качестве калибраторов использовались серийные разведения плазмидной ДНК, содержащие вставки TREC, KREC, альбумин с концентрацией 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 копий в 5 мкл.

Количество копий TREC, KREC на 1 млн клеток рассчитывалось по формуле: $[1\ 000\ 000 \times \text{среднее SQ TREC (KREC)}] / \text{среднее SQ ALB} / 2$.

Реакционная смесь состояла из 12,5 мкл ArtMix (АртБиоТех, Беларусь), 6,25 мкл воды и стока праймеров с концентрацией 6 пмоль для прямого и обратного праймеров и 4 пмоль для флуоресцентной пробы. Постановка осуществлялась в дублях. Данные анализировались в режиме Real_time RCR Data Analysis (Bio-Rad, США).

Рестрикция. ПЦР-продукты и плазмиду pCR2.1-ТОПО подвергали рестрикции эндонуклеазами (New England Biolabs, Великобритания), необходимыми для клонирования согласно инструкции производителя. По окончании реакции проводили гель-электрофорез в 2%-м агарозном геле, фрагменты соответствующего размера вырезали, очищали и измеряли концентрацию продуктов рестрикции и плазмиды.

Лигирование. Лигирование ПЦР-продуктов в вектор проводили с использованием набора реагентов для лигазной реакции (Thermo Fisher, США) согласно прилагаемой к набору инструкции. Соотношение концентраций вставки к вектору определяли с помощью программы «Ligation Calculator» (http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_Input.html).

Реакция трансформации компетентных клеток *E. coli*. В качестве компетентных клеток использовали штамм XL10Gold бактерии *E. coli*. После успешной трансформации выделяли плазмидную ДНК набором PureLink HiPure Plazmid miniprep (Invitrogen, США). Выделенную плазмиду секвенировали для определения наличия встроенного фрагмента.

Секвенирование и проверка их аутентичности. Для реакции терминации использовали, набор реагентов BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems™, США), согласно инструкции производителя.

Очистка продуктов реакции терминации от несвязавшихся флуоресцентно-меченных дидезоксинуклеотидов проводили путем преципитации ДНК с 0,125М ЭДТА и 96%-м этиловым спиртом. Секвенирование выполняли с использованием аппарата для капиллярного секвенирования (Applied Biosystems 3130).

Для анализа использовали программы Sequencing Analysis 5.2 и Bioedit. Референсные последовательности находятся в онлайн базе Ensembl.org.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве гена внутреннего контроля был выбран ген альбумин, специфичный для гемопоэтической ткани. Праймеры для TREC были подобраны на участок линейного соединения генов дельта-цепи, ограниченного делетирующими последовательностями. Праймеры на KREC подбирали на делетирующий фрагмент IGH (табл. 1).

Прямой и обратный праймеры были использованы для амплификации и последующего клонирования. Пары праймеров с флуоресцентной меткой были использованы для мультиплексной ПЦР в реальном времени.

Количественная ПЦР основана на использовании калибраторов. В качестве калибраторов были разработаны и получены плазмидные стандарты на основе вектора pCR2.1-TOPO Vector (Invitrogen, США). В выбранный вектор были клонированы амплифицированные фрагменты контрольного гена, TREC и KREC. Для проектирования, моделирования и визуализации процесса клонирования использовали программное обеспечение SnapGene Software.

Процесс клонирования состоял из последовательных этапов.

Проводили амплификацию последовательности альбумина, TREC и KREC с использованием геномной ДНК, полученной от здорового донора и специфичных праймеров.

Праймеры для альбумина содержали на 5' конце последовательности сайтов рестрикции эндонуклеаз Not1 и XhoI (Праймтех, Беларусь), для KREC – сайты рестрикции HindIII для обоих праймеров с соответствующим количеством фланкирующих нуклеотидов (табл. 3). Для TREC были использованы пары праймеров, не содержащие в своей последовательности рестрикционных сайтов по причине того, что за счет топоизомеразы I pCR2.1-TOPO вектора встраивание происходит по акцепторным ТА-концам вектора.



ПЦР-амплификацию проводили в объеме 25 мкл и включающем: 5 мкл 5-кратного буфера, 0,2 мкл 25 мМ ДНТФ, 1,5 мкл 25 мМ $MgCl_2$, 0,15 мкл 5Ед термостабильной полимеразы, по 10 пмоль мкл прямого и обратного праймеров 15,9 мкл воды. Для амплификации использовали следующие температурные условия: 95 °С – 10 мин., 35 циклов (95 °С – 15 сек., отжиг 60 °С – 20 сек.), 72 °С – 30 сек., 72 °С – 5 мин., 4 °С – 2 мин.

Эффективность ПЦР оценивали методом электрофореза в 1,5%-м агарозном геле при напряжении 150 В и силе тока 150 мА – 40 мин. в аппарате для горизонтального электрофореза. Визуализацию результата электрофореза проводили с использованием системы гель-документирования и программного обеспечения. Далее проводили очистку полученного ПЦР-продукта соответствующего размера с использованием набора реагентов для очистки ПЦР продукта из геля (АртБиоТех).

Вначале проводили клонирование последовательности TREC в вектор, для этого очищенный ПЦР-продукт лигировали в плазмидный вектор pCR2.1-TOPO Vector. Трансформировали лигазной смесью клетки XL10Gold бактерии *E. coli*. Отбирали позитивные трансформанты, культивировали, выделяли плазмидную ДНК. Выделенную плазмиду секвенировали для определения наличия встроенного фрагмента.

Следующий этап – клонирование последовательности KREC. Для этого очищенный ПЦР-продукт KREC и полученную плазмиду pCR2.1-TOPO, содержащую вставку TREC, подвергали рестрикции эндонуклеазой HindIII (New England Biolabs, Великобритания) согласно инструкции производителя. Продукты рестрикции также подвергали гель-электрофорезу, фрагменты вырезали, очищали и измеряли концентрацию продуктов рестрикции KREC. Лигировали фрагмент KREC в вектор, проводили трансформацию, выделение плазмиды из культивированной среды и секвенирование для определения наличия встроенного фрагмента.

Клонирование последовательности контрольного гена проводилось после этапов успешного встраивания TREC и KREC в вектор. Очищенный ПЦР-продукт альбумина и плазмиду pCR2.1-TOPO, содержащую последовательность TREC vs KREC, подвергали рестрикции NotI и XhoI (New England Biolabs, Великобритания) согласно инструкции производителя. После гель-электрофореза продукты рестрикции очищали, измеряли концентрацию продукта рестрикции ALB и плазмиды, лигировали, трансформировали в клетки *E. coli*, выделяли плазмиду из культивированной среды и секвенировали.

По результатам клонирования была получена плаزمида, несущая 3 вставки: ALB – TREC – KREC, как представлено на рис. 1 [13].

Линеаризировали плазмиду посредством рестрикции эндонуклеазой Xba I. Измеряли концентрацию при помощи Calculator for determining the number of copies of a template (<http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>).

Для построения калибровочной кривой использовали серийные разведения с шагом в 10 раз плазмидной ДНК до получения концентраций 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 копий в 5 мкл. Оценивали полученные разведения при помощи калибровочных кривых после проведения ПЦР-РВ, данные представлены в табл. 1.

Для оценки воспроизводимости метода была проведена серия ПЦР-реакций с одним образцом ДНК в 10 повторах внутри серии, в одном запуске, в 10 последовательных запусках.



Рис. 1. Генетическая карта плазмиды, содержащая ALB – TREC – KREC в векторе pCR2.1-TOPO
 Fig. 1. Genetic map of the plasmid containing ALB – TREC – KREC in the pCR2.1-TOPO

Таблица 1
 Проверка стандартных разведений плазмидной ДНК ALB – TREC – KREC с использованием ПЦР-РВ
 Table 1
 Verification of standard dilutions of plasmid DNA ALB – TREC – KREC using PCR-RQ

Количество	Среднее значение ± (SD) Ct ALB	Среднее значение ± (SD) Ct TREC	Среднее значение ± (SD) Ct KREC
10 ⁵	21,42±0,12	22,06±0,09	22,11±0,10
10 ⁴	24,76±0,19	25,01±0,12	25,14±0,26
10 ³	27,71±0,21	28,04±0,10	28,21±0,19
10 ²	30,82±0,17	31,12±0,24	31,29±0,22
10 ¹	33,78±0,14	34,02±0,16	34,06±0,18
Наклон	3,337	3,335	3,323
Коэффициент корреляции, R ²	0,989	0,990	0,991
Эффективность, %	98,0	99,5	99,9



Таблица 2
Результаты оценки воспроизводимости метода мультиплексного варианта ПЦР-РВ
Table 2
Results of the reproducibility assessment of the multiplex PCR-RQ

		ALB		TREC		KREC	
		Ct	Число копий	Ct	Число копий	Ct	Число копий
Внутрисерийная (n=10)	Среднее значение	22,3	7,9×10 ⁴	30,0	1,9×10 ²	30,1	2,3×10 ²
	Коэффициент вариации (%)	1,5	2,5	1,2	9,5	1,1	11,9
Межсерийная (n=10)	Среднее значение	21,6	8,0×10 ⁴	30,3	1,7×10 ²	31,3	7,4×10 ¹
	Коэффициент вариации (%)	1,3	9,8	0,5	7,6	2,4	17,7

Для оценки точности и повторяемости результатов для стандартных разведений контрольного гена альбумина, TREC и KREC, а также для количественных показателей, полученных внутри серии и между сериями ПЦР-РВ, были рассчитаны показатели коэффициента вариации: отношения стандартного отклонения к среднему значению. Полученные данные представлены в табл. 2.

Коэффициент вариации равен отношению стандартного отклонения к среднему значению.

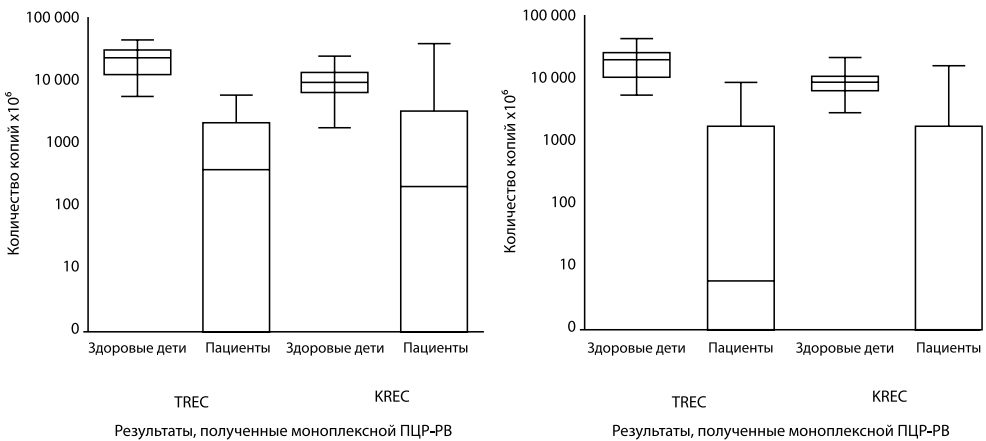


Рис. 2. Результаты значений TREC и KREC, полученные методом моноплексной и мультиплексной ПЦР-РВ по результатам валидации
Fig. 2. Results of TREC and KREC values obtained by monoplex and multiplex PCR-PV validation

При оценке ΔCt ALB, TREC, KREC наблюдалась средняя вариация данных, которая не превышала 20%. Таким образом, мультиплексная ПЦР-РВ для определения количества копий TREC и KREC позволяет использовать данный метод в лабораторной практике.

Проведено экспериментальное доказательство того, что данная технология может быть использована для определения дефицита иммунитета.

Для валидации разработанного метода мультиплексной ПЦР-РВ в качестве референсного метода для оценки сопоставимости результатов использовали метод моноплексной ПЦР-РВ [11].

Были определены значения TREC и KREC у пациентов с первичными (n=21) и вторичными (n=9) иммунодефицитами, а также у здоровых лиц детского возраста (n=20). Результаты отражены на рис. 2.

Для сравнения данных, полученных с применением референсного метода и мультиплексной ПЦР, использовали метод линейной регрессии. Для TREC коэффициент детерминации (R^2) составил 0,92 ($p<0,001$), для KREC – 0,83 ($p<0,001$).

При определении значимости статистических различий при помощи непараметрического критерия Манна – Уитни не было выявлено значимых различий между референсным методом и разработанной технологией TREC ($U=1122$, $p=0,57$), KREC ($U=1065$, $p=0,33$).

С целью оценки диагностической значимости разработанной технологии были рассчитаны показатели диагностической чувствительности, диагностической специфичности, диагностической эффективности, предсказательной ценности положительного и отрицательного результата. Полученные данные отражены в табл. 3 [14, 15].

Для установления с использованием данной технологии точки разделения был осуществлен ROC-анализ с построением кривой, которая отражает взаимную зависимость вероятностей ложноположительных и истинно положительных результатов. Данные отражены на рис. 3.

Таблица 3
Оценка диагностической ценности технологии определения TREC/KREC
Table 3
Assessment of Diagnostic Value of TREC/KREC Technology

Критерий	Формула для расчета	Значение TREC	Значение KREC
Диагностическая чувствительность, %	$a/(a+c)$ = доля истинно положительных результатов в группе пациентов	93,9	91,4
Диагностическая эффективность, %	$(a+d)/(a+b+c+d)$ = доля истинных результатов среди всех результатов теста	96,0	94,0
Диагностическая специфичность, %	$d/(b+d)$ = доля истинно отрицательных результатов в группе здоровых	100,00	100,00
Предсказательная ценность положительного результата, %	$a/(a+b)$ = доля истинно положительных результатов среди всех положительных результатов	100,00	100,00
Предсказательная ценность отрицательного результата, %	$d/(c+d)$ = доля истинно отрицательных результатов среди всех отрицательных результатов	89,4	83,3

Примечания: а – истинно положительный результат, b – ложноположительный результат, c – ложноотрицательный результат, d – истинно отрицательный результат.

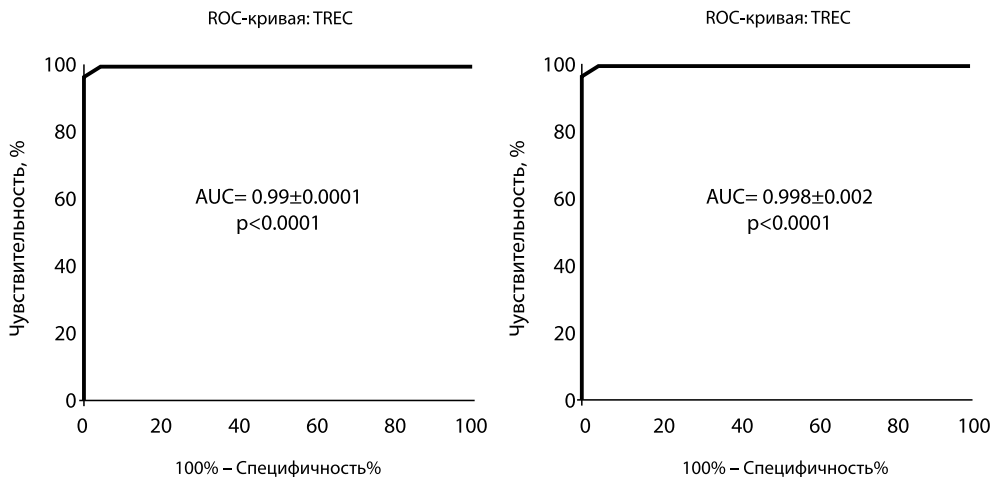


Рис. 3. Результат построения ROC-кривой для оценки чувствительности и специфичности для TREC и KREC, определенных методом мультиплексной ПЦР-PB
Fig. 3. Result of ROC curve for sensitivity and specificity assessment for TREC and KREC determined by multiplex PCR-RQ method

Для TREC площадь под ROC-кривой составила $0,99 \pm 0,0001$ (с диагностической чувствительностью и специфичностью 93,3% и 100% соответственно). Для KREC площадь под ROC-кривой составила $0,9998 \pm 0,002$ (с диагностической чувствительностью и специфичностью 91,4% и 100% соответственно).

Для возможности практического использования тест-систем, методов и технологий в лабораторной диагностике оптимальным является соотношение показателей высокой диагностической чувствительности (80% и более) и высокой диагностической специфичности (80% и более) [14].

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанная технология определения значений TREC и KREC методом мультиплексной ПЦР в режиме реального времени обладает высокой чувствительностью, специфичностью и эффективностью и может быть использована в клинической лабораторной практике для выявления недостаточности функционального состояния Т- и В-клеточного звеньев иммунитета.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Van Zelm M.C., van der Burg M., Langerak A.W., van Dongen J.J.M. PID comes full circle: Applications of V(D)J recombination excision circles in research, diagnostics and newborn screening of primary immunodeficiency disorders. *Frontiers in Immunology*. 2011; 2:1–9. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2011.00012>.
2. Van Zelm M.C., Szczepański T., Van Der Burg M., Van Dongen J.J.M. Replication history of B lymphocytes reveals homeostatic proliferation and extensive antigen-induced B cell expansion. *Journal of Experimental Medicine*. 2007;204(3):645–655. Available at: <https://doi.org/10.1084/jem.20060964>.
3. Puck J.M. Laboratory Technology for Population-based Screening for SCID in Neonates: The Winner Is T-cell Receptor Excision Circles (TRECs). *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2013;3:607–616.

4. Chan K., Puck J.M. Development of population-based newborn screening for severe combined immunodeficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2005;115(2):391–398. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.10.012>
5. Borte S., Von Döbeln U., Fasth A., Wang N., Janzi M., Winiarski J., Sack U., Pan-Hammarström Q., Borte M., Hammarström L. Neonatal screening for severe primary immunodeficiency diseases using high-throughput triplex real-time PCR. *Blood*. 2012; 119(11):2552–2555. Available at: <https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-371021>
6. 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., Nonoyama S. Quantification of κ-deleting recombination excision circles in Guthrie cards for the identification of early B-cell maturation defects. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2011;128(1):223–225.e2. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.01.052>.
7. Sottini A., Ghidini C., Zanotti C. et al. Simultaneous quantification of recent thymic T-cell and bone marrow B-cell emigrants in patients with primary immunodeficiency undergone to stem cell transplantation. *Clinical Immunology*. 2012;136:217–227.
8. Sairafi D., Mattsson J., Uhlin M., Uzunel M. Thymic function after allogeneic stem cell transplantation is dependent on graft source and predictive of long term survival. *Clinical Immunology*. 2012;142(3):343–350.
9. Polyakova E., Stegantseva M., Belevtsev M. Monitoring of post-transplant naïve lymphocytes reconstitution in PID patients using TREC and KREC quantification. Virtual annual meeting: immune deficiency and dysregulation North American conference: selected abstr. from the 12th annual meeting of the Clin. Immunol. Soc.J. of Clin. Immunol. 2021;1(41):111. Abstr. 182.
10. Neonatal E., Kit T. iMedPub Journals MyTREC RealTime qPCR Assay Reagent Kit for Quantification of Human T-Cell Receptor Excision Circles (TRECs) Applications of TREC Assay Kit Contents GenenPlus MyTREC Kit versus Perkin. 2015;2–5. Available at: <https://doi.org/10.21767/2472-1158.100004>
11. Polyakova E.A., Stegantseva M.V., Guryanova I.E., Sakovich I.S., Belevtsev M.V. (2019) T- and B-cell receptor ring molecules (TREC/KREC) in differential diagnosis of primary immunodeficiencies. *Science and innovation*. 2019;8:75–78. (in Russian)
12. Stegantseva M.V., Guryanova I.E., Sakovich I.S., Polyakova E.A., Belevtsev M.V. Method for quantitative determination of ring molecules of T- and B-cell receptor DNA, TREC and KREC, in peripheral blood using real-time PCR. *Eurasian Journal of Oncology*. 2017;3:449–456. (in Russian)
13. Polyakova E.A., Stegantseva M.V., Aleshkevich S.N. et al. Determination of excision circles of T- and B-cell receptor DNA by multiplex real-time PCR: instructions for use. 2020; Minsk, 24 p. (In Russian). Available at: <https://medcenter.by/documents-downloads/publicacii/neonatologiapediatria/instrukcija-po-primeneniju-036-0520.pdf>.
14. Kostyuk S.A. Validation of molecular biological methods of laboratory diagnosis. *Med. nov.*, 2012;4:16–19. (in Russian)
15. Kishkun A.A. Guide to laboratory methods of diagnosis for doctors and paramedics providing primary care. 2007; Moscow: GEOTAR-Media; [B.m.]: ASMOC, 800 p. (in Russian)