

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TADEJ ŠVENCBIR

**MAGISTRSKA NALOGA**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TADEJ ŠVENCBIR

**ŠTUDIJ IZVEDLJIVOSTI PRESEJALNEGA DOLOČANJA  
BIOLOŠKIH OZNAČEVALCEV KREC IN TREC V PERIFERNI  
KRVI TER NJIHOVE POTENCIALNE KLINIČNE  
UPORABNOSTI PRI DIAGNOSTIKI PRIMARNIH IMUNSKIH  
POMANJKLJIVOSTI**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo sem opravljal v laboratoriju Službe za specialno laboratorijsko diagnostiko Pediatrične klinike Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana.

## Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorjema prof.Borutu Božiču in prof.Tadeju Avčinu, delovni mentorici doc.Maruši Debeljak, sodelavcem v laboratoriju za specialno laboratorijsko diagnostiko Pediatrične klinike, sošolcem, prijateljem in družini za podporo in pomoč med študijem in izdelavo magistrske naloge.

## Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelal samostojno pod mentorstvom prof.dr.Boruta Božiča mag. farm., spec. med. biokem in somentorstvom prof.dr.Tadeja Avčina, dr.med, spec. pediater.

Tadej Švencbir

## 1. Kazalo vsebine

1.	Uvod .....	1
1.1.	Prirojene imunske pomanjkljivosti.....	1
1.1.1.	Težka kombinirana imunska pomanjkljivost .....	3
1.2.	Zgodovinski pregled presejalnih testov za PID.....	4
1.2.1.	Predlagani presejalni testi za SCID .....	4
1.2.2.	TREC.....	5
1.2.3.	KREC .....	6
1.3.	PCR .....	6
1.3.1.	qPCR .....	7
1.3.2.	Hidrolizirajoče sonde.....	8
1.3.3.	Kinetika reakcije PCR.....	9
1.3.4.	Obdelava in interpretacija podatkov.....	10
2.	Namen dela in delovne hipoteze .....	11
2.1.	Načrt dela .....	11
2.2.	Hipoteze .....	11
3.	Materiali in metode.....	12
3.1.	Materiali .....	12
3.2.	Naprave .....	12
3.3.	Metode.....	13
3.3.1.	Pridobivanje vzorcev bolnih preiskovancev .....	13
3.3.2.	Pridobivanje vzorcev zdravih preiskovancev.....	13
3.3.3.	Pridobivanje vzorcev odraslih preiskovancev .....	14
3.3.4.	Izolacija DNA QIAamp DNA micro .....	14
3.3.5.	Protokol SCREEN-ID TRM Leipzig .....	15
3.3.6.	PCR protokol SCREEN-ID TRM Leipzig .....	17
3.3.7.	Reakcijska mešanica Roche modular TREC/KREC .....	17
3.3.8.	PCR protokol Roche modular TREC/KREC .....	18
3.3.9.	Izračun koncentraciji po metodi Roche modular TREC/KREC .....	18
3.3.10.	Priprava vzorcev za umeritvene krivulje .....	19
4.	Rezultati in razprava.....	20
4.1.	Komplet Roche modular TREC/KREC.....	21
4.1.1.	Koncentracije DNA v izoliranih vzorcih .....	21
4.1.2.	Odziv označevalcev .....	21

4.1.3.	Umeritvene krivulje.....	22
4.1.4.	Enojne in multiple reakcije.....	25
4.1.5.	Rezultati vzorcev .....	26
4.2.	Komplet TRM Leipzig SCREEN-ID.....	31
4.2.1.	Umeritvene krivulje TRM Leipzig SCREEN-ID .....	31
4.2.2.	Rezultati vzorcev TRM Leipzig SCREEN-ID.....	33
4.3.	Primerjava metod TRM Leipzig SCREEN-ID in Roche modular TREC/KREC.....	34
4.4.	Določitev mejnih vrednosti .....	36
4.5.	Cena.....	37
5.	Sklep .....	39
6.	Bibliografija .....	40

## Kazalo tabel

Tabela I	Mednarodna klasifikacija PID .....	2
Tabela II	Nastavitve kanalov qPCR naprave pri metodi SCREEN-ID .....	17
Tabela III	Časovni program qPCR naprave pri metodi SCREEN-ID .....	17
Tabela IV	Reakcijska mešanica Roche modular TREC/KREC.....	17
Tabela V	Nastavitve kanalov qPCR naprave pri metodi Roche modular TREC/KREC.....	18
Tabela VI	Časovni program qPCR naprave pri metodi Roche modular TREC/KREC.....	18
Tabela VII	Vzorci zdravih preiskovancev .....	20
Tabela VIII	Seznam vzorcev bolnih preiskovancev .....	20
Tabela IX	Seznam vzorcev odraslih oseb.....	21
Tabela X	Rezultati bolnikov po metodi Roche modular TREC/KREC .....	29
Tabela XI	Seznam vzorcev analiziranih s kompletom TRM Leipzig SCREEN-ID .....	34
Tabela XII	Korelacija med metodama Roche modular TREC/KREC ter TRM Leipzig SCREEN-ID.....	35

## Kazalo grafov

Graf 1	Umeritvena krivulja Roche modular TREC/KREC standard TREC .....	22
Graf 2	Umeritvena krivulja Roche modular TREC/KREC standard KREC .....	23
Graf 3	Umeritvena krivulja Roche modular TREC/KREC standard MSTN.....	23
Graf 4	Umeritvena krivulja Roche modular TREC/KREC DBS KREC.....	24
Graf 5	Umeritvena krivulja Roche modular TREC/KREC DBS TREC .....	24
Graf 6	Umeritvena krivulja Roche modular TREC/KREC DBS MSTN.....	25
Graf 7	Primejava enojne in multiple reakcije Roche TREC.....	25
Graf 8	Primejava reakcij v singleplexu in multiplexu MSTN.....	26
Graf 9	Primejava enojne in multiple reakcije Roche KREC.....	26

Graf 10 Rezultati zdravih preiskovancev po metodi Roche modular TREC/KREC.....	27
Graf 11 Rezultati zdravih preiskovancev s ponovljenimi preiskavami po metodi Roche modular TREC/KREC.....	28
Graf 12 Rezultati vzorcev bolnikov analiziranih po metodi Roche modular TREC/KREC.....	28
Graf 13 Umeritvena krivulja TRM SCREEN-ID TREC.....	32
Graf 14 Umeritvena krivulja TRM SCREEN-ID KREC.....	32
Graf 15 Umeritvena krivulja TRM SCREEN-ID ACTB.....	33
Graf 16 Rezultati analiz s kompletom TRM Leipzig SCREEN-ID.....	34
Graf 18 Primerjava rezultatov bolnikov med metodama Roche modular TREC/KREC in TRM Leipzig SCREEN-ID.....	35
Graf 19 Predlagane mejne vrednosti.....	37

## Kazalo enačb

Enačba 1 Izračun koncentracije analita iz pripravljenega vzorca.....	19
--	----

## Kazalo slik

Slika 1 Signal fluorescence v odvisnosti od cikla reakcije.....	9
Slika 2 Krivulje vzorcev označenih z barvilom Cy5 (levo) in vzorci označeni z barvilom FAM (desno).....	22

## Seznam okrajšav

ITEM	NEEDED
Ct	Pražni cikel ( <i>angl. threshold cycle</i> )
Cy5	Ciansko barvilo 5
CVID	Navadna variabilna imunska pomanjkljivost ( <i>angl. Common Variable Immune Deficiency</i> )
DBS	Posušeni krvni madež ( <i>angl. Dried blood spot</i> )
dNTP	Deoksinukleotid trifosfat
FAM	6-karboksi fluorescein
ID	Imunokostna displazija
KREC	<i>angl. Kappa-deleting recombination excision circle</i>
MSTN	Miostatin
PCR	Verižna reakcija s polimerazo ( <i>angl. Polymerase chain reaction</i> )
PID	Primarna imunska pomanjkljivost ( <i>angl. Primary immunodeficiency</i> )
qPCR	Kvantitativni PCR v realnem času ( <i>angl. Real time quantitative polymerase chain reaction</i> )
ROX	6-karboksi-X-rodamin
TREC	T-cell receptor excision circles
SCID	Težka kombinirana imunska pomanjkljivost ( <i>angl. Severe combined immunodeficiency</i> )
XLA	Na kromosom X vezana agamaglobulinemija ( <i>angl. X-linked agammaglobulinemia</i> )

## Povzetek

Med primarne imunske pomanjkljivosti sodi približno 250 bolezni. Zapleti zaradi primarnih imunskih pomanjkljivosti se lahko začnejo že ob ali kmalu po rojstvu. Skupna značilnost primarnih imunskih pomanjkljivosti je večja nagnjenost k okužbam, prav tako pa so okužbe dlje časa trajajoče in z več zapleti kot pri zdravi populaciji. Navkljub več razvitim metodam je bila do nedavnega laboratorijska diagnostika za zgodnje odkrivanje primarnih imunskih pomanjkljivosti otežena zaradi visokih cen, slabe napovedne vrednosti preiskav, motečih celic maternalnega izvora in drugih vzrokov. Namen raziskave je bil ovrednotiti izvedljivost vrednotenja bioloških označevalcev TREC (*angl. T-cell receptor excision circles*) in KREC (*angl. Kappa-deleting recombination excision circle*). Navedena biološka označevalca nimata pomanjkljivosti prejšnjih označevalcev in bi lahko služila kot analita za presejalne teste za zgodnje odkrivanje primarnih imunskih pomanjkljivosti. Za izvedbo raziskave smo pridobili posušene krvne madeže 13 slovenskih bolnikov s primarnimi imunskimi pomanjkljivostmi, kartice 62 zdravih novorojenčkov ter kartice 3 odraslih oseb. Iz madežev smo izolirali DNA in izvedli kvantifikacijo s analiznima kompletoma dveh proizvajalcev. Obema metodama smo ugotovili ustrezno linearnost odziva. Po metodi Roche modular TREC/KREC smo uspeli 11 od 13 bolnih preiskovancev ugotoviti znižane vrednosti vsaj enega izmed analitov, po metodi TRM Leipzig SCREEN-ID pa 5 od 5 bolnih preiskovancev. Z metodo Roche modular TREC/KREC smo uspeli izmeriti vrednosti za analita TREC in KREC, ki zajameta 11 od 13 bolnih preiskovancev in nobenega zdravega otroka. Ugotovili smo, da je metoda Roche modular TREC/KREC ustrezna metoda za analizo vzorcev manjšega števila novoroječkov.

Ključne besede: primarne imunske pomanjkljivosti, posušeni krvni madeži, neonatalni presejalni test



## Abstract

Primary immunodeficiencies are a group of diseases consisting of approximately 250 diseases. Complications due to primary immune deficiencies may begin at or shortly after birth. The clinical features of primary immune deficiencies include increased probability of infections as well as longer-lasting and more complex infections than in apparently healthy children. Despite several advanced methods, laboratory diagnostics of primary immunodeficiencies has been difficult due to high prices, poor predictive value of the tests, interfering cells of maternal origin and other causes.

The aim of our study was to evaluate the feasibility of determination of biological markers TREC (T-cell receptor excision circles) and KREC (Kappa-deleting recombination excision circle). These biomarkers do not have the shortcomings of previous biomarkers and could serve as analytes for screening tests.

For this study we have gained 13 dried blood stains of Slovenian patients with primary immunodeficiency, 62 stains of healthy newborns and 3 stains of adults. From the stains, we have isolated DNA and performed quantification with assays from two manufacturers.

An appropriate response linearity was determined for both methods. With the method from Roche, we have managed to detect 11 out of 13 patients, and with the method TRM Leipzig SCREEN-ID 5 out of 5 patients. For the Roche modular TREC/KREC method, we have recommended a concentration limit for TREC and KREC analytes, which would detect 11 out of 13 patients. We have determined that Roche modular TREC/KREC method is suitable method for sample analysis of smaller number of newborns.

Keywords: primary immunodeficiency dried blood stains, neonatal screening test

# 1. Uvod

## 1.1. Prirojene imunske pomanjkljivosti

Prirojene imunske pomanjkljivosti (ang. Primary immunodeficiency diseases – PID) so redke podedovane bolezni imunskega sistema. Skupino sestavlja približno 250 poznanih bolezni (Tabela 1). Mednarodna klasifikacija deli PID na 9 skupin (1).

Skupna klinična značilnost vseh PID je povečana nagnjenost k okužbam in težje potekajoče okužbe. Pogoste so tudi okužbe z oportunističnimi mikroorganizmi. Klinični simptomi, molekularni mehanizmi, genetske mutacije in vrednosti bioloških označevalcev so v skupini PID zelo raznoliki, zato je diagnostika bolezni otežena. Jeffrey Modell Foundation je objavila seznam desetih opozorilnih znakov, pri katerih naj bi zdravnik pomislil na možnost PID pri otroku (2):

1. Najmanj štiri okužbe ušes v enem letu.
2. Najmanj dve težji okužbi sinusov v enem letu.
3. Najmanj dva meseca antibiotične terapije z majhnim učinkom.
4. Najmanj dve pljučnici v enem letu.
5. Zastoj rasti teže in višine pri dojenčku.
6. Ponavljajoči se globoki ognojki na koži ali ognojki v notranjih organih.
7. Ponavljajoč se soor v ustih ali glivične okužbe na koži.
8. Potreba po intravenskih antibiotikih za zdravljenje okužb.
9. Najmanj dve globoki okužbi s septikemijo.
10. Pozitivna družinska anamneza za primarno imunsko pomanjkljivost.

*Jeffrey Modell Foundation, 2013*

Ocenjena prevalenca PID v ZDA je približno 1 bolnik na 1200 oseb (3). Prevalenca je ocenjena, ker imamo na voljo samo časovno in geografsko omejene podatke. Ob upoštevanju nekaterih predpostavk (blažjih oblik PID ne odkrijemo) bi utegnila biti prevalenca 1 bolnik na 500 oseb (4).

Tabela 1 Mednarodna klasifikacija PID

Skupina	Predstavniki skupine
Kombinirane imunske pomanjkljivosti	T <sup>B</sup> <sup>-</sup> SCID ( <i>angl. Severe combined immunodeficiency</i> ) T <sup>B</sup> <sup>+</sup> SCID Pomanjkanje JAK3 Ommenov sindrom
Dobro definirani sindromi z imunsko pomanjkljivostjo	Wiskott-Aldrichov sindrom Ataksija-teleangiektazija Nijmegenov sindrom DiGeorgeov sindrom CHARGE sindrom
Imunske okvare s prevladujočim pomanjkanjem protiteles	Pomanjkanje protiteles IgA CVID ( <i>angl. Common Variable Immune Deficiency</i> ) Agamaglobulinemija Pomanjkanje podrazredov protiteles IgG Pomanjkanje specifičnih protiteles IgG
Bolezni imunske regulacije	Chediak-Higashijev sindrom IPEX ( <i>angl. Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked syndrome</i> ) APECED ( <i>angl. Autoimmune PolyEndocrinopathy-Candidiasis-Ectodermal Dystrophy</i> )
Prirojene okvare števila in funkcije fagocitov	Kongenitalna nevtropenija Pomanjkljivosti adhezije levkocitov X vezana kronična granulomatozna bolezen
Okvare naravne imunosti	Pomanjkanje IRAK-4 Pomanjkanje STAT 2 Herpes simplex encefalitis
Avtoinflamacijske bolezni	Družinska mediteranska vročica Muckle-Wellsov sindrom Družinska koprivnica, sprožena z mrazom NOMID ( <i>angl. Neonatal onset multisystem inflammatory disease</i> )
Pomanjkljivosti komplementnega sistema	Pomanjkljivosti C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9 Pomanjkanje faktorjev H, I, D
Fenokopije primarnih imunskih pomanjkljivosti	Avtoimuni limfoproliferativni sindrom, pulmonarna

### 1.1.1. Težka kombinirana imunska pomanjkljivost

Med PID sodi težka kombinirana imunska pomanjkljivost (ang. Severe combined immunodeficiency – SCID). Pri vseh vrstah SCID se pojavlja nepravilno delovanje limfocitov T, ali pa limfocitov T skoraj ni. Dodatno so lahko prizadeti limfociti B in naravne celice ubijalke NK. Večino SCID lahko tako fenotipsko razvrstimo v  $T^+B^-NK^-$ ,  $T^-B^+NK^-$ ,  $T^+B^-NK^+$  in  $T^-B^+NK^+$ , pri čemer minus pomeni odsotnost ali močno zmanjšano število določene vrste celic. Motnje vplivajo tako na celično kot tudi na humoralno imunost. Ocenjena prevalenca SCID v ZDA je bila 1 bolnik na 75000 rojstev, presejalni testi pa so oceno spremenili na 1 bolnik na 58000 rojstev (5,6).

Poznamo večje število vzrokov za nastanek SCID: moteno signaliziranje s citokini, spremembe v rekombinaciji V(D)J, moteno signaliziranje preko TCR, povečana apoptoza limfocitov, motnje v embriogenezi priželjca, odsotnost priželjca, moten pretok kalcijevih ionov in drugi mehanizmi. Vsi navedeni vzroki so genetske narave. Ne glede na molekularni mehanizem bolezni imajo vse vrste skupne značilnosti: izrazito pomanjkanje ali okvarjeno funkcijo limfocitov T, prisotni limfociti pa so večinoma maternalnega izvora. (7)

Pri klasični SCID dojenčki po porodu pogosto ne kažejo nikakršnih kliničnih znakov. V prvih mesecih življenja se začne pojavljati nadpovprečno število okužb GIT in respiratornega trakta in v nekaterih primerih intoleranca na različne vrste hrane. Oboleli imajo bronhiolitisu podobne simptome, katerim se pridružujejo pogoste diareje. Atrofiji vilusov v prebavnem traktu se pridružijo pogoste okužbe, kar vodi do malabsorbcije. Medtem ko so lahko oboleli po rojstvu normalno razviti, pa nekaj mesecev kasneje v primerjavi z vrstniki precej zaostajajo v rasti in razvoju. Če je boleznii pridruženo še pomanjkanje adenilat ciklaze 2, se v prvih dneh po porodu pogosto pojavita omfalitis in bakterijska sepsa. Če boleznii ne zdravimo, je smrtna v prvih letih življenja (8).

Najpogostejši vzrok je mutacija gena IL2RG (na kromosom X vezana oblika). V tem primeru pride do okvare verige  $\gamma$ , ki je del limfocitnega receptorja za citokine IL-2, IL-4, IL-7 in druge. Mutacija IL2RG je odgovorna za približno 48 % obolelih za SCID v moški populaciji. Druge pogoste mutacije (1 % ali več primerov SCID) se pojavljajo na genih ADA, IL7R, JAK3, RAG1, RAG2 in DCLRE1C (Artemis). Skupaj poznamo vsaj 14 oblik

SCID, ki imajo vzrok v mutaciji enega ali večih genov. Pri 10 % primerov SCID genetskega vzroka še ne poznamo. Omenjene variante izražajo vseh 8 možnih fenotipov SCID:  $T^+B^-NK^-$ ,  $T^+B^+NK^-$ ,  $T^+B^-NK^+$ ,  $T^+B^+NK^+$ ,  $T^-B^-NK^-$ ,  $T^-B^+NK^-$ ,  $T^-B^-NK^+$ , in  $T^-B^+NK^+$  (9).

## 1.2. Zgodovinski pregled presejalnih testov za PID

Ker je zgodnje odkritje PID zelo pomembno za prognozo bolezni in tudi morebitno genetsko svetovanje družini, se je pojavil interes po presejalnem testiranju celotne populacije novorojenčkov. Preiskave za potrjevanje PID navadno obsegajo pregled specialista pediatra imunologa in serijo laboratorijskih preiskav, ki navadno vsebujejo vsaj določitev serumskih celokupnih protiteles, koncentracije limfocitov T, fagocitov in aktivnost sistema komplementa. Zaradi cene, števila meritev in potrebe po specialistu taka preiskava ni primeren kandidat za presejalni test populacije. Evropsko združenje za imunske pomanjkljivosti je na podlagi Holandske iniciative leta 2006 izdalo protokol, po katerem se lahko ravnajo zdravniki. Zdravnik na primarni ravni na podlagi simptomov in znakov iz treh kategorij (okužbe, družinska anamneza, dodatni znaki) ugotovi, ali obstaja možnost za PID. Če obstaja možnost PID, se zdravnik na osnovi priporočil odloči za izbiro primernih laboratorijskih preiskav. V primeru odstopanja od normalnih vrednosti, se otroka napoti v imunološko ambulanto. Tak protokol izboljša diagnostiko, vendar še vedno temelji na sposobnosti zdravnika na primarni ravni, da prepozna znake bolezni in posumi na PID. Ker je seznam simptomov in znakov dolg, je tudi možnost za izvajanje nepotrebnih preiskav precejšnja (10).

### 1.2.1. Predlagani presejalni testi za SCID

Prve ideje za ugotavljanje SCID s presejalnimi testi segajo v 1997. Predlagana metoda je bila absolutno štetje limfocitov. Pri zdravi osebi predstavljajo celice T približno 70 % limfocitov. Ker pa absolutno štetje limfocitov vključuje vse podvrste (T, B in NK), bi lahko bolnik s fenotipom  $T^+B^+NK^+$  lahko imel normalno absolutno vrednost, če bi bile celice B in celice NK ustrezno povišane. Izmerjeno vrednost zvišajo tudi celice maternalnega izvora. Ker imajo referenčne vrednosti širok razpon, je absolutno štetje

limfocitov preiskava, pri kateri se izmerjene vrednosti pri obolelih za SCID in zdravo populacijo preveč prekrivajo. Omenjena metoda bi v odvisnosti od postavljene meje imela premajhno specifičnost, občutljivost ali oboje (9,11).

Razvita je bila tudi imunska metoda za ugotavljanje IL-7. Visoke serumske koncentracije IL-7 so povezane s SCID in T-celičnimi limfopenijami. IL-7 se je izkazal za nestabilen analit, ki ga je težko vrednotiti. Omenjena pomanjkljivosti je vzrok za slabo robustnost metode (12).

SCID bi lahko diagnosticirali tudi preko ugotavljanja proteinov T celičnega receptorja. Metoda, ki je bila razvita, zahteva zaradi nizkih koncentracij proteinov uporabo zajčjih poliklonskih protiteles, ne pa bolj razširjenih monoklonskih protiteles. Proizvodnja zajčjih poliklonskih protiteles je zelo omejena, zato bi težko izvajali presejalne teste na večjih populacijah. Maternalne celice T tudi pri tej metodi zvišajo rezultate (13).

Predlagana metoda so DNA mikromreže. V ZDA za nekatere bolezni že uporabljajo presejalne teste s tehnologijo DNA mikromrež; tak primer je cistična fibroza. SCID je zahtevnejši za ugotavljanje, saj poznamo 14 genov, na katerih se lahko pojavijo mutacije. Poznanih mutacij na teh genih je več sto in njihovo število narašča. Zaradi neznanih mutacij lahko pričakujemo največ detekcijo do 90 % bolnih oseb. Trenutno je cena DNA mikromrež previsoka, da bi jih lahko uporabljali za presejalne teste SCID (14).

### 1.2.2. TREC

Več različnih raziskovalnih skupin je odkrilo, da so TREC biološki označevalci za novo proizvedene limfocite T, ki iz priželjca migrirajo v periferno kri. Zaradi povečane proizvodnje celic T je število TREC pri otrocih visoko (15,16).

Rekombinacija genov TCR v priželjcu je proces, v katerem nastane raznovrsten nabor celic T. Raznolikost celic T je dosežena z naključnim izborom odsekov regij V, (D) in J, ki jih obdaja signalna sekvenca rekombinacije - Recombination Signal Sequences – RSS. V procesu rekombinacije genov za T-celični receptor – genov TCR, se na položaju TCR $\alpha$  segment V $\alpha$  poveže s segmentoma J $\alpha$  in C $\alpha$ . Rezanje, ponovno spajanje, popravilo in procesiranje izvajajo različni encimi. Izrezani fragmenti DNA, ki niso potrebni za nastanek

TCR, so lahko združeni na svojih koncih in tako tvorijo stranski produkti DNA – ekscizijski obroček T-celičnega receptorja (*angl. T cell receptor excision circle – TREC*). TREC nastanejo v približno 70 % rekombinacijah gena TCR. TREC so stabilni in se ohranijo po delitvi celic, vendar pa se ne podvajajo ali prepisujejo. Število TREC, ki niso timusnega izvora, je zanemarljivo majhno (17).

### 1.2.3. KREC

Med razvojem limfocitov B pride do preurejanja genov za lahke verige  $\kappa$  in  $\lambda$ . Pri tem nekateri limfociti ne uspejo uspešno preurediti genov za lahke verige Ig Kappa - gene IGK; na enem ali obeh alelih. Fiziološki potek v takih celicah pripelje do izbrisa zapisa za gen IGK iz DNA. Ta zapis v naslednji stopnji tvori krožno DNA, ki jo imenujemo ekscizijski obroček kappa delecije rekombinacije (*angl. K-deleting recombination excision circle KREC*). KREC so prisotni v približno 50 % transformiranih limfocitov B (18,19).

Koncentracija KREC se je izkazala kot dober biološki označevalec pri nekaterih boleznih. Pri SCID je koncentracija odvisna od genotipa bolezni in je lahko znižana, zvišana ali normalna. Statistično značilne razlike v eno smer (povišana ali znižana koncentracija) so bile izmerjene pri Nijmegenovem sindromu, XLA (X vezani agamaglobulinemiji), sindromu ataksija-teleangiektazija, Wiskott-Aldrichovem sindromu, CVID (navadni variabilni imunski pomanjkljivosti) in pomanjkanju protiteles IgA (20).

### 1.3. PCR

Verižna reakcija s polimerazo (*angl. Polymerase chain reaction*) je tehnika na področju molekularne biologije, ki se uporablja za podvojevanje odsekov DNA. Osnovni koncept PCR je bil razvit leta 1983. Metoda temelji na cikličnem segrevanju in ohlajanju mešanice, kar omogoči podvajanje DNA, ki ga katalizira izbrani encim. Za izvedbo pomnoževanja potrebujemo:

- oligonukleotide začetnike
- DNA polimerazo
- pufer

-deoksinuleozid-trifosfate

-Mg<sup>2+</sup> ione

Navedene snovi se združijo v manjših plastičnih vsebnikih skupaj z odsekom DNA, ki ga želimo podvojiti. Takemu odseku pravimo matrična DNA (21).

V prvi stopnji izvedemo denaturacijo. Mešanico segrejemo nad 90 °C (navadno med 94 in 98 °C) za 20-30 sekund. Povišana temperatura povzroči prekinitev vodikovih vezi med komplementarnima bazama, tako da pride do razklenitve obeh verig.

V drugi stopnji izvedemo prileganje. Temperaturo znižamo na 40-65 °C za 20-40 sekund. Med tem časom se na enoverižno DNA veže oligonukleotid začetnik.

V tretji stopnji izvedemo podaljševanje. Temperaturo zvišamo na 72 °C. DNA polimeraza začne izgrajevati komplementarno verigo matrični DNA. Čas podaljševanja je odvisen od uporabljene polimeraze in dolžine odseka, ki ga pomnožujemo. Pričakovane hitrosti so tako od 1 – 50 baznih parov na sekundo (22).

Vse tri stopnje skupaj tvorijo cikel, med katerim se v idealnem primeru podvoji število tarčnih odsekov DNA. V naslednjem ciklu kot matrična DNA služijo tudi odseki, ki so se podvojili v prejšnjem ciklu. Običajno število ciklov je med 20 in 40 (23).

Po končanem zadnjem ciklu se lahko izvede še končno podaljševanje in/ali ohlajevanje. S končnim podaljševanjem zagotovimo, da je v raztopini samo dvoverižna DNA. Z ohlajevanjem lahko povečamo stabilnost DNA. Postopka se izvedeta, če potrebujemo DNA za nadaljnjo uporabo.

### 1.3.1. qPCR

Kmalu po razvitju PCR se je pojavila potreba po kvantifikaciji produktov podvojevanja. PCR omogoča kvantifikacijo po koncu reakcije, želja pa je bila, da bi lahko spremljali koncentracije tudi med reakcijo. Naprava, ki omogoča kvantifikacijo podvojevanja, se imenuje kvantitativni PCR (qPCR). qPCR je naprava, ki zaznava porast fluorescence, ki jo oddajajo vzbujena barvila.



Prvotno so se uporabljala samo interkelirajoča barvila. Interkelirajoče barvilo se doda v reakcijsko mešanico, kje se veže na dvoverižno DNA. Po vezavi lahko barvilu izmerimo flouescenco in preko tega izračunamo koncentracijo DNA, na katero se je vezalo barvilo. Vsa interkelirajoča barvila so nespecifična, vežejo se tudi na dimere začetnike. Zaradi tega dajejo rezultate z omejeno točnostjo. Primer takega barvila je bil etidijev bromid. Svetlobo je najmočneje absorbiral pri 210 in 285 nm, fluoresciral pa pri 605 nm. Po vezavi na DNA se je flouescenca ojačala za približno 20 krat. Modernejša barvila, npr. SYBR Green imajo precej večjo razliko med fluorescencama v vezanem in nevezanem stanju (tudi do 1000x), poleg tega pa niso toksična. Zaradi svoje nespecifičnosti imajo tudi prednost – so poceni, saj se posamezno barvilo veže na katerokoli zaporedje DNA.

### 1.3.2. Hidrolizirajoče sonde

Napredek je prineslo odkritje sond, označenih s fluorofori. Le te niso imele pomanjkljivosti drugih interkelirajočih barvil – njihova vezava je specifična, prav tako pa niso mutagena, teratogena ali karcinogena. Sonde so oligonukleotidi, ki imajo nase vezan fluorofor. Za delovanje mora biti oligonukleotid specifičen za odsek DNA, ki ga pomnožujemo. Na oligonukleotid sta vezana dva dela – reportersko barvilo in dušilec. Med njima poteka pojav, ki mu pravimo flouescentni resonančni prenos energije. (*angl. FRET. Fluorescence resonance energy transfer*)

V primeru, ko sta reportersko barvilo in dušilec optimalno izbrana, lahko privzamemo, da so lastnosti prenosa energije med barvilom in dušilcem odvisne samo od razdalje med njima. Ko je razdalje med barvilom in dušilcem manjša kot 0,1 nm, prihaja do uspešnega prenosa energije iz barvila na dušilec. Ko se razdalja poveča nad 0,1 nm, prenos energije ni več mogoč, zato vzbujeno barvilo fluoresceira.

Sonde nimajo pomanjkljivosti etidijevega bromida – njihova vezava je specifična, prav tako pa niso mutagene, teratogene ali karcinogene, so pa precej dražje, saj vsak odsek DNA zahteva svojo specifično sondo. Prav tako sonde niso uporabne v primerih, ko ne poznamo niti dela zaporedja DNA vzorca. Najbolj pogoste med sondami so TaqMan sonde, ki sodijo v skupino hidrolizirajočih sond. TaqMan sonde imajo na 5' koncu flouescentno reportersko barvilo, na 3' koncu pa dušilec. DNA polimeraza med stopnjo

podaljševanja zaradi svoje 5' eksonukleazne aktivnosti povzroči hidrolizo sonde. Zaradi hidrolize se reportersko barvilo in dušilec odcepita. Med njima je sedaj razdalja večja kot 0,1nm, zato ne more prihajati do fluorescentnega resonančnega prenosa energije. V primeru vzbujanja fluorescenca tako narašča sorazmerno s količino DNA produktov. Sama hidroliza sonde nima vpliva na DNA polimerazo, le ta normalno podvoji odsek DNA. Pogosto uporabljan dušilec je tetrametilrodamin (TAMRA), barvila pa 6-karboksifluorescein (FAM) in 4,7,2-trikloro-7-fenil-6-karboksifluorescein (VIC). PCR v realnem času omogoča hkratno spremljanje večih barvil. Tak način imenujemo multipla PCR (*angl. Multiplex PCR*) (23).

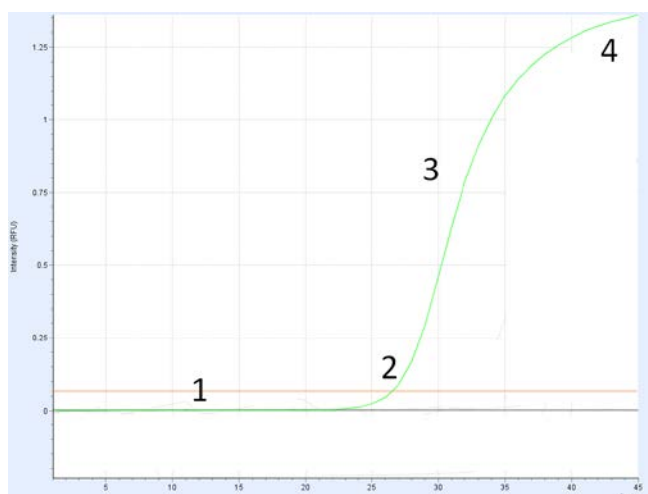
### 1.3.3. Kinetika reakcije PCR

PCR poteka v več fazah (Slika 1). Pri nižjih ciklih je nastalega produkta zelo malo, porasta fluorescence ne zaznamo, zato je krivulja odziva horizontalna. V tej fazi programska oprema določi bazno linijo, ki jo uporabi za izračun nadaljnjih vrednosti.

Ko količina produkta začne naraščati, detektor lahko zazna porast fluorescence. Tej fazi pravimo eksponentna faza, ciklu, v katerem smo zaznali fluorescenco, pa prazni cikel Ct (*angl. Threshold cycle*). Reakcija je v tej fazi zelo specifična.

Med linearno fazo začne prihajati do pomanjkanja posameznih reagentov, zato se reakcija začne ustavljati.

Med fazo platoja se pomnoževanje ustavi zaradi porabe reagentov. Krivulja postane ob zadostnem številu ciklov zopet horizontalna.



Slika 1 Signal fluorescence v odvisnosti od cikla reakcije

#### 1.3.4. Obdelava in interpretacija podatkov

Računalniški program, ki nadzoruje napravo za qPCR nam po končanem podvojevanju izpiše rezultate. Vrednost, iz katere računamo koncentracijo DNA, je prazni cikel. Prazni cikel je obratno sorazmeren z začetno koncentracijo matrične DNA. Zaradi statistične primerjave rezultatov ne podajamo kot Ct, ampak vedno preračunamo v absolutno ali relativno koncentracijo. Absolutno koncentracijo izračunamo iz odzivov standardov znane koncentracije, relativno koncentracijo pa podajamo kot razmerje proti koncentraciji izbranega hišnega gena (24,25).

## 2. Namen dela in delovne hipoteze

V magistrskem delu se bomo posvetili izvedljivosti ugotavljanja analitov TREC in KREC z metodama TRM Leipzig SCREEN-ID in Roche modular TREC/KREC. Pred začetkom raziskovanja bomo pridobili kompleta dveh proizvajalcev. Kompleta delujeta po enaki tehnologiji, vendar se v protokolih precej razlikujeta. Zahtevata uporabo različnih naprav in postopkov in sta zato različna v minimalnem in maksimalnem številu vzorcev na analizo, času izvedbe, zahtevnosti in stroških. Ovrednotili bomo možnost izvedbe omenjenih metod v laboratorijih Pediatrične klinike z vidikov ustreznosti trenutno uveljavljenih postopkov in naprav.

### 2.1. Načrt dela

Iz Klinike za nuklearno medicino bomo pridobili vzorce bolnikov s primarnimi imunskimi pomanjkljivostmi in vzorce zdravih preiskovancev. Rezultate vzorcev bolnikov, ki so bili že diagnosticirani, bomo primerjali z rezultati iz literature.

Vzorci zdravih preiskovancev nam bodo služili za določitev območja rezultatov, ki jih lahko pričakujemo od zdravih novorojenčkov. Prav tako bomo posamezne vzorce zdravih preiskovancev uporabili za ugotavljanje statističnih parametrov metode.

Rezultate, ki jih bomo dobili z obema metodama, bomo med sabo primerjali. Iz pridobljenih rezultatov bomo ovrednotili obe metodi v smislu primernosti za presejalni test in primernosti za diagnostični test.

### 2.2. Hipoteze

Metodi TRM Leipzig SCREEN-ID in Roche modular TREC/KREC dajeta enake kvalitativne rezultate; prisotnost ali odsotnost analitov TREC in KREC, znižana ali normalna koncentracija analitov TREC in KREC.

### 3. Materiali in metode

#### 3.1. Materiali

- 1,5 mL sterilne mikrocentrifugirne epruvete (Eppendorf)
- Pipete (Gilson)
- Sterilni nastavki za pipete
- Etanol 70 % (Sigma-Aldrich)
- QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)
- Analizni komplet Roche modular TREC/KREC, ki vsebuje:
  - LightMix® Modular MSTN Extraction Control (TIB MolBiol)
  - TIB MolBiol LightMix® Modular TREC (TIB MolBiol)
  - TIB MolBiol LightMix® Modular KREC (TIB MolBiol)
  - FastStart Essential DNA Probes Master (Roche)
- Analizni komplet TREC-KREC-ACTB multiplex qPCR for newborn dried blood screening (TRM Leipzig)
- Reakcijske epruvete s pokrovi LightCycler 8-Tube strip (Roche)
- Voda PCR grade kvalitete (Roche)

#### 3.2. Naprave

- LightCycler Nano System qPCR sistem (Roche)
- 7500 qPCR sistem (ABI / Life Technologies)
- Komora za sterilno delo
- Vibracijski mešalnik MaxiMix II Vortex Mixer (Thermolyne)
- Luknjač Fiskars,  $\Phi = 3,2$  mm
- Centrifuga 5702 R (Eppendorf)
- Centrifuga Minispin (Eppendorf)
- Stresalnik Vibromix 10 (Tehnica)
- Spektrofotometer Lambda 25 (Perkin Elmer)

### 3.3. Metode

#### 3.3.1. Pridobivanje vzorcev bolnih preiskovancev

Skušali smo pridobiti vse posušene krvne madeže bolnikov, ki jim je bila postavljena diagnoza težke primarne imunske pomanjkljivosti na Pediatrični kliniki Univerzitetnega kliničnega Centra Ljubljana. Zaradi različnih razlogov (kartice se po določenemu številu let uničijo, izgubljene kartice, bolnik rojen v tujini) vseh kartic ni bilo na voljo. Uspeli smo pridobiti kartice 14 bolnikov.

Za navedene vzorce smo vedeli, da pripadajo bolnikom z različnimi boleznimi iz skupine prirojenih imunskih pomanjkljivosti, nismo pa poznali absolutnih ali relativnih koncentracij TREC ali KREC. Za te bolnike je bila diagnoza postavljena na podlagi kombinacije že uveljavljenih metod – pretočna citometrija, absolutno štetje limfocitov, ugotavljanja genskih mutacij.

Iz vsake kartice smo s standardiziranim luknjačem naluknjali 4 vzorce premera 3,2 mm. Če na kartici bolnika ni bilo dovolj krvi za 4 vzorce, smo odvzeli 3 vzorce. Kartice, ki so imele dovolj krvi za samo 2 vzorca, smo izločili.

Vzorce posameznega bolnika smo s pinceto takoj prenesli v označeno 1,5 mL mikrocentrifugirno epruveto. Mikrocentrifugirno epruveto z vzorci smo do analize hranili v hladilniku.

Med luknjanjem kartic dveh različnih bolnikov smo luknjač in pinceto očistili z etanolom ter počakali, da se posušita. S tem smo se želeli izogniti križni kontaminaciji med vzorci.

Predhodno so že bili v laboratoriju hranjeni vzorci genomske DNA nekaterih bolnikov iz raziskave.

#### 3.3.2. Pridobivanje vzorcev zdravih preiskovancev

Kot zdrave preiskovance smo uporabili naključne kartice otrok. Izmed teh kartic smo izbrali samo tiste, ki so imele dovolj krvi za 4 vzorce. Vzorce posameznega zdravega

preiskovanca smo s pinceto takoj prenesli v označeno 1,5 mL mikrocentrifugirno epruveto. Mikrocentrifugirno epruveto z vzorci smo do analize hranili v hladilniku.

Med luknjanjem kartic dveh različnih zdravih preiskovancev smo luknjač in pinceto očistili z etanolom ter počakali, da se posušita. S tem smo se želeli izogniti križni kontaminaciji med vzorci.

### 3.3.3. Pridobivanje vzorcev odraslih preiskovancev

Na Pediatrični kliniki imajo shranjene posušene krvne madeže odraslih bolnikov s primarno imunsko pomanjkljivostjo. Izmed teh kartic smo izbrali 3 kartice, ki so imele dovolj krvi za 4 vzorce. Vzorce posameznega zdravega preiskovanca smo s pinceto takoj prenesli v označeno 1,5 mL mikrocentrifugirno epruveto. Mikrocentrifugirno epruveto z vzorci smo do analize hranili v hladilniku.

Med luknjanjem kartic dveh različnih zdravih preiskovancev smo luknjač in pinceto očistili z etanolom ter počakali, da se posušita. S tem smo se želeli izogniti križni kontaminaciji med vzorci.

### 3.3.4. Izolacija DNA QIAamp DNA micro

DNA smo izolirali po navodilih za izolacijo DNA iz posušениh krvnih madežev proizvajalca Qiagen, kot jih je ta objavil v svoji knjižici DNA Micro Handbook (26):

1. 3 vzorce DBS smo vstavili v 1,5 mL mikrocentrifugirno epruveto.
2. Dodali smo 180  $\mu$ L pufra ATL.
3. Dodali smo 20  $\mu$ L proteinaze K.
4. Mikrocentrifugirne epruvete smo vorteksirali in postavili na termomikser. Vzorce smo inkubirali. [56 °C 900 rpm 1 ura]
5. Kratko smo centrifugiraj mikrocentrifugirne epruvete, da so kapljice odpadle s pokrova.

6. Dodali smo 200  $\mu\text{L}$  pufra AL in nosilno RNA, nato smo voteksirali. [10 sekund]
7. Mikrocentrifugirne epruvete smo postavili termomikser in jih inkubirali. [70 °C 900 rpm 10 minut]
8. Kratko smo centrifugiraj mikrocentrifugirne epruvete, da so kapljice odpadle s pokrova.
9. Ves lizat smo pazljivo prenesli v QIAamp MinElute kolono. Zaprli pokrov in centrifugirali. [8000 rpm 1 minuta] QIAamp MinElute kolono smo vstavili v čisto 2 mL mikrocentrifugirko, tekočino, ki je prešla kolono, pa zavrgli.
10. QIAamp MinElute kolono smo vstavili v čisto 2 mL mikrocentrifugirko, tekočino, ki je prešla kolono, pa zavrgli. Odprli QIAamp MinElute kolono in dodali 500  $\mu\text{L}$  pufra AW1. Zaprli smo pokrov in centrifugirali. [8000 rpm 1 minuta]
11. QIAamp MinElute kolono smo vstavili v čisto 2 mL mikrocentrifugirko, tekočino, ki je prešla kolono, pa zavrgli. Odprli QIAamp MinElute kolono in dodali 500  $\mu\text{L}$  pufra AW2. Zaprli smo pokrov in centrifugirali. [8000 rpm 1 minuta]
12. Centrifugirali smo pri polni hitrosti 5 minut, da se je membrano posušila.
13. QIAamp MinElute kolono smo vstavili v čisto 1,5 mL mikrocentrifugirno epruveto, tekočino, ki je prešla kolono, pa zavrgli. Odprli smo QIAamp MinElute kolono in dodali 30  $\mu\text{L}$  pufra AE. Zapri smo pokrov.
14. Pri sobni temperaturi smo inkubirali 1 minuto, nato pa centrifugirali. [10000 rpm 90 sekund]

### 3.3.5. Protokol SCREEN-ID TRM Leipzig

Metodo SCREEN-ID smo izvedli po navodilih proizvajalca TRM Leipzig, ki so bila priložena analiznemu kompletu (27).

1. Odstranili smo pokrov s filtrirne enote, obrnili ploščo in zaprli odprtine z Elution seal.
2. 3,2 mm vzorce smo prenesli na filter ploščo.



3. Odpipetirali smo 150  $\mu$ L raztopine za spiranje v vsako odprtino. A1-A12 so ostale prazne.
4. Filtrirno enoto smo zaprli s tesnilnim filtrom.
5. Obrnili smo filtrirno enoto - (zatesnjena stran na vrhu) in centrifugirali. [200xg 30 sekund]
6. Filtrirno enoto smo inkubirali na stresalniku. [650rpm 15 minut]
7. Odstranili smo spodnje tesnilo s filtrirne enote in pritrdili deepwell ploščo.
8. Ploščo smo obrnili in jo centrifugirali. [1850xg 30 sekund]
9. Odstrani aluminijasto folijo in centrifugiraj. [1850xg 30 sekund]
10. Elucijsko ploščo smo vzeli iz hladilnika in počakali, da se je aklimatizira na sobno temperaturo, nato smo jo centrifugirali. [1850xg 15 sekund]
11. Odstranili smo folijo.
12. Filter enoto smo postavili na vrh elucijske enote in ju pritrdili. Rdeči oznaki na obeh ploščah sta se prekrilvali. Nato smo centrifugirali. [2500xg 1 minuta]
13. Odstranili smo filtrirno enoto in jo zaprli s pokrovom.
14. Elucijsko ploščo smo zaprli z elucijskim tesnilom.
15. Ploščo smo postavili v termocikler. Vročinsko smo eluirali DBS. [99 °C 33 minut]
16. Ploščo smo centrifugiraj. [1850xg 30 sekund]
17. Tesnilo smo odstranili v ločenem prostoru laboratorija.
18. qPCR ploščo smo vzeli iz hladilnika in počakali, da se aklimatizira na sobno temperaturo.
19. Ploščo smo centrifugirali. [1850xg 15 sekund]
20. Odstranili smo folijo.
21. Filter enoto smo postavili na vrh elucijske enote in ju pritrdili. Poskrbili smo, da se rdeči oznaki na obeh ploščah prekrivata.
22. Filter enoto smo postavili na vrh qPCR enote. A1 položaja obeh enot sta se prekrivala.
23. Centrifugirali smo komplet qPCR + filter + elucijske plošče. [1850xg 1 minuta]
24. qPCR ploščo smo zatesnili z optičnim qPCR tesnilom.
25. Zatesnjeno qPCR ploščo smo vorteksirali. [10 sekund]
26. Zatesnjeno qPCR ploščo smo centrifugirali. [200xg 30 sekund]
27. qPCR ploščo smo vstavili v ABI qPCR napravo in izvedli pomnoževanje.

### 3.3.6. PCR protokol SCREEN-ID TRM Leipzig

Reakcijski volumen: 20 µL

Tip barvila: Hidrolizirajoče sonde

Tabela II Nastavitve kanalov qPCR naprave pri metodi SCREEN-ID

Kanal	Analit
FAM (NFQ-MGB)	TREC
VIC (NFQ-MGB)	KREC
NED (NFQ-MGB)	ACTB
ROX	Pasivna referenca

Tabela III Časovni program qPCR naprave pri metodi SCREEN-ID

Začetni korak		
2 minuti	50 °C	2,5 °C/minuto
10 minut	95 °C	2,5 °C/minuto
PCR stopnja (40 ciklov)		
15 sekund	95 °C	2,5 °C/minuto
25 sekund	60 °C	1,98 °C/minuto

### 3.3.7. Reakcijska mešanica Roche modular TREC/KREC

Tabela IV Reakcijska mešanica Roche modular TREC/KREC

Reagent	Volumen
Voda PCR kvalitete	3,5 µL
Reagent Mix TREC	0,5 µL
Reagent Mix KREC	0,5 µL
Reagent Mix MSTN	0,5 µL
Fast start Essential Mix	10 µL

### 3.3.8. PCR protokol Roche modular TREC/KREC

Tabela V Nastavitve kanalov qPCR naprave pri metodi Roche modular TREC/KREC

Kanal	Analit
FAM	TREC
Red 610	KREC
VIC	MSTN

Tabela VI Časovni program qPCR naprave pri metodi Roche modular TREC/KREC

Začetna stopnja	Temp.		Brez zajema podatkov
5 minut	95 °C	5 °C/minuto	
PCR stopnja (45 ciklov)			
15 sekund	95 °C	4,4 °C/minuto	
30 sekund	60 °C	2,2 °C/minuto	Zajem podatkov
10 sekund	72 °C	4,4 °C/minuto	
Končna stopnja			Brez zajema podatkov
30 sekund	40 °C	1,5 °C/minuto	

Pri uporabi PCR protokola Roche modular TREC/KREC smo vedno zapolnili vsa mesta v napravi s plastičnimi vsebniki, ne glede na število vzorcev, ki smo jih analizirali. S tem smo zagotovili termično uravnoteženost naprave.

### 3.3.9. Izračun koncentraciji po metodi Roche modular TREC/KREC

Hkrati smo analizirali izolirano DNA iz treh iztiskov posušenih krvnih madežev, razen pri nekaterih bolnikih, ki so imeli na voljo samo dva iztiska. Predpostavlja se, da 1 iztisk vsebuje 3  $\mu$ L krvi. Končni volumen izolirane DNA skupaj s pufrom je bil 30  $\mu$ L. Pri posamezni qPCR analizi smo uporabili 5  $\mu$ L vzorca izolirane DNA. Koncentracijo smo izračunali po enačbi 1.

$$\begin{aligned}
 \text{Koncentracija} &= \frac{\text{Rezultat naprave}}{\text{število vzorcev} \cdot \text{količina krvi v vzorcu} \cdot \text{delež analiziranega izolata DNA}} \\
 &= \frac{\text{Rezultat naprave} [\text{št. analitov}]}{3 \text{ iztiski} \cdot 3 \frac{\mu\text{L krvi}}{\text{iztisk}} \cdot \frac{5 \mu\text{L}}{30 \mu\text{L}}} = \text{Rezultat} \left[ \frac{\text{število analitov}}{\mu\text{L krvi}} \right]
 \end{aligned}$$

Enačba 1 Izračun koncentracije analita iz pripravljenega vzorca

### 3.3.10. Priprava vzorcev za umeritvene krivulje

Raztopine standardov za umeritvene krivulje metode Roche modular TREC/KREC smo pripravili iz standardov, ki jih je analiznemu kompletu priložil proizvajalec. Izmerili smo standard ter 10 in 100-kratne redčitve standardov, ki smo jih sami pripravili. Za umeritveno krivuljo vzorca smo izbrali vzorec zdravega preiskovanca, ki je imel visoke vrednosti analitov TREC, KREC in hišnega gena MSTN. Izmerili smo vzorec zdravega preiskovanca ter ter 10 in 100-kratne redčitve vzorcev, katere smo sami pripravili.

Koncentracije smo izmerili trem paralelkam.

Metoda SCREEN-ID TRM Leipzig ima vzorce za umeritveno krivuljo privzeto dodane na ploščico.

## 4. Rezultati in razprava

Obstajala je možnost, da bi bil med karticami zdravih otrok vzorec, ki bi pripadal bolniku (diagnosticiranemu ali nediagnosticiranemu). Zato smo izbrali kartice, ki so bile ob času analize stare vsaj 4 mesece. V primeru, da bi bolnik imel PID, bi obstajala večja možnost, da bi zanj že vedeli in bi bila njegova kartica v skupini bolnikov. Obstajala je tudi možnost, da bi bila v skupini kartica nediagnosticiranega bolnika. Iz pilotnega programa, ki so ga pred leti izvajali na Švedskem, smo pridobili podatke o pogostosti takšnega scenarija. Zaradi zelo majhne verjetnosti – manj kot 0,2 % smo možnost bolnika v skupini zdravih preiskovancev zanemarili (28). Med raziskavo smo analizirali vzorce zdravih preiskovancev (Tabela VII), vzorce bolnikov (Tabela VIII) in vzorce odraslih oseb (Tabela IX).

*Tabela VII Vzorci zdravih preiskovancev*

Vzorec	Status	Spol	Leto rojstva
37 vzorcev	Zdrav deček	M	2014
25 vzorcev	Zdrava deklica	Ž	2014

*Tabela VIII Seznam vzorcev bolnih preiskovancev*

Vzorec	Diagnoza	Spol	Leto rojstva
B1	SCID(JAK3);	M	2012
B2	SCID (CD3ε)	M	2012
B3	Mutacija PI3K CD	M	2003
B4	CID	Ž	2009
B5	CID	Ž	2009
B6	XLA	M	2005
B7	CVID	M	2006
B8	CVID	M	2006
B9	Di George sindrom	Ž	2010
B10	Schimkejeva ID	Ž	2011
B11	XLA	M	2003

B12	CID	Ž	2003
X2 Genomska	XLA	M	1999

Tabela IX Seznam vzorcev odraslih oseb

C2	37-letni moški
C3	35-letna ženska
C4	13-letno dekle

#### 4.1. Komplet Roche modular TREC/KREC

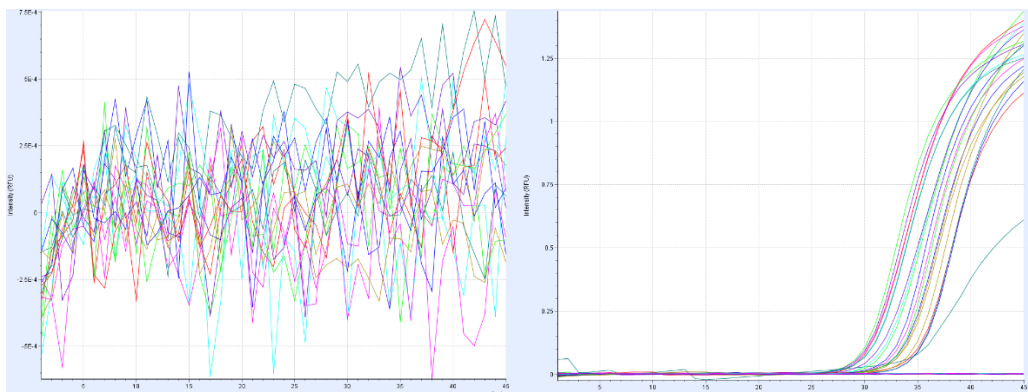
##### 4.1.1. Koncentracije DNA v izoliranih vzorcih

Po izolaciji DNA s protokolom QIAamp DNA micro smo preverili koncentracije DNA v izoliranih vzorcih. Zaradi omejenega števila mest na mikrocentrifugi smo vzorce izolirali v osmih serijah. Iz vsake serije smo izbrali en vzorec in mu izmerili koncentracijo DNA. S tem smo želeli potrditi uspešnost izolacije. Koncentracije smo izmerili z UV-VIS spektrofotometrom. Izmerjene koncentracije so ustrezale priporočilom Roche-a, ki za optimalen potek reakcij predlaga največjo koncentracijo 50 $\mu$ g/mL, med vzorci pa je bila največja koncentracija 43,75  $\mu$ g/mL. Protokol DNA QIAamp DNA micro se je izkazal za primernega za izolacijo DNA iz posušenih krvnih madežev. Kolone QIAamp DNA micro ne omogočajo avtomatizirane izolacije, kar bi predstavljalo težavo pri analizi večjega števila vzorcev.

##### 4.1.2. Odziv označevalcev

Ob naročilu kompleta Roche modular TREC/KREC smo dobili privzeto označene sonde (Cy5 na sondi za TREC, VIC na sondi za MSTN in Red 610 na sondi za KREC). Ob prvi analizi vzorcev se je pokazala težava s sondami za analit TREC. Na grafu ni bilo eksponentne faze, logaritemske faze in platoja, ampak samo šum (Slika 2). Rezultati niso

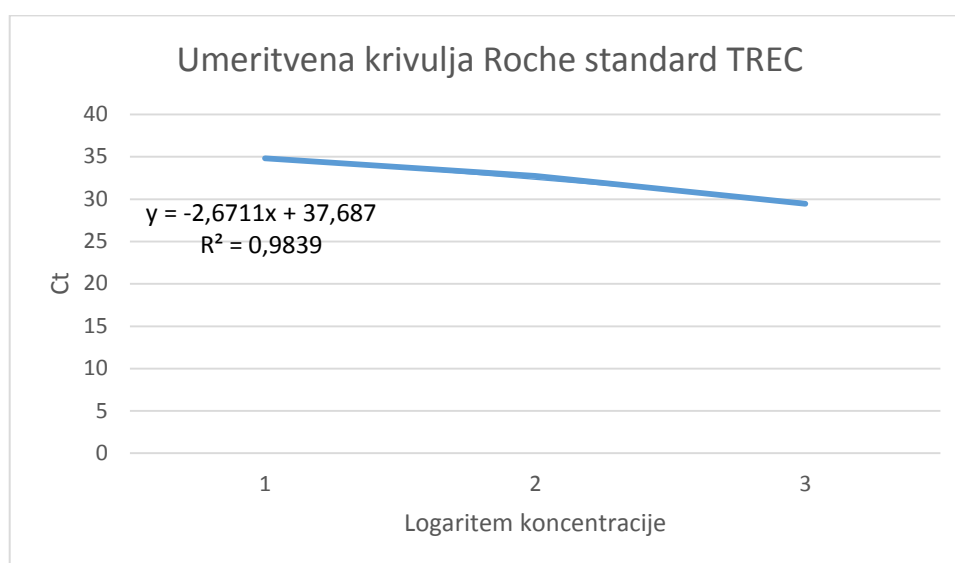
bili uporabni, zato smo posumili na težavo s sondo. Po naročilu sond za TREC, označenih z barvilom FAM, smo dobili pričakovane oblike krivulj.



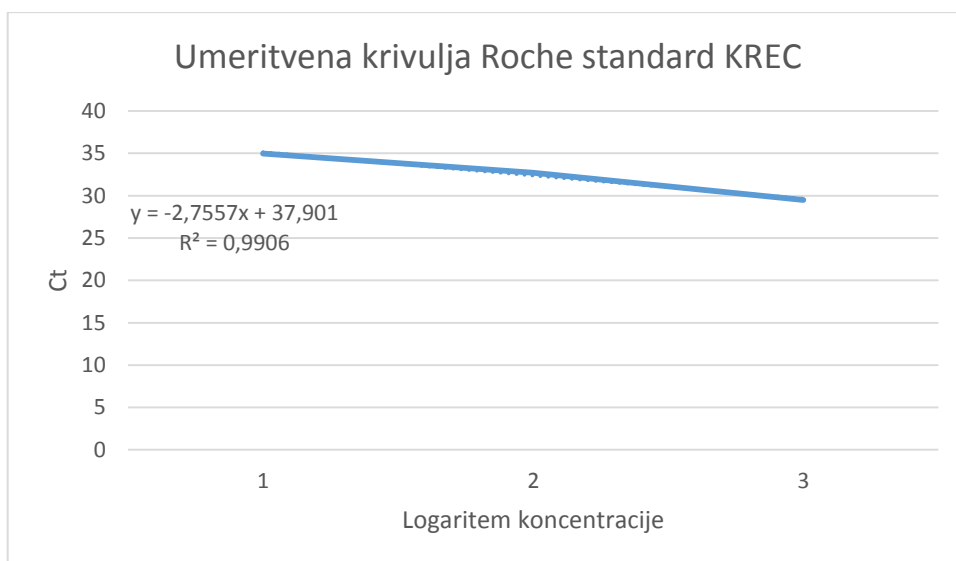
Slika 2 Krivulje vzorcev označenih z barvilom Cy5 (levo) in vzorci označeni z barvilom FAM (desno)

#### 4.1.3. Umeritvene krivulje

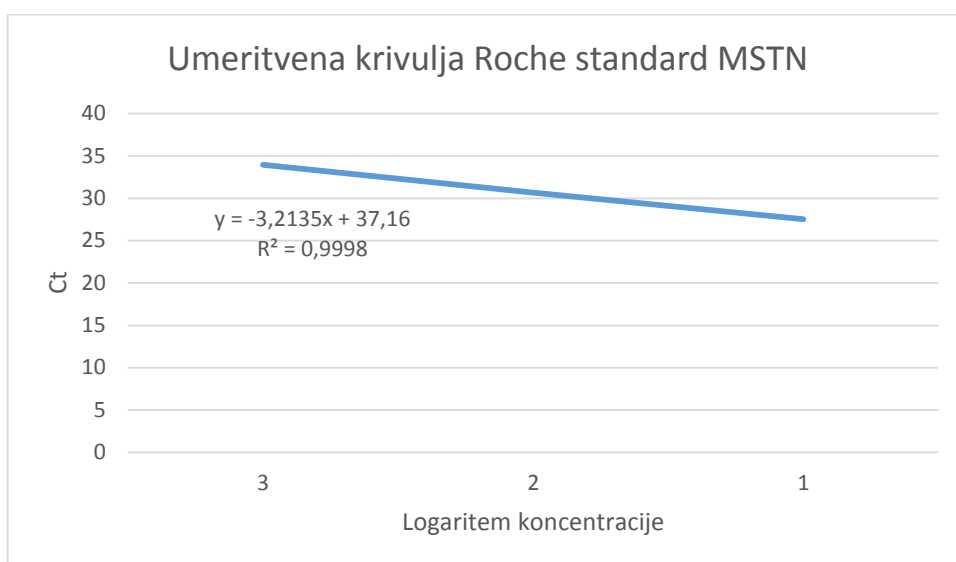
Raztopine standardov za umeritvene krivulje standardov (Grafi 1- 3) smo pripravili iz standardov, ki jih je analiznemu kompletu priložil proizvajalec. Za umeritveno krivuljo vzorca smo izbrali vzorec zdravega preiskovanca, ki je imel visoke vrednosti analitov TREC, KREC, hišnega gena MSTN. Vse umeritvene krivulje imajo ustrezno linearnost  $R^2 \geq 0,98$  (Grafi 1- 6).



Graf 1 Umeritvena krivulja Roche modular TREC/KREC standard TREC

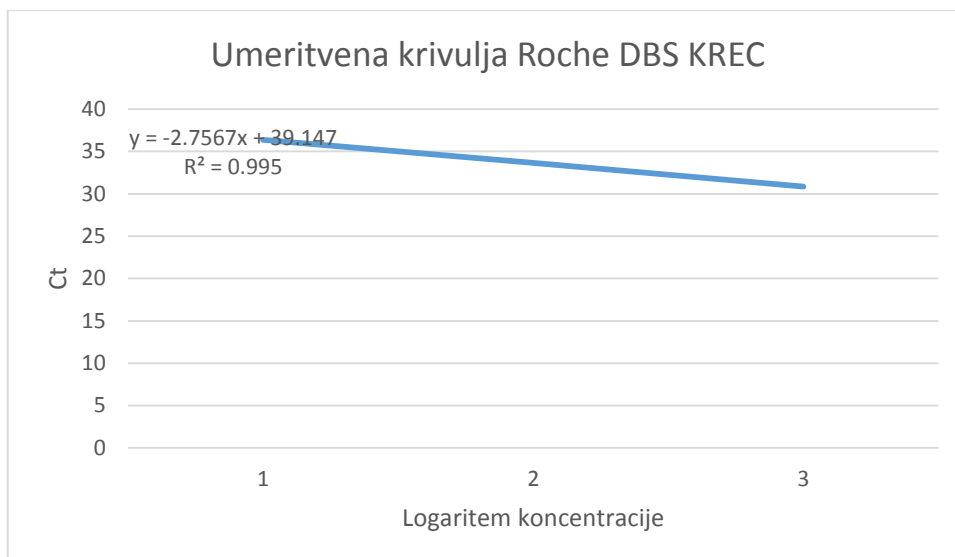


Graf 2 Umeritvena krivulja Roche modular TREC/KREC standard KREC

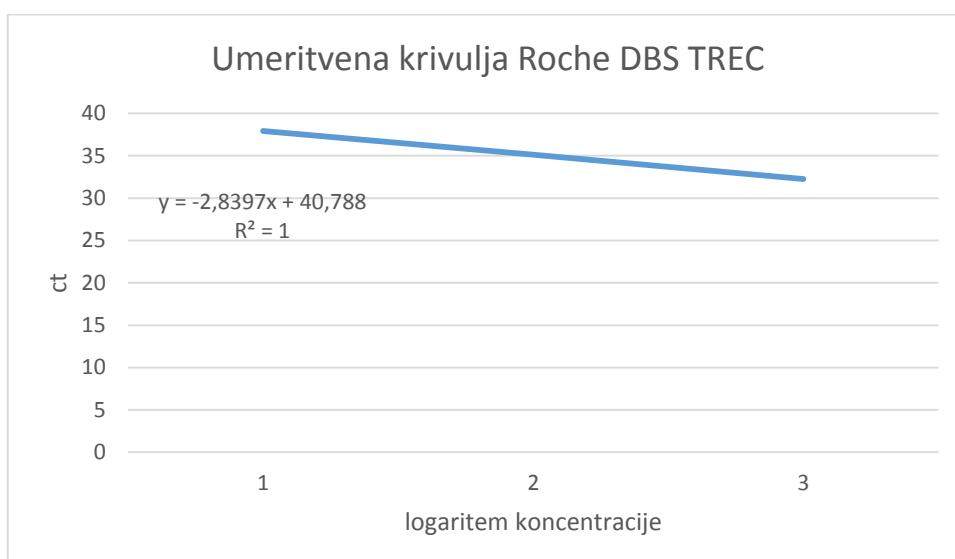


Graf 3 Umeritvena krivulja Roche modular TREC/KREC standard MSTN

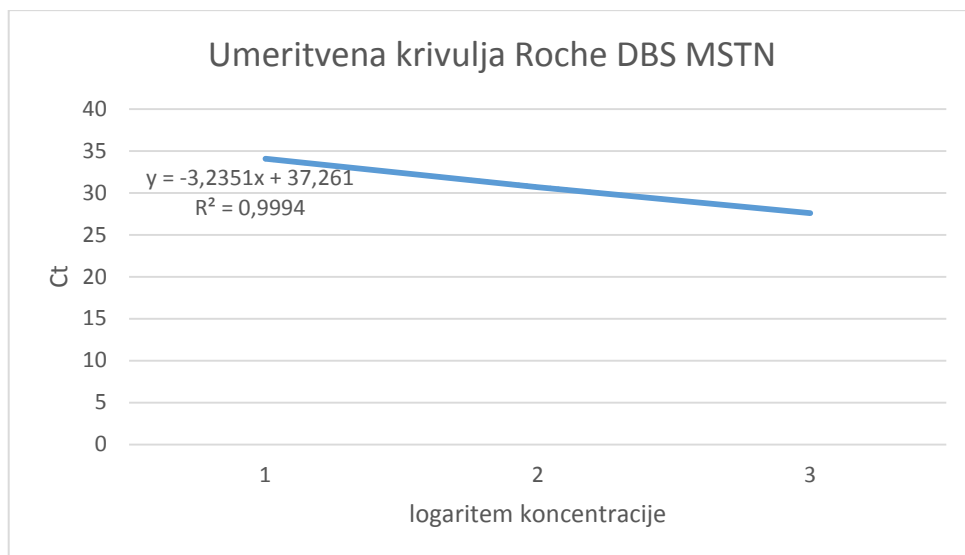




Graf 4 Umeritvena krivulja Roche modular TREC/KREC DBS KREC



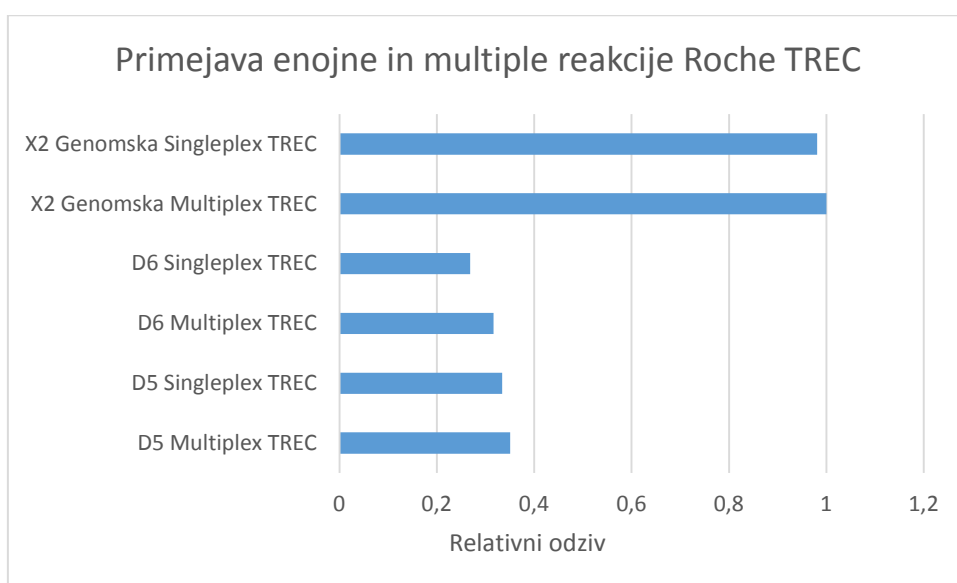
Graf 5 Umeritvena krivulja Roche modular TREC/KREC DBS TREC



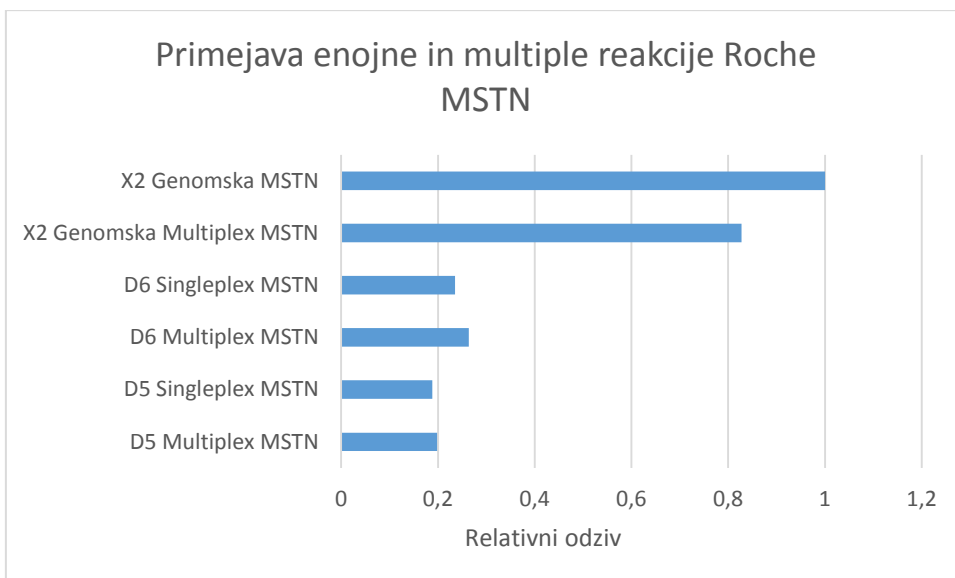
Graf 6 Umeritvena krivulja Roche modular TREC/KREC DBS MSTN

#### 4.1.4. Enojne in multiple reakcije

Želeli smo preveriti učinek izvajanja multiple qPCR. Reakcijsko mešanico za multiplo qPCR smo pripravili po navodilih za pripravo reakcijske mešanice Roche modular TREC/KREC. Pri reakcijskih mešanicah z eno sondo smo volumna manjkajočih sond nadomestili z vodo. Ugotovili smo, da pri analitih TREC in MSTN ločitev reakcije ne prinese bistvenih razlik (Graf 7- 8).

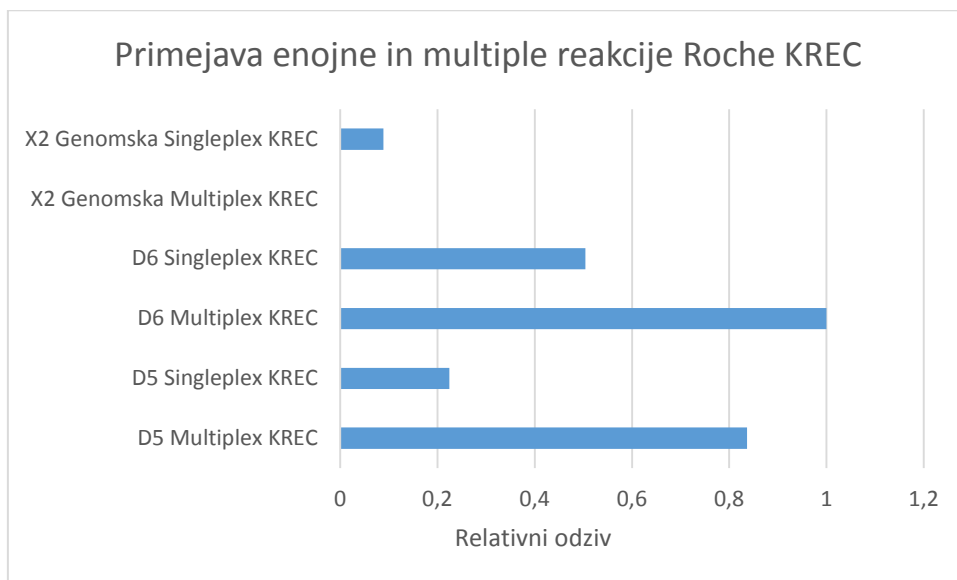


Graf 7 Primejava enojne in multiple reakcije Roche TREC



Graf 8 Primejava reakcij v singleplexu in multiplexu MSTN

Pri analitu KREC pa je izvedba ločenih reakcij manj učinkovita. Vzorec X2 genomska pri multipli reakciji ni dajal odziva, pri ločeni pa ga je. Vzorec pripada bolniku, obolelemu za XLA. Pri tem bolniku smo na podlagi literaturnih virov pričakovali nizek odziv ali odsotnost analita KREC (Graf 9).

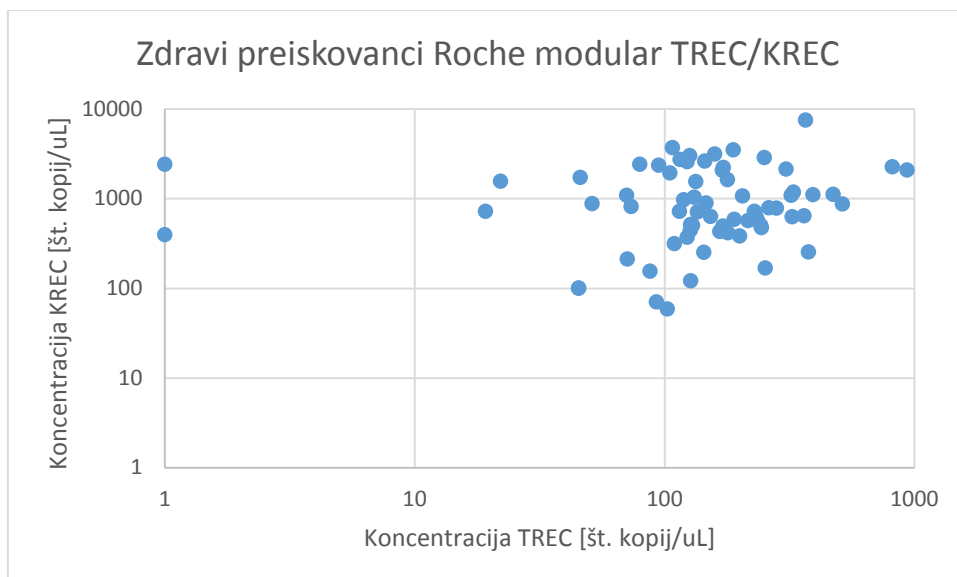


Graf 9 Primejava enojne in multiple reakcije Roche KREC

#### 4.1.5. Rezultati vzorcev

Pred začetkom testiranja smo se odločili, da bomo upoštevali samo rezultate z ustrezno koncentracijo hišnega gena MSTN. To bi nam zagotovilo, da bi upoštevali vzorce z ustreznim pomnoževanjem. Med raziskavo nismo zaznali nobenega primera neustreznega podvojevanja MSTN.

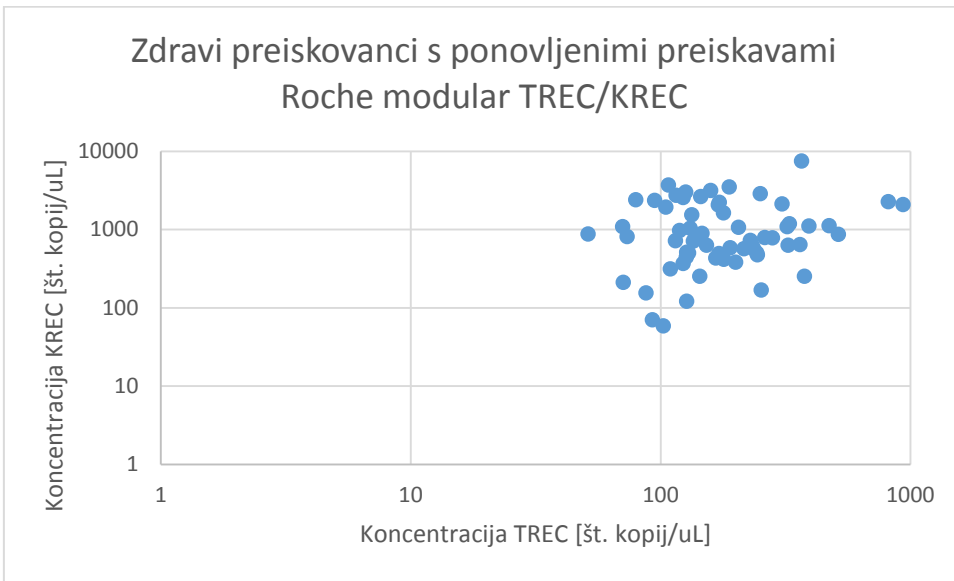
Analizirali smo vzorce 62 zdravih otrok (Graf 10) in 12 bolnih otrok (Graf 12).



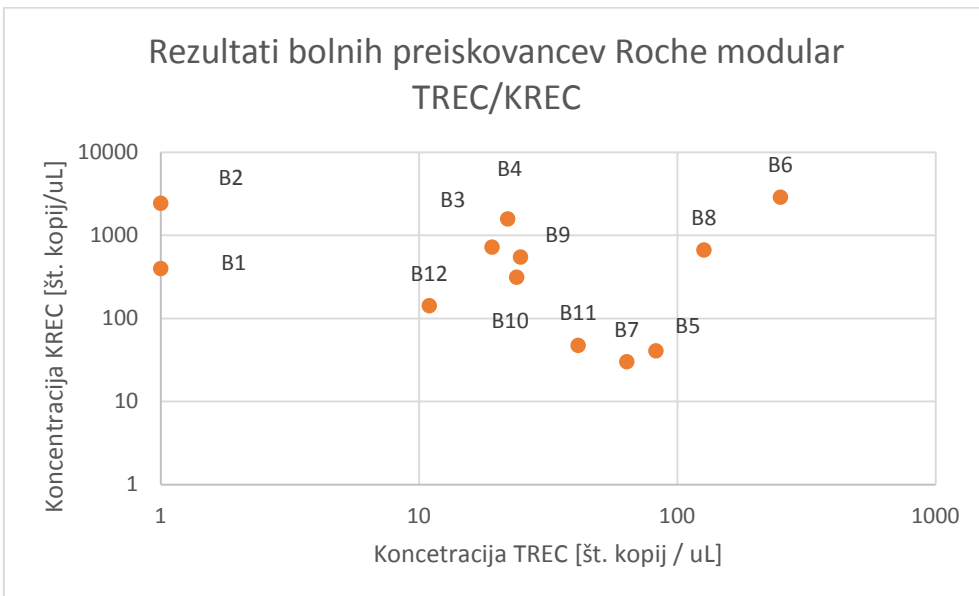
Graf 10 Rezultati zdravih preiskovancev po metodi Roche modular TREC/KREC

Ker sta imela dva bolnika negativen rezultat za analit TREC, smo se odločili ponovno analizirati njuna vzorca krvi. Po nadaljnji obdelavi podatkov smo ugotovili, da lahko koncentracije analitov TREC razporedimo v dve skupini. Imeli smo skupino 5 vzorcev z izmerjenimi koncentracijami TREC med 19 in 46 kopij TREC/ $\mu$ L in 2 vzorcema brez analita TREC ter skupino 57 vzorcev z izmerjenimi koncentracijami TREC nad 70 kopij TREC/ $\mu$ L. Vzorca, ki nista vsebovala analita TREC, sta bila G5 in G6, poleg tega pa sta bila v skupini 5 vzorcev z nizkimi vrednostmi tudi vzorca G7 in G8. To je kazalo na sistemsko napako, najverjetneje napačno pipetiranje sond za TREC. Vrednosti KREC so bile pri navedenih sedmih vzorcih v pričakovanem območju. Ostali vzorci z oznako G so imeli rezultate v pričakovanih mejah. Navedene vzorce z nizko koncentracijo TREC smo ponovno analizirali.

Ponovljene analize so pri vseh sedmih vzorcih pokazale na normalne vrednosti obeh analitov. Vrednosti TREC so bile sedaj višje, vrednosti KREC pa primerljive s predhodno analizo (Graf 11).



Graf 11 Rezultati zdravih preiskovancev s ponovljenimi preiskavami po metodi Roche modular TREC/KREC



Graf 12 Rezultati vzorcev bolnikov analiziranih po metodi Roche modular TREC/KREC

Tabela X Rezultati bolnikov po metodi Roche modular TREC/KREC

Vzorec	Diagnoza	Konc. TREC [št. kopij / uL]	Konc. KREC [št. kopij / uL]
B1	SCID(JAK3);	0	394.4774
B2	SCID (CD3ε)	0	2412.889
B3	Mutacija PI3K CD	19.20008	716.557
B4	CID	22.0827	1559.889
B5	CID	82.71296	40.47345
B6	XLA	250.8713	2858.111
B7	CVID	63.75246	29.8812
B8	CVID	126.9439	659.9638
B9	Di George sindrom	24.73126	546.8518
B10	Schimkejeva ID	23.90568	312.7732
B11	XLA	41.33931	47.24899
B12	CID	10.96012	141.9137
X2 Genomska	XLA	293.1513	0

Pri vseh analitih smo ugotovili ustrezno linearnost odziva, tako v primeru pomnoževanja standarda kot tudi v primeru pomnoževanja vzorca, izoliranega iz DBS. Umeritvene krivulje vseh analitov so imele  $R^2 \geq 0,99$ , razen v primeru pomnoževanja standarda TREC, ko je bil  $R^2$  0,984.

Pri vzorcih B1 in B2 smo dobili podobne rezultate: odsotnost analita TREC in prisotnost analita KREC. Rezultati odgovarjajo literaturnim virom za obolele s SCID (29). Pri vzorcu B3 smo dobili zmanjšano koncentracijo analita TREC in normalno koncentracijo analita KREC. Literaturnih virov za vpliv mutacije *PI3KCD* na koncentracije TREC in KREC nismo našli. Vzorec B4 je imel zmanjšano koncentracijo analita TREC in normalno koncentracijo analita KREC, vzorec B5 je imel normalno koncentracijo analita TREC in znižano koncentracijo analita KREC. Obe možnosti sta že bili poročani pri bolnikih s CID (29). Vzorec B6 je imel normalno koncentracijo TREC in povišano koncentracijo KREC.

Ker je za bolnike z X-vezano agamaglobulinemijo značilna odsotnost analita KREC, smo analizo ponovili. Dobili smo primerljiv rezultat. Posumili smo na laboratorijsko napako, zato smo ponovili izolacijo DNA iz DBS in spet opravili analizo. Tudi nova analiza je pokazala na visoko koncentracijo analita KREC. Literaturni viri večinoma poročajo o znižani koncentraciji ali popolni odsotnosti analita TREC (30). Vzorec B7 je imel zmanjšane koncentraciji analitov TREC in KREC. Literaturni viri poročajo pri bolnikih s CVID večinoma o normalnih ali znižanih koncentracijah obeh analitov. (28,31). Vzorec B8 prav tako pripada bolniku s CVID in ima normalne koncentracije obeh analitov. Vzorec B9 pripada bolniku z DiGeorge-jevimi sindromom. Vzorec je imel znižane koncentracije TREC in normalne koncentracije KREC. Literaturni viri poročajo o takih primerih.(32). Vzorec B10 pripada bolniku s Schimkejevo imunokostno displazijo. Vrednosti TREC so bile znižane, vrednosti KREC pa normalne. Literaturni podatki poročajo o znižanih vrednostih TREC (33). Vzorec B11 pripada bolniku z X-vezano agamaglobulinemijo. Vrednosti TREC in KREC so bile znižane. Vzorec B12 pripada bolniku s CID, koncentracija TREC je bila znižana, koncentracija KREC pa normalna. Vzorec X2 genomska pripada bolniku s XLA. Vrednosti TREC so bile normalne, analit KREC pa je bil odsoten.

Po končani kvantifikaciji smo opazili, da imajo vzorci relativno visoke vrednosti TREC in KREC. Raziskave so kazale, da imajo bolniki s PID, ki imajo znižane koncentracije TREC ali KREC, te v območju do 15 kopij na  $\mu\text{L}$  krvi, rezultati pa so kazali na do 50 kopij. Metoda Roche modular TREC/KREC opravi kvantifikacijo na podlagi standardov, ki jih analiziramo vzporedno z vzorci. Imajo znane koncentracije 1000 ali 4000 kopij TREC ali KREC na  $\mu\text{L}$ . V grafični vmesnik pred začetkom meritev vpišemo lokacijo in koncentracijo standardov, programska oprema pa preračuna koncentracije. Taka metoda ima prednost v tem, da ne porabimo veliko reagentov za kvantifikacijo, vendar pa ne nudi natančne kvantifikacije. Rešitev tega bi bil nakup plazmida znane koncentracije.

Kljub višjim dobljenim vrednostim TREC in KREC pa so bile relativne vrednosti ustrezne. Uspeli smo ugotoviti znižane vrednosti 11 od 13 bolnikov. Normalne vrednosti sta imela bolnik s CVID in bolnik z XLA. Pri bolniku s CVID so normalne vrednosti pričakovane, pri bolniku z XLA pa smo pričakovali vsaj zelo zmanjšano koncentracijo KREC. Navkljub dvema ponovljenima analizama, ponovni izolaciji DNA in analizi novo izolirane DNA smo vselej zaznali normalne koncentracije TREC. Vzroka normalne koncentracije pri tem vzorcu nam ni uspelo ugotoviti.

## 4.2. Komplet TRM Leipzig SCREEN-ID

### 4.2.1. Umeritvene krivulje TRM Leipzig SCREEN-ID

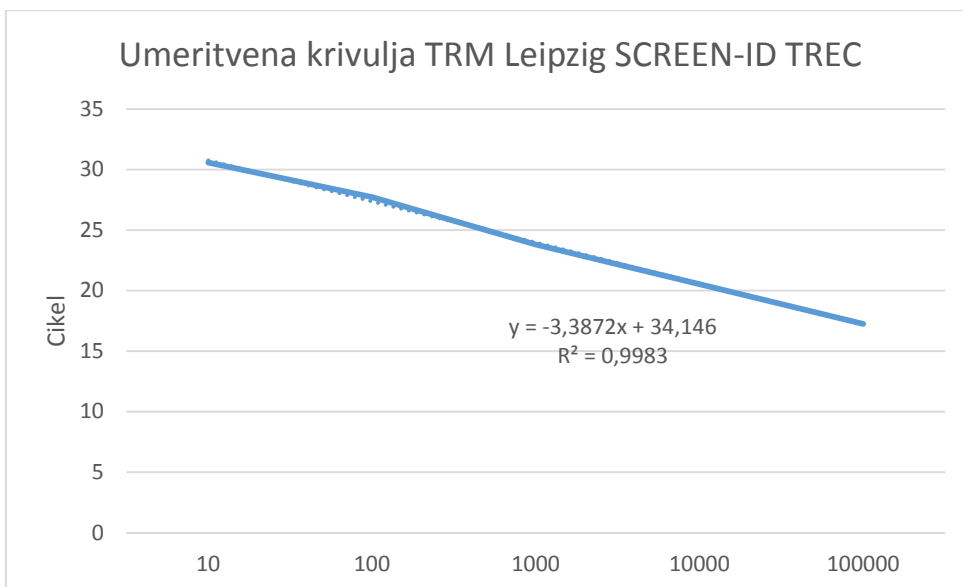
Komplet TRM Leipzig SCREEN-ID nam je doniral proizvajalec. Dobili smo 2 demonstracijski ploščici. Vsaka ploščica ima 96 mest, v primeru demonstracijskih ploščic pa so bile z reagenti napolnjene samo tri vrstice po 12 vdolbinic. Zgornja vrsta je bila zapolnjena z vzorci umeritvene premice. Na dan analize smo po prenosu kompleta iz zamrzovalnika v prostor s sobno temperaturo zaznali vlago. Po preverjanju ovojnine smo opazili, da tesnilna ovojnina ni bila pravilno prilepljena na pokrov prve ploščice, druga ploščica pa je bila počena. Od proizvajalca smo poskušali pridobiti nova kompleta, vendar smo dobili ponujen samo nakup v količini 5000 preiskav.

Počena ploščica je bila neuporabna, na drugi ploščici pa smo po pregledu ugotovili, da sta bili prvi dve vrsti ustrezno zatesnjeni, tretja in četrta pa delno ustrezno, vendar sta še vedno vsebovali reagente. Odločili smo se, da bomo drugo vrsto napolnili z vzorci bolnikov, tretjo vrsto s kombinacijo zdravih preiskovancev in nekaterih vzorcev odraslih, četrto vrsto pa z vzorci za umeritveno premico, ki smo jo uporabljali tudi pri kompletu Roche modular TREC/KREC.

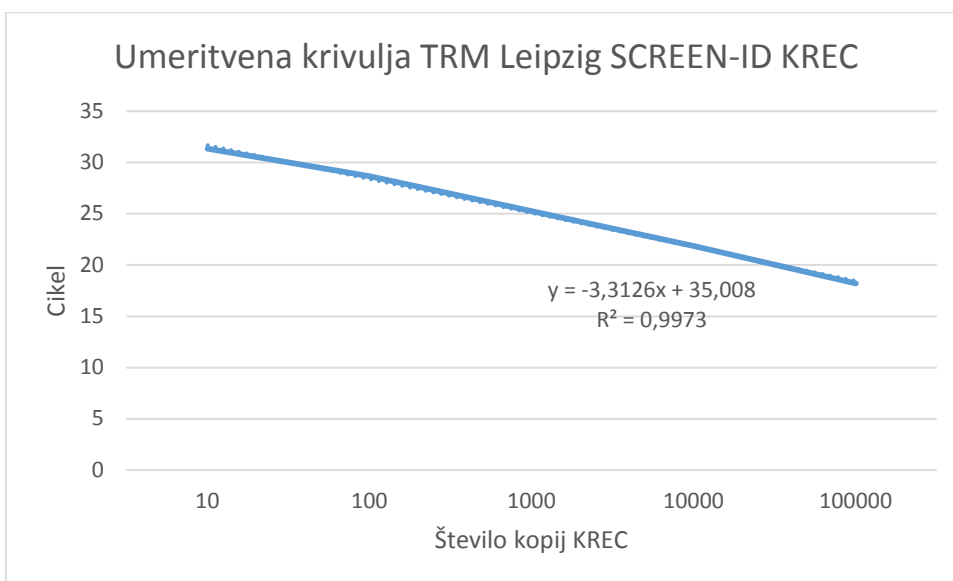
Analiza podatkov je pokazala, da se v polovici vdolbinic ni zgodila nikakršna reakcija. Za upoštevanje rezultata posameznega mesta na ploščici smo se odločili, če se je zgodilo pomnoževanje hišnega gena ACTB ob hkratnem zadostnem odzivu analita TREC ali KREC. Nekateri vzorci, ki so ustrezali pogojem, so ležali na delu ploščice, na katerem smo sumili na poškodbo. Rezultate teh vzorcev smo zanemarili. Skupaj nam je uspelo izmeriti rezultate dvajsetih mest, od tega je 12 vdolbinic umeritvena premica kompleta, 5 vdolbinic z vzorci bolnikov, 3 vdolbinice z vzorci odraslih.

Vse umeritvene krivulje imajo ustrezno linearnost  $R^2 \geq 0,998$  (Graf 13 - 15).

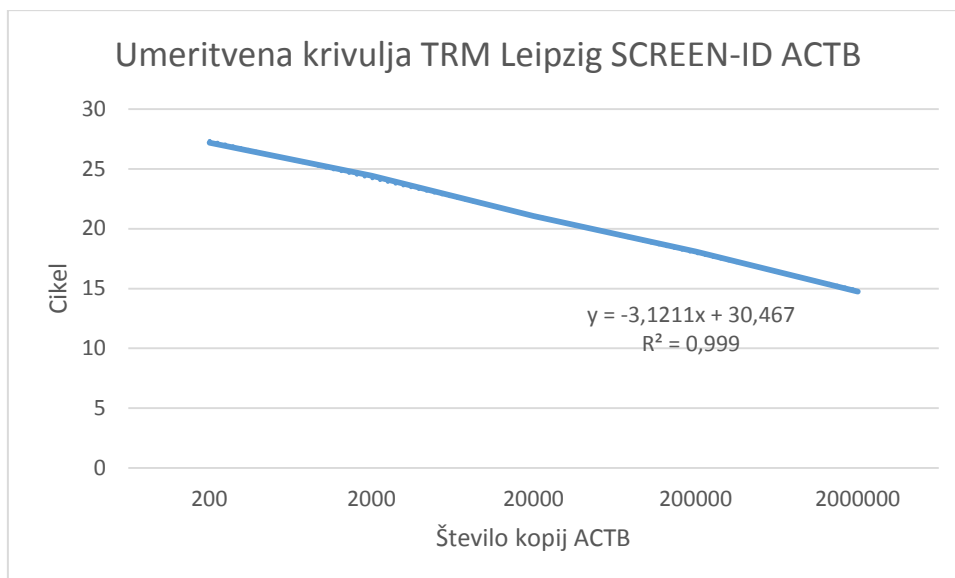




Graf 13 Umeritvena krivulja TRM SCREEN-ID TREC



Graf 14 Umeritvena krivulja TRM SCREEN-ID KREC



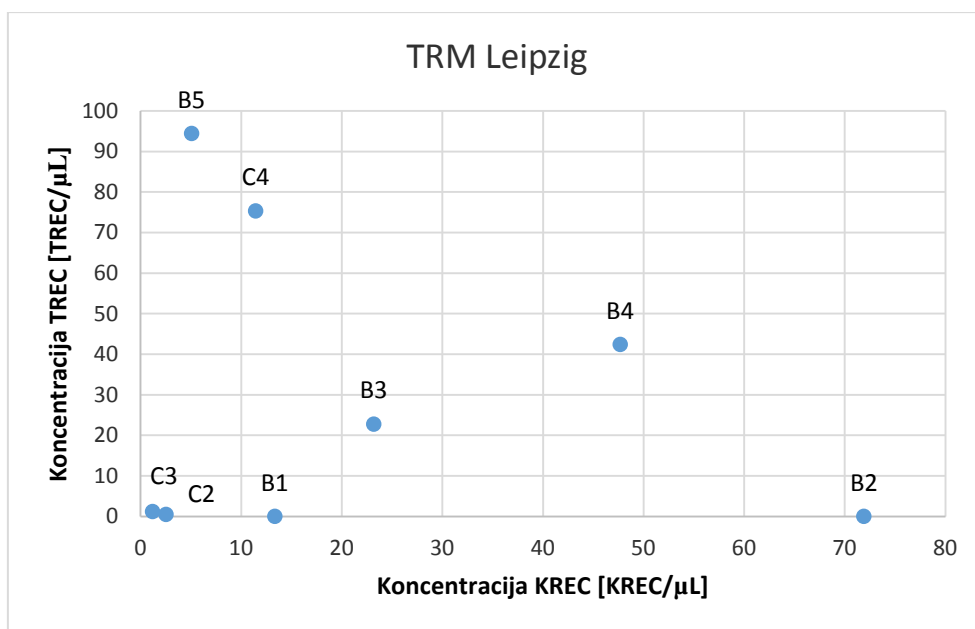
Graf 15 Umeritvena krivulja TRM SCREEN-ID ACTB

#### 4.2.2. Rezultati vzorcev TRM Leipzig SCREEN-ID

Zaradi omejitev ploščice TRM Leipzig SCREEN-ID nismo mogli izmeriti koncentracij zdravim preiskovance. Zaradi tega nismo mogli oceniti, kakšni so pričakovani rezultati zdravih novorojenčkov. Na podlagi podatkov smo lahko zanesljivo ovrednotili samo vzorce, pri katerih je bil kateri izmed analitov odsoten (Graf 16, Tabela XI).

Pri vzorcih B1 in B2 smo dobili podobne rezultate: odsotnost analita TREC in prisotnost analita KREC. Rezultati odgovarjajo literaturnim virom za obolele s SCID. Pri vzorcu B3 smo dobili nizki koncentraciji analitov TREC in KREC. Literaturnih virov za vpliv mutacije *PI3KCD* na koncentracije TREC in KREC nismo našli. Vzorec B4 je imel nizke koncentracije analitov TREC in KREC. Zaradi odsotnosti zdravih preiskovancev ne moremo potrditi, ali je nizka koncentracija patološka ali ne. Bolniki s CID imajo lahko nizke ali normalne koncentracije analitov TREC in KREC. Vzorec B5 je prav tako pripadal bolniku s CID. Koncentracija TREC je bila najvišja med izmerjenimi vzorci, medtem ko je bila koncentracija KREC zelo nizka. Rezultat je pričakovan za bolnike s CID. Vzorci z oznakami C2, C3 in C4 so pripadali starejšim osebam. Vzorca C2 in C3 sta imela skoraj popolnoma odsotna analita TREC in KREC. Literaturni viri navajajo močno znižanje koncentracij s staranjem (34). Ker sta vzorca pripadala 35 in 37-letni osebi, so rezultati pričakovani. Vzorec C4 je pripadal 14 letnemu dekletu. Koncentracija KREC je bila nizka,

medtem ko je bila koncentracija TREC razmeroma visoka. Literaturni viri navajajo, da lahko imajo mladostniki še vedno razmeroma visoke koncentracije TREC in KREC, čeprav so velike razlike med posamezniki (34).



Graf 16 Rezultati analiz s kompletom TRM Leipzig SCREEN-ID

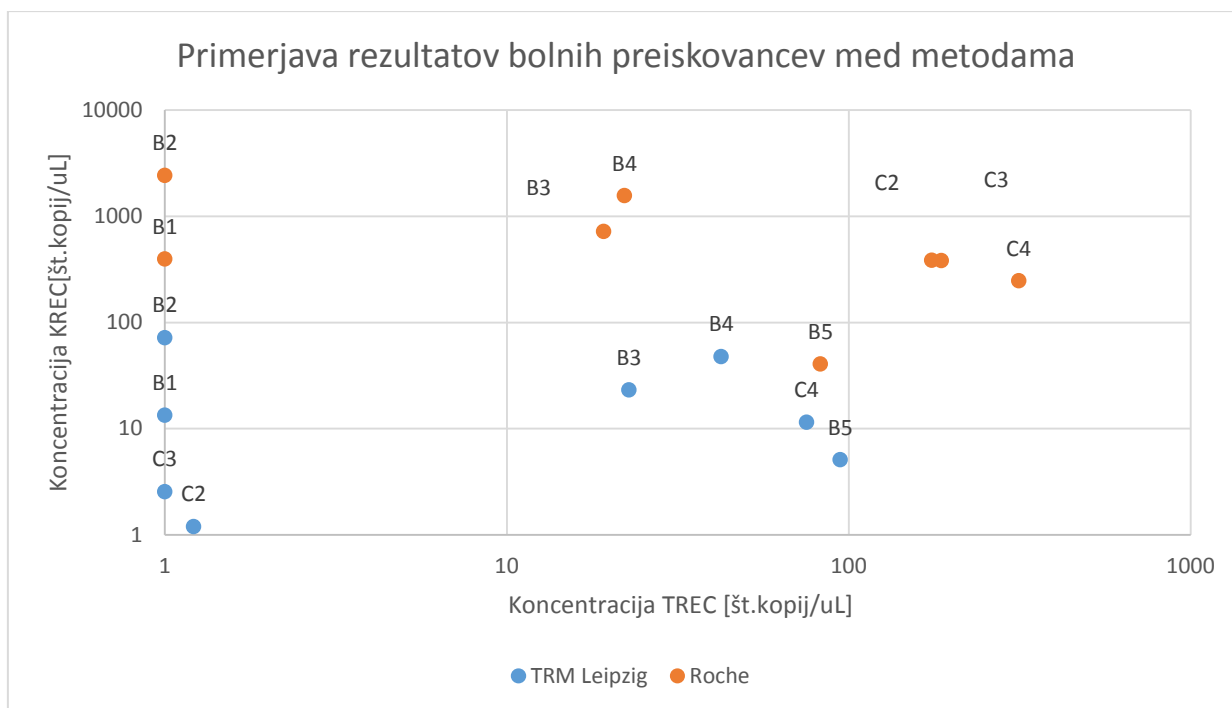
Tabela XI Seznam vzorcev analiziranih s kompletom TRM Leipzig SCREEN-ID

Oznaka vzorca	Opis vzorca
B1	SCID (JAK3)
B2	SCID (CD3 epsilon)
B3	PIK3CD hiperreaktivnost
B4	CID
B5	CID
C2	37-letni moški
C3	35-letna ženska
C4	13-letno dekle

#### 4.3. Primerjava metod TRM Leipzig SCREEN-ID in Roche modular TREC/KREC

Izračunani Paersonovi korelacijski koeficienti kažejo na dobro korelacijo pri vzorcih bolnih otrok. Izračunana povprečna razlika med metodama za analit TREC je  $7,12 \pm 8,79$ ,

za analit KREC pa  $992,6 \pm 931,1$ . Vrednosti za oba analita se precej razlikujeta, ker so med petimi bolniki štirje takšni, pri katerih smo zaznali odsotnost ali zmanjšano koncentracijo analita TREC in le en, ki ima zmanjšano koncentracijo analita KREC.



Graf 17 Primerjava rezultatov bolnikov med metodama Roche modular TREC/KREC in TRM Leipzig SCREEN-ID

Primerjali smo korelacijo med podatki, ki smo jih dobili po obeh metodah. Izračunali smo Paersonov korelacijski koeficient (Tabela XII).

Tabela XII Korelacija med metodama Roche modular TREC/KREC ter TRM Leipzig SCREEN-ID

Vzorci	Paersonov koeficinet	
B1-B5, C2-C4 TREC	0,315	Nesignifikanten koeficient
B1-B5, C2-C4 KREC	0,975	Signifikanten, $p=0,01$
B1-B5 TREC	0,981	Signifikanten, $p=0,01$
B1-B5 KREC	1	Signifikanten, $p=0,01$
C2-C4 TREC	-0,996	Nesignifikanten koeficient
C2-C4 KREC	-0,996	Nesignifikanten koeficient

Med sabo smo primerjali vse analize, ločeno vzorce B1, B2, B3, B4, B5 med obema metodama ter ločeno vzorce C2,C3,C4 med obema metodama. Vzorce B1-B5 so pripadali bolnikom in so bili odvzeti ob rojstvu, vzorce C2-C4 pa so pripadali odraslim osebam.

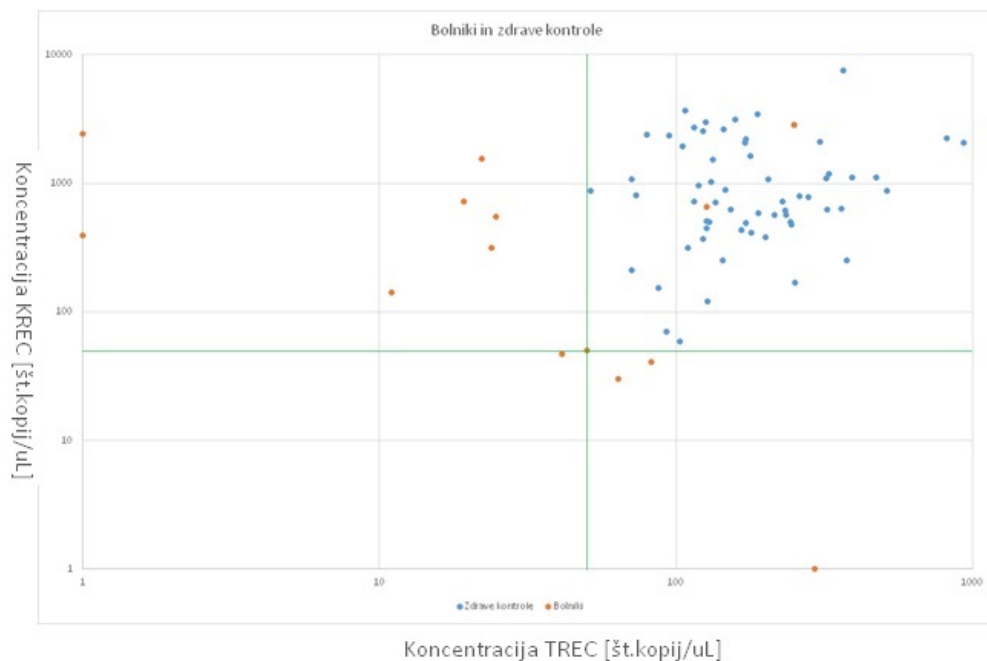
Vzorci, odvzeti ob rojstvu, so med sabo izkazovali visoko mero korelacije ( $p=0.01$ , dvostranski test). Vzorci odvzeti odraslim osebam, med sabo niso izkazovali korelacije.

#### 4.4. Določitev mejnih vrednosti

Ob uporabi meje 50 kopij TREC /  $\mu\text{L}$  krvi in 50 kopij KREC /  $\mu\text{L}$  krvi bi v našem primeru zaznali 11 od 13ih bolnikov. Mejo smo predlagali na podlagi grafa (Graf 19), pri čemer smo poskusili pod mejo vključiti največje število bolnih preiskovancev in najmanjše število zdravih preiskovancev. Preostala bolnika, ki ju test ni zaznal, sta imela normalne koncentracije obeh analitov.

Raziskava je bila v primerjavi s tujimi objavljenimi raziskavami manjšega obsega. S kompletom Roche modular TREC/KREC smo uspeli analizirati 67 zdravih otrok in 13 bolnikov. S tem nam je uspelo zagotoviti delovanje metode in primerno ločevanje med bolniki in zdravimi otroki. Za ustrezno statistično podprto metodo bi morali izvesti obsežnejše časovno in številčno ugotavljanje koncentracij. Primer takšne raziskave je švedska raziskava iz leta 2012 (28). Raziskava je vključevala 2560 švedskih novorojenčkov in je zaznala 6 bolnikov s primarno imunsko pomanjkljivostjo.

Ocenjujemo, da bi za uspešno postavitev diagnostične metode in določitev mejnih koncentracij TREC in KREC potrebovali vsaj 6 mesecev in 1000 analiziranih vzorcev. S tem bi lahko precej bolje ocenili območje normalnih rezultatov, česar s samo 67 vzorci ne moremo.



Graf 18 Predlagane mejne vrednosti

#### 4.5. Cena

Cena izvedbe preiskave Roche modular TREC/KREC je 6,5 €

Master Mix	0,5 €
Vsebnik s pokrovčkom	0,1 €
Sonde TREC	2,2 €
Sonde KREC	2,2 €
Sonde MSTN	1,6 €

V ceno ni všteta izolacija DNA, material (nastavki za pipete, epice ...), električna energija, amortizacija naprav in strošek dela. Najmanjše pakiranje zadošča za 96 preiskav. Analizni komplet je zasnovan tako, da omogoča analizo enega ali več vzorcev. Zraven vzorcev moramo ob vsakem testiranju imeti še 3 pozitivne kontrole in 1 negativno kontrolo.

Največje število hkratnih vzorcev je odvisno od specifikacij qPCR naprave.

Najzmogljivejše naprave lahko hkrati analizirajo do 384 vzorcev, vendar je potrebno na novo razviti metodo (optimizacija časov podvojevanja).

Cena preiskave TRM Leipzig SCREEN-ID ni znana. Iz osebne korespondence s predstavnikom podjetja TRM Leipzig sklepamo na ceno okoli 3€na posamezno preiskavo. V ceno ni všteti potrošni material (nastavki za pipete, epice ipd.), električna energija, amortizacija naprav in delo. Pri tej preiskavi ni potreben ločen postopek izolacije DNA, saj je ta že vključena v korake 21-23 navodila za izvedbo SCREEN-ID TRM Leipzig. Proizvajalec ponuja samo večja pakiranja – 5000 preiskav ali več. Preiskave se izvajajo na ploščicah z 96 mesti. 12 mest je rezerviranih za umeritveno premico, 84 pa za vzorce. Analiza posameznega vzorca je možna, vendar v tem primeru izgubimo možnost kasnejše izvedbe preostalih 83 analiz na ploščici. Proizvajalec ponuja samo ploščice s 96 mesti.

Na ceno močno vplivajo vzorci, ki zahtevajo ponovno analizo. Švedska raziskava je imela 0,86 % delež ponovljenih preiskav zaradi različnih vzrokov. Pri raziskavi je z metodo Roche modular TREC/KREC potrebovalo ponovljeno preiskavo 10,4 % vzorcev zdravih otrok. Razlika je pričakovana, saj smo mi prvič izvajali preiskavo, medtem ko je švedska raziskovalna skupina že imela popolnoma razvito metodo.

V okviru mag naloge smo izvedli študijo izvedljivosti določanja bioloških označevalcev TREC in KREC z dvema analiznima kompletoma. Ovrednotili smo potencialno uporabnost rezultatov pri diagnostiki primarnih imunskih pomanjkljivosti in ugotovili, da je metoda Roche modular TREC/KREC ustrezna metoda za analizo vzorcev manjšega števila novorojenčkov.

## 5. Sklep

V okviru magistrske naloge smo prišli do naslednjih zaključkov:

1. Obe metodi imata ustrezno linearnost odziva.
2. Po metodi Roche modular TREC/KREC smo uspeli 11 od 13 bolnikov ugotoviti znižane vrednosti vsaj enega izmed analitov. Eden izmed preostalih dveh vzorcev pripada bolniku, pri katerem nismo pričakovali znižanih vrednosti. Metoda daje pričakovane rezultate.
3. Metoda Roche modular TREC/KREC daje absolutno večje koncentracije obeh analitov od pričakovanih. Predlagamo nakup plazmidov znanih koncentracij, ki bi omogočili natančnejšo kvantifikacijo.
4. Z metodo TRM Leipzig SCREEN-ID smo 5 bolnikov izmerili pričakovano nizke vrednosti analitov TREC ali KREC.
5. Predlagamo ponovno izvedbo dela raziskave na analiznem kompletu TRM Leipzig SCREEN-ID, s katero bi ugotovili obseg koncentracij TREC in KREC pri zdravi populaciji.
6. Rezultati petih bolnikov, ki smo jih analizirali z obema metodama, izkazujejo visoko stopnjo korelacije med obema metodama.
7. Za nadaljnje raziskave predlagamo mejo za sum na PID po metodi Roche modular TREC/KREC 50 kopij TREC /  $\mu\text{L}$  krvi in 50 kopij KREC /  $\mu\text{L}$  krvi.
8. Za namene analiz posameznih bolnikov predlagamo uporabo analiznega kompleta Roche modular TREC/KREC. Za namene presejalnega testiranja predlagamo analizni komplet TRM Leipzig SCREEN-ID ali kateri drug primerljiv komplet, ki bi omogočal visoko stopnjo avtomatizacije.



## 6. Bibliografija

1. Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova J-L, Chatila T, Conley ME, Cunningham-Rundles C, et al. Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the international union of immunological societies expert committee for primary immunodeficiency. *Front Immunol*. 2014;5:162.
2. 10 Warning Signs [Internet]. JMF. [Dostopano 20 maj 2015]. Dostopno na: <http://www.info4pi.org/library/educational-materials/10-warning-signs>
3. Boyle JM, Buckley RH. Population Prevalence of Diagnosed Primary Immunodeficiency Diseases in the United States. *J Clin Immunol*. 2007;27(5):497–502.
4. Notarangelo L, Casanova J-L, Fischer A, Puck J, Rosen F, Seger R, et al. Primary immunodeficiency diseases: an update. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114(3):677–87.
5. Notarangelo LD, Fischer A, Geha RS, Casanova J-L, Chapel H, Conley ME, et al. Primary immunodeficiencies: 2009 update. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(6):1161–78.
6. Kwan A, Abraham RS, Currier R, et al. NEwborn screening for severe combined immunodeficiency in 11 screening programs in the united states. *JAMA*. 2014 Aug 20;312(7):729–38.
7. Cossu F. Genetics of SCID. *Ital J Pediatr*. 2010;36:76.
8. Bertrand Y, Müller SM, Casanova JL, Morgan G, Fischer A, Friedrich W. Reticular dysgenesis: HLA non-identical bone marrow transplants in a series of 10 patients. *Bone Marrow Transplant*. 2002;29(9):759–62.
9. Puck JM. Laboratory technology for population-based screening for severe combined immunodeficiency in neonates: The winner is T-cell receptor excision circles. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129(3):607–16.
10. de Vries E. Patient-centred screening for primary immunodeficiency: a multi-stage diagnostic protocol designed for non-immunologists. *Clin Exp Immunol*. 2006;145(2):204–14.
11. Buckley RH, Schiff RI, Schiff SE, Markert ML, Williams LW, Harville TO, et al. Human severe combined immunodeficiency: Genetic, phenotypic, and functional diversity in one hundred eight infants. *J Pediatr*. 1997;130(3):378–87.
12. McGhee SA, Stiehm ER, Cowan M, Krogstad P, McCabe ERB. Two-tiered universal newborn screening strategy for severe combined immunodeficiency. *Mol Genet Metab*. 2005;86(4):427–30.
13. Janik DK, Lindau-Shepard B, Comeau AM, Pass KA. A Multiplex Immunoassay Using the Guthrie Specimen to Detect T-Cell Deficiencies Including Severe Combined Immunodeficiency Disease. *Clin Chem*. 2010;56(9):1460–5.
14. National Newborn Screening Status Report Update 11/02/14 [Internet]. [Dostopano 21 maj 2015]. Dostopno na: <http://genes-r-us.uthscsa.edu/sites/genes-r-us/files/nbsdisorders.pdf>

15. Hazenberg MD, Verschuren MC, Hamann D, Miedema F, Dongen JJ. T cell receptor excision circles as markers for recent thymic emigrants: basic aspects, technical approach, and guidelines for interpretation. *J Mol Med*. 2001;79(11):631–40.
16. Douek DC, McFarland RD, Keiser PH, Gage EA, Massey JM, Haynes BF, et al. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature*. 1998;396(6712):690–5.
17. Verschuren MC, Wolvers-Tettero IL, Breit TM, Noordzij J, Wering ER van, Dongen JJ van. Preferential rearrangements of the T cell receptor-delta-deleting elements in human T cells. *J Immunol*. 1997;158(3):1208–16.
18. Sottini A, Ghidini C, Zanotti C, Chiarini M, Caimi L, Lanfranchi A, 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. *Clin Immunol*. 2010;136(2):217–27.
19. Dongen JJM van, Langerak AW, Brüggemann M, Evans P a. S, Hummel M, Lavender FL, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003;17(12):2257–317.
20. Serana F, Chiarini M, Zanotti C, Sottini A, Bertoli D, Bosio A, et al. Use of V(D)J recombination excision circles to identify T- and B-cell defects and to monitor the treatment in primary and acquired immunodeficiencies. *J Transl Med*. 2013;11:119.
21. Bartlett JS, Stirling D. A Short History of the Polymerase Chain Reaction. In: Bartlett JS, Stirling D, editors. *PCR Protocols* [Internet]. Humana Press; 2003 [Dostopano 18 Januar 2016]. p. 3–6. (Methods in Molecular Biology™). Dostopno na: <http://dx.doi.org/10.1385/1-59259-384-4%3A3>
22. Schwartz JJ, Quake SR. Single molecule measurement of the “speed limit” of DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci*. 2009;106(48):20294–9.
23. Logan J, Edwards KJ, Saunders NA. *Real-time PCR: Current Technology and Applications*. Horizon Scientific Press; 2009. 301 p.
24. Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol*. 2002;30(6):503–12.
25. Swango KL, Hudlow WR, Timken MD, Buoncristiani MR. Developmental validation of a multiplex qPCR assay for assessing the quantity and quality of nuclear DNA in forensic samples. *Forensic Sci Int*. 2007;170(1):35–45.
26. Qiagen. *QIAamp® DNA Micro Handbook*. December 2014 Digital edition. Vol. 2014.
27. TRM Leipzig. User guide and protocol TREC-KREC-ACTB For newborn dried blood screening.
28. Borte S, Döbeln U von, Fasth A, Wang N, Janzi M, Winiarski J, et al. Neonatal screening for severe primary immunodeficiency diseases using high-throughput triplex real-time PCR. *Blood*. 2012;119(11):2552–5.

29. Roifman CM, Somech R, Kavadas F, Pires L, Nahum A, Dalal I, et al. Defining combined immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;130(1):177–83.
30. Olbrich P, de Felipe B, Delgado-Pecellin C, Rodero R, Rojas P, Aguayo J, et al. A first pilot study on the neonatal screening of primary immunodeficiencies in Spain: TRECS and KRECS identify severe T- and B-cell lymphopaenia. *An Pediatría Engl Ed*. 2014;81(5):310–7.
31. Kamae C, Nakagawa N, Sato H, Honma K, Mitsui N, Ohara O, et al. Common variable immunodeficiency classification by quantifying T-cell receptor and immunoglobulin  $\kappa$ -deleting recombination excision circles. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131(5):1437–40.e5.
32. Lingman Framme J, Borte S, von Döbeln U, Hammarström L, Oskarsdóttir S. Retrospective analysis of TREC based newborn screening results and clinical phenotypes in infants with the 22q11 deletion syndrome. *J Clin Immunol*. 2014;34(4):514–9.
33. Lev A, Amariglio N, Levy Y, Spierer Z, Anikster Y, Rechavi G, et al. Molecular assessment of thymic capacities in patients with Schimke immuno-osseous dysplasia. *Clin Immunol*. 2009;133(3):375–81.
34. Serana F, Airò P, Chiarini M, Zanotti C, Scarsi M, Frassi M, et al. Thymic and Bone Marrow Output in Patients with Common Variable Immunodeficiency. *J Clin Immunol*. 2011;31(4):540–9.