

шие проблемы у арктических улусов связаны с удаленностью от столицы республики и населенных пунктов от районных центров, со сложной транспортной схемой, недостаточной кадровой базой.

Данные, полученные в результате комбинированного пренатального скрининга, обосновывают необходимость не только накопления собственных результатов для определения нормального уровня маркеров в крови беременных обследуемой популяции, но и корректировки МоМ с учетом региональных особенностей, так как в программном обеспечении «Астрайя» учитывается этническая принадлежность беременной, от которой зависит конечный расчет риска. Это делает необходимым составление в каждой лаборатории таблицы измерений показателей на определенной неделе беременности для расчета собственных значений медианы. Региональные значения медианы должны служить основой для расчета индивидуального риска рождения ребенка с хромосомной патологией.

Обучение и внешний аудит по программе FMF позволяет унифицировать методологию УЗИ и дает возможность считать достоверными результаты фетометрии, выполняемой данными специалистами. Это в конечном итоге определяет точность расчета индиви-

дуального риска врожденных нарушений развития у ребенка.

Заключение. Актуальной задачей являются дальнейшее изучение прогностического значения оценки толщины воротникового пространства плода как пренатального эхографического маркера врожденных и наследственных заболеваний и разработка алгоритма комплексного обследования плодов с расширенным воротниковым пространством в различные сроки беременности. Необходимо решение вопроса о внедрении в труднодоступных районах республики молекулярного пренатального скрининга для диагностики анеуплоидий по 5 хромосомам (X, Y, 21, 13, 18) методом ПЦР.

С целью улучшения эффективности пренатальной диагностики следует выработать региональные фетометрические показатели для целенаправленного формирования группы риска для инвазивной цитогенетической диагностики, внедрить новые молекулярно-генетические методы анализа кариотипа плода для решения вопроса о прогнозе для плода, тактике ведения беременности. Надлежит улучшить качественные показатели комбинированного пренатального скрининга в целом, что включает: а) охват населения скринингом не менее 80%; б) повышение параметров качества измерений ультразвуковых показателей, для чего

необходимо постоянное обучение врачей пренатальной диагностики, максимальная сертификация врачей по FMF (международные сертификаты по УЗИ) для более точного проведения пренатального скрининга по международным стандартам диагностики, продолжать оснащение ЛПУ в г. Якутске и в районных центрах улусов республики ультразвуковыми аппаратами высокого и экспертного класса; в) разработку региональных значений медианы биохимических маркеров для точного расчета индивидуального риска врожденных нарушений у ребенка.

Литература

1. Современные алгоритмы и новые возможности пренатальной диагностики наследственных и врожденных заболеваний: методич. рекомендации / В.С. Баранов, Т.В. Кузнецова, Т.К. Кашеева [и др.]; под ред. В.С. Баранова и Э.К. Айламазяна. – СПб.: Изд-во Н-Л, 2013. – 156 с.

The modern algorithms and new possibilities of prenatal diagnostics of hereditary and congenital diseases: methodological recommendations / V.S. Baranov, Kuznetsova T.V., Kashcheeva T.K. [et al.]; ed. V.S. Baranov, E.K. Ailamazyan. - SPb.: Publishing House N-L, 2013. - p. 156.

2. Юдина Е.В. Ультразвуковая пренатальная диагностика хромосомных аномалий во втором триместре беременности: дисс. д-ра мед. наук / Е.В. Юдина. – М., 2003.

Yudina E.V. Ultrasound prenatal diagnostics of chromosomal abnormalities in the second trimester of pregnancy: MD diss. thesis / E.V. Yudina. – M., 2003.

УДК 616-079.3

К.К. Павлова, Е.В. Тапыев, А.А. Петрова, В.А. Захарова,
С.К. Степанова, Н.Р. Максимова, А.Н. Ноговицына,
А.Л. Сухомясова

НЕОНАТАЛЬНЫЙ СКРИНИНГ НА МУКОВИСЦИДОЗ В РЕСПУБЛИКЕ САХА ЯКУТИЯ

Неонатальный скрининг на муковисцидоз предполагает раннюю пресимптоматическую диагностику заболевания у новорожденных. Целью исследования было определение эффективности неонатального скрининга на муковисцидоз в Республике Саха (Якутия). В работе представлены результаты неонатального скрининга, потовой пробы и молекулярно-генетического исследования образцов ДНК новорожденных с гипертрипсиногемией (уровень иммунореактивного трипсина при первом тестировании – ИРТ > 70 нг/мл) и пациентов с наиболее частыми мутациями гена *CFTR*.

Ключевые слова: муковисцидоз, неонатальный скрининг, потовая проба, ген *CFTR*, ДНК-диагностика.

ФГБУ ЯНЦ КМП СО РАМН: ПАВЛОВА Кюнна Константиновна – к.м.н., с.н.с., kunna_pavlova@mail.ru, ТАПЫЕВ Евгений Викторович – м.н.с., ЗАХАРОВА Валентина Аркадьевна – м.н.с., СТЕПАНОВА Светлана Кимовна – с.н.с., МАКСИМОВА Надежда Романовна – д.м.н., зав.лаб., НОГОВИЦЫНА Анна Николаевна – к.м.н., с.н.с., СУХОМЯСОВА Айталиа Лукича – к.м.н., зав.лаб.: ПЕТРОВА Айталиа Александровна – врач-лаборант МГК РБ №1-НЦМ.

Neonatal screening for cystic fibrosis involves early presymptomatic diagnosis of the disease in newborns. The aim of the study was to determine the effectiveness of neonatal screening for cystic fibrosis in the Republic Sakha (Yakutia). The results of neonatal screening, sweat samples and molecular genetic testing of DNA samples from the newborns with hypertrypsinogenemia (level of immunoreactive trypsin in the first test – IRT>70 ng/ml) and patients with the most common gene mutation *CFTR*.

Keywords: cystic fibrosis, newborn screening, sweat test, gene *CFTR*, DNA-diagnostics.

Введение. Муковисцидоз (Cystic Fibrosis) – наиболее частая наследственная полиорганная патология, характеризующаяся выраженной генетической гетерогенностью и клиническим

полиморфизмом. Это моногенное заболевание, обусловленное мутацией гена *MBTP (CFTR)* (муковисцидозного трансмембранного регулятора проводимости), характеризующееся пора-

жением экзокринных желез жизненно важных органов и имеющее обычно тяжелое течение и прогноз [1]. В настоящий момент описаны более 1500 мутаций и 250 полиморфизмов в гене MBTP (*CFTR* mutation database, <http://www.genet.sickkids.on.ca/CFTR/>). Ген *CFTR* был изолирован в 1989 г. Он содержит 27 экзонов, охватывает 250 000 пар нуклеотидов и расположен в середине длинного плеча 7 хромосомы. Проведенные в 1999-2000 гг. мультицентровые исследования с участием отечественных ученых (Н.И. Капранов, Е.К. Гинтер, В.С. Баранов) охватили 17 стран Центральной и Восточной Европы, включая Россию. В результате этих исследований предложен список из 33 частых мутаций, характерных для этих стран. Среди них наиболее частой является мутация delF508, вторая по частоте – del21kb (*CFTR* dele 2,3). Частота 6 мутаций (N1303K, G542X, W1282X, 3849+10kbC>T, 2143delT, 2184insA) – более 1% [3]. Частота муковисцидоза варьирует в разных популяциях мира весьма в широких пределах (например, в Европе от 1:1800 новорожденных в Ирландии до 1:26000 в Финляндии). Оценки частоты муковисцидоза в разных популяциях РФ также весьма различны (от 1:4900 до 1:12000 новорожденных) [4].

Неонатальный скрининг на муковисцидоз (MB, CF; OMIM no.219700) – один из эффективных методов, позволяющий обеспечить раннее выявление заболевания и своевременное начало лечения, предотвратить или замедлить развитие тяжелых проявлений заболевания, ведущих к инвалидизации и/или ранней гибели ребенка. Муковисцидоз в настоящее время стал национальной приоритетной программой в Российской Федерации. В Республике Саха (Якутия) с 2006 г. в рамках национального приоритетного проекта «Здоровье» проводится массовый скрининг новорожденных на MB. Наряду с фенилкетонурией, галактоземией, врожденным гипотиреозом и адреногенитальным синдромом MB был включен в перечень наследственных заболеваний, подлежащих обязательному неонатальному скринингу.

Обнаружение в 1970-е гг. повышенного уровня иммунореактивного трипсина (ИРТ) в плазме крови больных MB послужило началом массового скрининга новорожденных на данное заболевание. Протокол скрининга на MB в России включает 4 этапа: определение ИРТ в высушенном пятне крови новорожденного, повторный ИРТ (ретест), потовый тест и ДНК-диагнос-

тика, причем только три являются обязательными [2].

Материалы и методы. Материалом для исследования служили данные, полученные в результате обследования на MB 112019 новорожденных за период 2006–2013 гг. Определение уровня иммунореактивного трипсина в высушенных пятнах крови осуществляли иммунофлюоресцентным методом с временным разрешением с использованием реактивов DELFIA Neonatal IRT (Perkin Elmer/Wallac, Финляндия). Исследование крови новорожденных проводилось в биохимической лаборатории медико-генетической консультации Перинатального центра Республиканской больницы №1-Национального центра медицины. При положительном результате скрининга (ИРТ >70 нг/мл) проводили повторное определение ИРТ в образцах крови. При повторно высоком уровне ИРТ (>40 нг/мл) проводили потовую пробу. Потовая проба проводилась титрованием по методу Гибсона-Кука и с помощью потового анализатора (система для стимуляции потоотделения и анализа пота) Nanoduct (Wescor, США). Измерялась «эквивалентная» концентрация хлорида натрия в потовой жидкости. За норму принимались результаты 0-60 ммоль/л, показатели 60-80 ммоль/л расценивались как пограничные, 80 ммоль/л и выше – считались положительными для муковисцидоза. В рамках неонатального скрининга в лаборатории молекулярной генетики МГК с 2011 г. начато молекулярно-генетическое исследование гена муковисцидоза *CFTR* с использованием тест-системы CF-11 (мутации del21kb, L138ins, delI507, delF508, 394delTT, 604insA, 1677delTA, 2143delT, 2184insA, 3821delT, 3944delTG) и CF5-L (G542X, W1282X, N1303K, 3849+10kbC>T, R334W), разработанной ООО «Центр молекулярной генетики» (г. Москва). Выделение ДНК для молекулярно-генетических исследований проводили из цельной венозной крови и пятен крови на фильтровальной бумаге, используя набор реактивов «DNA-Blood» и «DNA-Prep» соответственно, по методике, рекомендованной изготовителем.

С декабря 2013 г. внедрена диагностика MB методом обратной гибридизации на биочипе с помощью набора «Муковисцидоз-БиоЧип» («Алькор Био», Санкт-Петербург). Детекция гибридизованных биочипов проводится на сканере Perkin Elmer ScanRi (Perkin Elmer, США). Метод позволяет одновременно детектировать 25 наиболее часто встречающихся на тер-

ритории Российской Федерации мутаций в гене *CFTR*: F508del, Del ex2-3, 2143delT, G542X, G551D, 2184insA, W1282X, N1303K, 3732delA, 1717-1G>A, 1677delTA, 2188AA-G, S1196X, 3821delT, R553X, 1078delT, I507del, 2789+5G>A, R1162X, 3849+10kbC>T, G85E, 621+1G>T, R347P, R347H, R334W. В настоящее время метод находится в стадии оптимизации.

Результаты и обсуждение. Массовый скрининг на муковисцидоз был начат в августе 2006 г. За это время было обследовано 112 019 новорожденных (охват скринингом 99,5%). Количество новорожденных с первично повышенным уровнем ИРТ – 1474 (1,3%), проведено ретестов на 21-28-й день жизни 1050 (71,2%). Повышение ИРТ при ретесте – 52 (5%).

Потовая проба титрованием по методу Гибсона-Кука в биохимической лаборатории МГК проводится с 1989 г., ежегодно выполняется около 200 проб. Анализатор пота Nanoduct применяется с 2008 г. Потовый тест на анализаторе Nanoduct проведен в 239 случаях (кроме детей с положительным ретестом мы проводили потовые пробы и детям с однократным положительным тестом, у которых по каким-либо причинам не был сделан ретест).

По результатам потового теста выявлено 4 детей с MB: один ребенок из г. Якутска, трое из улусов – Томпонского, Мирнинского и Алданского. Меконикальный илеус имел место в одном случае. У выявленных больных детей уровень ИРТ при первом обследовании в среднем составил 184,5 нг/мл, при проведении ретеста – в среднем 160,8 нг/мл. Таким образом, при данной форме скрининга наблюдается прямая зависимость между степенью повышения биохимического маркера и долей выявленных больных.

Молекулярно-генетическое обследование с 2011 г. проведено у 246 пациентов. Гомозиготное состояние по мутации delF508 установлено у 4 пациентов, гетерозиготное – у 11, компаунд del21kb/W1282X и del21kb/2184insA – у 2 (таблица). Один ребенок умер с ИРТ > 200 нг/мл, потовая проба не проведена. Диагноз муковисцидоз был подтвержден молекулярно-генетическим исследованием, выявившим мутацию delF508 в гомозиготном состоянии.

В результате неонатального скрининга в большинстве случаев (исключая индивидов, у которых MB манифестирует меконикальным илеусом) пораженные MB диагностируются до начала клинических проявлений. Связь между *CFTR*-генотипом и фе-

Результаты молекулярно-генетического исследования за 2011–2013 гг.

Год	Число исследованных	Генотип	Число выявленных
2011	24	delF508/-	3
		delF508/delF508	2
		del21kb/W1282X	1
2012	168	delF508/-	6
		delF508/delF508	1
		del21kb/2184insA	1
2013	54	delF508/-	2
		delF508/delF508	1

нотипом при МВ не является прямой. Клинические проявления МВ – следствие взаимодействия трех факторов: CFTR-мутаций, модифицирующих факторов в гене *CFTR* и/или других генах и влияния окружающей среды [5]. Классификация CFTR-мутаций основана на природе молекулярного дефекта и его влияния на функцию хлорного канала. Мутации I, II, и III классов, такие как W1282X, delF508, G542X, значительно снижают или полностью нарушают активность CFTR-канала и ассоциированы с классическим фенотипом МВ: поражением легких, повышенным уровнем хлоридов в поте, панкреатической недостаточностью и нарушением фертильности у мужчин. При мутациях IV, V и VI классов, например R334W и R117H, частичная активность хлорного канала сохраняется, хотя проводимость хлоридов снижена. Эти мутации ассоциированы с сохранением функции поджелудочной железы и поздним началом заболевания. Но следует иметь в виду, что тяжесть и характер поражений широко варьирует даже у пациентов с одинаковым генотипом [6].

Выводы. Неонатальный скрининг является единственным методом ранней диагностики муковисцидоза, позволяющим своевременно начать лечение и повысить качество и продолжительность жизни больных муковисцидозом. Неонатальный скрининг эффективен только при условии охвата не менее 98% новорожденных, своевременной доставке тест-бланков в лабораторию и бесперебойном снабжении реагентами и расходными материалами. Для полной верификации диагноза необходимо применение подтверждающих методов, таких как потовая проба по

методу Гибсона-Кука, анализатор пота типа Nanoduct и молекулярно-генетические методы.

Учитывая трудоемкость теста и чувствительность результатов потовой пробы к разного рода погрешностям, к лаборатории, выполняющей тест, предъявляются определенные требования: более 150 тестов в год. Метод предъявляет высокие требования к квалификации выполняющего персонала

и качеству применяемых реактивов. В то же время способ титрования не требует специальной аппаратуры и расходных материалов. Данный классический метод является «золотым стандартом» диагностики муковисцидоза. Для детей первых месяцев жизни, у которых сложно или невозможно получить достаточную для достоверного анализа навеску пота на фильтровальной бумаге, методом выбора является потовый анализатор Nanoduct. Также анализатор дает возможность провести потовый тест за пределами лаборатории.

На сегодняшний день наиболее актуальными молекулярно-генетическими методами для диагностики муковисцидоза являются мультиплексная ПЦР и гибридизация на биочипах, позволяющие одновременно детектировать ряд мутаций в гене *CFTR*. Молекулярно-генетические методы позволяют подтвердить диагноз муковисцидоза при пограничных результатах вышеуказанных потовых тестов. Ценность молекулярно-генетической диагностики заключается также в получении дополнительной информации для научных исследований. Недостатком молекулярно-генетических методов является высокая стоимость и невозможность выявления непредусмотренных применяемым методом мутаций. При проведении потовой пробы могут встречаться пограничные, а также, в небольшом проценте случаев, ложноотрицательные результаты, в таком случае необходимо провести ДНК-диагностику муковисцидоза.

Внедрение молекулярно-генетического анализа гена *CFTR* у выявленных по скринингу новорожденных больных позволило выявить тип мутации

delF508, del21kb, W1282X и 2184insA в популяции Республики Саха (Якутия).

Диагностика заболевания с помощью неонатального скрининга позволяет проводить ранние лечебно-реабилитационные мероприятия, что должно привести в конечном итоге к улучшению качества и продолжительности жизни этих детей. Проведение генетического анализа до манифестации клинических проявлений необходимо для превентивных мероприятий, прогнозирования течения заболевания. Полученные данные исследования важны для планирования и реализации программ по ранней диагностике, лечению и реабилитации детей с муковисцидозом.

Литература

1. Капанов Н.И. Муковисцидоз (современные достижения и актуальные проблемы) / под ред. Н.И. Капанова, Н.Ю. Каширской. – М., 2005. – 104 с.
2. Капанов Н.И. Перспективы ранней диагностики и адекватного лечения детей, больных муковисцидозом, в РФ / Н.И. Капанов, Н.Ю. Каширская, В.Д. Шерман // Муковисцидоз у детей и взрослых: мат-лы IX Национального конгресса по муковисцидозу. – 2009. – С.7-12.
3. Петрова Н.В. Молекулярно-генетические особенности муковисцидоза в российских популяциях / Н.В. Петрова // Медицинская генетика. – 2006. – Т.5, прил. 1. – С.19-24.
4. Петрова Н.В. Молекулярно-генетические и клинико-генотипические особенности муковисцидоза в российских популяциях: автореф. дис. д-ра биол. наук / Н.В. Петрова. – М., 2009. – 42 с.
5. Petrova N.V. Molecular genetic, clinical and genotypic characteristics of cystic fibrosis in the Russian populations: Author. dis. dr. biol. science / N.V. Petrova. – М., 2009. – 42 p.
6. Association between genetically determined pancreatic status and lung disease in adult cystic fibrosis patients / Y. Loubieres [et al.] // CHEST. – 2002. – Vol. 121, N 1. – P. 73-80.
7. CFTR genotype as a predictor of prognosis in cystic fibrosis / E.F. McKone [et al.] // Chest. – 2006. – Vol. 130, N5. – P. 1441-1447.