

<https://doi.org/10.25557/2073-7998.2023.12.20-32>

Современные молекулярно-генетические методы и подходы, применяемые в преконцепционном генетическом скрининге

Насыхова Ю.А., Карпович Л.А., Двойнова Н.М., Осиновская Н.С., Готов А.С.

ФГБНУ «Институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта»
199034, г. Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д.3

Преко́нцепционный скрининг (ПС) – это комплекс мероприятий, направленных на установление групп высокого риска и профилактику рождения детей с генетическими заболеваниями в этих группах. В рамках программ преко́нцепционного генетического скрининга выполняется исследование образцов биоматериала будущих родителей, которое обычно включает цитогенетическое исследование для исключения нарушений числа и структуры хромосом, а также анализ скрытого носительства моногенных болезней с аутосомно-рецессивным или X-сцепленным типами наследования. ПС является важнейшим инструментом оценки риска наследственной патологии в семьях на этапе планирования беременности и позволяет повысить информированность потенциальных родителей о наследственных факторах, связанных с беременностью, а также вовремя сформировать тактику планирования и ведения беременности для предотвращения рождения больного ребенка. В данной статье рассматриваются стратегии, подходы и методы исследования, которые в настоящее время используются при выполнении преко́нцепционного генетического скрининга носительства, а также обсуждаются результаты внедрения программ ПС в мире.

Ключевые слова: преко́нцепционный скрининг, профилактика наследственных болезней, генетический груз.

Для цитирования: Насыхова Ю.А., Карпович Л.А., Двойнова Н.М., Осиновская Н.С., Готов А.С. Современные молекулярно-генетические методы и подходы, применяемые в преко́нцепционном генетическом скрининге. *Медицинская генетика* 2023; 22(12): 20-32.

Авторы для корреспонденции: Насыхова Ю.А., Готов А.С.; **e-mail:** yulnasa@gmail.com, anglotov@mail.ru

Финансирование. Исследование выполнено в рамках реализации поисковой темы государственного задания ФГБНУ «НИИ АГир им. Д.О. Отта» №1022040700839-2-3.2.2 «Разработка и апробация алгоритма профилактики наследственных болезней для внедрения массового преко́нцепционного генетического скрининга в Северо-Западном регионе РФ».

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 30.11.2023

Modern molecular genetic methods and approaches used in the preconception carrier screening

Nasykhova Yu.A., Karpovich L.A., Dvoynova N.M., Osinovskaya N.S., Glotov A.S.

D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology
3, Mendeleevskaya line, Saint Petersburg, 199034, Russian Federation

Preconception carrier screening (PS) is a set of measures aimed at preventing the birth of children with genetic diseases and identifying high-risk groups. As part of preconception genetic screening programs, studies of biomaterial samples of future parents are carried out, which usually includes a cytogenetic study to exclude chromosome abnormalities, as well as analysis of the heterozygous carriage of monogenic autosomal recessive or X-linked diseases. PS is the most important tool for assessing the risk of hereditary pathology in families at the stage of pregnancy planning, which allows potential parents to increase awareness of hereditary factors associated with pregnancy, as well as to formulate timely strategy for planning and managing pregnancy to prevent the birth of a sick child. The article reviews the strategies, approaches, and methods that are currently used in preconception genetic screening, and discusses the impact of the carrier screening programs in the world.

Key words: preconception carrier screening, prevention of hereditary diseases, genetic load

For citation: Nasykhova Yu.A., Karpovich L.A., Dvoynova N.M., Osinovskaya N.S., Glotov A.S. Modern molecular genetic methods and approaches used in the preconception carrier screening. *Medical genetics [Medicinskaya genetika]*. 2023; 22(12): 20-32. (In Russ.)

Corresponding authors: Nasykhova Yu.A., Glotov A.S.; **e-mail:** yulnasa@gmail.com, anglotov@mail.ru

Funding. The research was carried out within the state assignment for D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology No. 1022040700839-2-3.2.2

Conflict of Interest. The authors declare no conflict of interest.

Accepted: 30.11.2023

Введение

Преконецепционный скрининг (ПС) — это специализированный вид медицинского обследования пары, проводимый до начала беременности с целью выявления риска генетических аномалий у потомства. ПС моногенных заболеваний включает в себя сбор анамнеза будущих родителей, в том числе данных о случаях наследственных болезней в семье, невынашивания беременности, рождения ребенка с множественными врожденными пороками развития (МВПР) или смерти ребенка в раннем возрасте, а также выполнение генетических исследований, целью которых является определение вероятности наследования патогенных вариантов, которые могут стать причиной генетических заболеваний у будущего ребенка [1]. Это позволяет паре принимать информированные репродуктивные решения и, при необходимости, осуществлять меры профилактики для снижения риска рождения ребенка с наследственной патологией. Особые рекомендации для прохождения ПС существуют для пар с семейным анамнезом генетических заболеваний, даже если они не имеют никаких других показаний, а также пар старше 35 лет [2, 3], поскольку они находятся в группе повышенного риска рождения детей с генетическими заболеваниями.

Во многих странах реализуются масштабные программы ПС. Самым успешным примером внедрения ПС является Израиль, где ПС является частью национальной бесплатной программы генетического скрининга носителей наследственных заболеваний. Программа была запущена в 2004 году и с тех пор охватила более 90% населения страны [4]. ПС проводится всем парам, планирующим беременность, а также женщинам, находящимся на ранних сроках беременности. Перечень генов, включенных в панель ПС, превышает 100 генов, ассоциированных с наиболее распространенными наследственными заболеваниями, и зависит от этнической принадлежности пары. При выявлении носительства наследственных заболеваний пациентам предоставляется консультация врача-генетика и информация о возможности профилактики наследственных болезней с использованием методов инвазивной пренатальной диагностики (ИПД) и преимплантационного генетического тестирования (ПГТ). Данная программа уже помогла предотвратить тысячи случаев рождения детей с наследственными заболеваниями и стала важным вкладом в улучшение здоровья населения страны.

Другой программой ПС, реализуемой на территории Израиля, является программа «Дор Йешарим»,

которая предлагает анонимный добрачный скрининг молодым одиноким взрослым из ультраортодоксальных еврейских общин. Поиск партнеров среди молодежи общины является правилом, наряду с запретом на инвазивные диагностические тесты или прерывание беременности. Любая «генетическая проблема» может привести к долговременной стигматизации носителя и всей его семьи. Тестирование является анонимным, его результаты хранятся в базе данных программы «Дор Йешарим». Сваха, которая занимается поиском пары для брака, или другое доверенное лицо молодых людей обращается в лабораторию для проверки генетической совместимости. Если оба партнера не являются носителями или если только один из них является носителем, сваха получает ответ о том, что потенциальная пара «генетически совместима», в противном случае, им будет сообщено, что их брак является «несовместимым». Анонимность тестирования была очень важным предварительным условием для этого сообщества и является одной из главных причин успеха программы «Дор Йешарим» [5].

На сегодняшний день в РФ нет программы ПС, которая реализуется на национальном уровне. В настоящее время отсутствуют клинические рекомендации по ПС, на стадии профессионального обсуждения находится список медицинских показаний к направлению на ПС. Кроме того, нет утвержденного перечня патогенных вариантов/генов для тестирования. К сожалению, данных о распространенности моногенных заболеваний в разных регионах и этнических группах, проживающих в РФ, также недостаточно. Все вышеперечисленное значительно усложняет развитие и внедрение масштабных программ ПС в РФ.

В настоящей работе рассматриваются основные стратегии и подходы молекулярно-генетического исследования пары, которые используются в рамках осуществления ПС, а также обсуждаются возможные преимущества и недостатки каждого из представленных подходов для реализации задач ПС и результаты внедрения программ скрининга в мире с использованием разных методов.

Основная часть

Традиционно реализация национальных программ ПС в большинстве стран мира начиналась с внедрения определения носительства одной или небольшого количества моногенных болезней (таргетный ПС). При этом скрининг носительства был нацелен на определенные группы высокого риска, главным образом, по этниче-

скому признаку. Сегодня собраны убедительные доказательства в пользу перехода к универсальной программе скрининга, которая предлагается всему населению, независимо от происхождения и семейного анамнеза. Такой подход стал возможен благодаря появлению, развитию и значительному удешевлению технологий секвенирования нового поколения, которые позволяют одновременно тестировать генетические варианты нескольких генов, сохраняя при этом точность, сравнимую с исследованием одного гена. Универсальный ПС предпочтителен поскольку большинство носителей рецессивных состояний не имеет семейного анамнеза этого состояния. Так, по оценкам зарубежных авторов, 94% новорожденных с муковисцидозом рождаются в семьях без семейного анамнеза [6]. Универсальный скрининг позволяет более эффективно выявлять носителей. Преимущества универсального скрининга включают устранение этнических или расовых факторов, снижение стигматизации и снятие с пациентов или врачей ответственности за выбор той или иной панели для анализа и, следовательно, за выявление риска. Однако

универсальный скрининг увеличит затраты и технически усложнит анализ генетических вариантов в разных лабораториях. Необходимо будет обеспечить адекватную точность и чувствительность для всего населения.

В настоящее время можно выделить 3 основных молекулярно-генетических подхода выявления патогенных вариантов, которые применяются в ПС – генотипирование (таргетное выявление мажорных патогенных вариантов), секвенирование (поиск всех доступных анализу патогенных вариантов), а также комбинация этих двух подходов. Подход генотипирования применяется при реализации таргетных программ ПС, направленных на оценку носительства определенных мутаций в одном или небольшом количестве генов. Универсальный ПС, как правило, выполняется с использованием NGS технологий и, в зависимости от включенных в скрининг вариантов и генов, может выполняться с помощью подхода секвенирования или в комбинации с другими молекулярно-генетическими методами. Основные параметры каждого из молекулярных подходов, а также их преимущества и недостатки представлены на рисунке.

ТАРГЕТНОЕ ГЕНОТИПИРОВАНИЕ	СЕКВЕНИРОВАНИЕ	КОМБИНАЦИЯ МЕТОДОВ
Несколько генов, мажорные варианты, часто этнически обусловленные	Панели генов, менделиом, полный экзом	Множество генов (например, экзом + <i>SMN1</i> , <i>FMR1</i> , <i>DMD</i>)
Простые технологии (как правило, ПЦР)	Таргетное или экзомное секвенирование	NGS, дополнительные тесты
- Низкая стоимость - Доступное оборудование	- Высокая производительность - Широкий охват вариантов - Возможность реанализа данных	- Максимальный охват вариантов - Соответствие рекомендациям ACMG - Возможность реанализа данных
- Низкая производительность - Ограниченное число вариантов - Разрозненность в выборе генов	- Высокая стоимость - Необходимость платформ для NGS и вспомогательных приборов - Обеспокоенность пациентов из-за VUS	- Трудоёмкость - Высокая стоимость - Необходимость полного оснащения лаборатории - Интерпретация VUS

Рисунок. Обзор основных молекулярно-генетических подходов, используемых в преконцепционном скрининге.

Figure. Review of the main genetic approaches for preconception screening.

До настоящего времени на территории РФ не проводилось ни одной национальной программы по анализу носительства моногенных болезней. В большинстве случаев преконцепционные исследования носительства выполняются по желанию пациента в частных или государственных медицинских учреждениях за счет собственных средств пациента или некоторых отдельных целевых программ. При этом каждая клиника самостоятельно определяет метод исследования, перечень включенных заболеваний, генов и патогенных вариантов. В г. Санкт-Петербурге на базе ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта» реализуются две программы. Первая программа подразумевает использование таргетного генотипирования в семьях высокого риска и у их родственников для поиска патогенных вариантов в генах, связанных с тремя наиболее распространенными заболеваниями (спинальная мышечная атрофия, муковисцидоз и фенилкетонурия). Программа реализуется при поддержке БФ «Острова». Кроме того, во второй половине 2023 г. стартовала программа бесплатного обследования «Разработка и апробация алгоритма профилактики наследственных болезней для внедрения массового преконцепционного генетического скрининга в Северо-Западном регионе РФ», в которой могут принять участия все семьи, обратившие в организацию на этапе планирования беременности и имеющие репродуктивные проблемы. Программа реализуется в рамках прикладных научных исследований и предполагает разработку расширенной панели ПС носительства аутосомно-рецессивных и X-сцепленных наследственных заболеваний и проведение пилотного проекта обследования 250 пар. Также в 2023 г. в Свердловской области за счет средств регионального бюджета запущен первый проект по обследованию будущих родителей на носительство патогенных вариантов в 50 генах, обуславливающих развитие тяжелых наследственных болезней.

1. Молекулярно-генетические подходы, используемые в ПС

1.1. Подход генотипирования в ПС

Подход генотипирования позволяет прицельно определять ранее установленные небольшие по протяженности нарушения (как правило, замену одного или небольшого количества нуклеотидов) в генетической последовательности ДНК индивидуума, а затем сравнить ее с эталонной последовательностью ДНК. Современные методы генотипирования включают в себя метод полиморфизма длин амплифицированных фрагментов (ПДАФ), метод анализа полиморфизма

длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ, англ. restriction fragment length polymorphism, RFLP), метод лигазной цепной реакции (ЛЦР), метод ПЦР в реальном времени (qPCR, quantitative PCR или количественная ПЦР, ПЦР-РВ), микросателлитный анализ, секвенирование по Сэнгеру. Методы генотипирования позволяют эффективно анализировать как конкретные точечные варианты, так и известные делеции. С их помощью можно тестировать панели мажорных вариантов. Методы генотипирования, в частности ПЦР, ПЦР-ПДРФ, ЛЦР, не требуют дорогостоящего оборудования или реактивов, что позволяет их использовать практически в любой генетической лаборатории. Однако эти методы не дают возможности проводить анализ гена полностью, а значит число включенных в ПС вариантов будет ограничено, что значительно снижает эффективность выявления носительства заболеваний подобным подходом.

1.1.1. Метод ПДАФ

Метод ПДАФ позволяет эффективно обнаруживать небольшие делеции (утрата одного или нескольких нуклеотидов) и инсерции (добавление одного или нескольких нуклеотидов). ПДАФ можно выполнять в моноплексном или мультиплексном вариантах [7]. В первом случае амплифицируется только один фрагмент ДНК. Этот тип ПДАФ используется в большинстве случаев, когда необходимо амплифицировать конкретный фрагмент ДНК для диагностики одного изменения в последовательности ДНК. Мультиплексный ПДАФ используется для одновременного анализа нескольких генов или для выявления нескольких патогенных вариантов одного и того же гена. Для проведения мультиплексной ПДАФ необходимо соблюдать температурные условия (температуры отжига праймеров не должны сильно различаться), а также каждый набор праймеров должен синтезировать фрагмент, отличный от других по размеру, чтобы при визуализации можно было их легко различить. Метод ПДАФ может применяться в ПС как самостоятельно для идентификации мажорных небольших инсерций или делеций, таких как *delF508* в гене *CFTR*, так и может быть первым этапом для других методов генотипирования (ПЦР-ПДРФ, микросателлитный анализ и др.). Этот базовый метод находит применение в скрининге жителей региона Пафос на острове Кипр на носительство атаксии Фридрейха, распространенной у выходцев из этой местности. Для этого образцы ДНК подвергают ПДАФ, чтобы выявить экспансию тринуклеотид-

ных повторов GAA в первом интроне гена фратаксии (*FXN*). Обычно гены содержат 8-33 повторов GAA, тогда как при атаксии Фридрейха в *FXN* будет 67-1300 повторов [8].

1.1.2. Метод ПЦР-ПДРФ

Одним из популярных вариантов модификации метода ПЦР является метод ПЦР-ПДРФ. Полученный в результате ПЦР амплифицированный фрагмент ДНК расщепляется эндонуклеазой рестрикции, ферментом, «узнающим» определенные последовательности (сайты рестрикции) в двухцепочечной ДНК. ПЦР-ПДРФ обладает высокой чувствительностью и сравнительно небольшой себестоимостью, а за счет огромного спектра доступных коммерческих эндонуклеаз рестрикции позволяет обнаруживать самые редкие генетические вариации. Метод может быть использован в больших масштабах и для большого числа образцов, что делает его подходящим для исследований на популяционном уровне или для ПС. В сравнении с другими методами генетического анализа, применяемыми в ПС, ПЦР-ПДРФ является одним из самым доступным с точки зрения стоимости. Большим преимуществом данного метода является скорость выполнения при исследовании единичных генетических вариантов и то, что применение метода не требует дорогостоящего оборудования или специальных условий, а значит он может быть использован практически в любой генетической лаборатории. Ограничениями ПЦР-ПДРФ, как и для других методов генотипирования, является возможность идентифицировать только конкретные изменения последовательности ДНК, невозможность автоматизации лабораторного процесса, а значит большая трудоемкость метода, и необходимость правильного подбора фермента рестрикции. Однако, несмотря на ограничения, метод широко используется в клинической практике лабораторий при анализе небольших панелей частых вариантов моногенных болезней. В частности, в Отделе геномной медицины НИИ АГиР им. Д.О. Отта существует множество тест-систем, в основе которых лежит ПЦР-ПДРФ [9].

1.1.3. Метод ПЦР в реальном времени

Метод ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ, quantitative PCR или количественная ПЦР) позволяет не только обнаружить в пробе целевую нуклеотидную последовательность, но и измерить её количество. Это достигается за счёт использования флуоресцент-

ных меток, которые присоединяются к амплифицированной ДНК. В методе ПЦР-РВ используется оптический датчик, который регистрирует флуоресценцию в реальном времени. Существует два типа флуоресцентных меток, используемых в ПЦР-РВ: интеркалирующие агенты (такие как SYBR Green), которые связываются с двухцепочечной ДНК и приводят к увеличению флуоресценции в процессе ПЦР, а также есть зонды с флуорофорами (например, TaqMan), которые гибридизуются с целевой последовательностью, и флуорофор высвобождается в процессе работы полимеразы. Метод ПЦР-РВ отличается своей быстротой, так как анализ в режиме реального времени обычно происходит быстрее, чем традиционная ПЦР с последующим гель-электрофорезом. ПЦР-РВ с использованием интеркалирующих агентов позволяет определять делеции и инсерции, а с помощью TaqMan проб можно определять однонуклеотидные замены в цепи ДНК [10]. Также ПЦР-РВ позволяет проводить мультиплексный анализ нескольких генов или мутаций одновременно, что экономит не только время, но и ресурсы. Основным недостатком данного метода является стоимость оборудования, так как необходимы специальные амплификаторы с возможностью регистрации флуоресценции, а также интеркалирующие агенты или зонды. Также интеркалирующие агенты обладают низкой специфичностью, так как могут связываться с любыми двухцепочечными молекулами ДНК. Однако тщательный подбор праймеров и условий ПЦР минимизирует этот недостаток. Метод ПЦР-РВ широко применяется в диагностике одного из наиболее распространенных наследственных заболеваний спинальной мышечной атрофии для анализа делеции экзона 7 в гене *SMN1*. В частности, так детектируют носительство спинальной мышечной атрофии в Австралии в рамках популяционного скрининга, проводимого в штате Виктория [11].

1.1.4. Метод лигазной цепной реакции

Лигазная цепная реакция (ЛЦР) — это метод амплификации ДНК, который использует фермент ДНК-лигазу для соединения вместе двух зондов, коротких фрагментов ДНК, которые комплементарны определенному фрагменту матрицы. В начале ЛЦР два зонда гибридизуются с комплементарными последовательностями ДНК-матрицы. Затем фермент ДНК-лигаза соединяет два зонда вместе, образуя единый двунитевой фрагмент ДНК. Затем число копий данного фрагмента умножается за счет ПЦР. ЛЦР

не происходит, если концевые нуклеотиды первого и второго зондов не комплементарны соответствующему фрагменту анализируемой ДНК. Поэтому при наличии варианта в тех сайтах ДНК, где зонды стыкуются друг с другом, в реакцию со своим партнером вступает только измененный зонд, полностью комплементарный анализируемой мутантной ДНК, т.е. продукт реакции образуется лишь при наличии в реакционной смеси «мутантного» олигонуклеотида, но не олигонуклеотида дикого типа [12]. Метод удобен для автоматизации и используется для диагностики однонуклеотидных замен, делеций и инсерций различной протяженности. Существует большой выбор коммерческих наборов для выполнения мультиплексной лигазной полимеразной реакции (MLPA) для анализа вариантов в генах *CFTR*, *DMD* и др. В мировой практике ПС метод используется для скрининга гемоглобинопатий на Кипре: после рутинного генетического анализа на талассемии (оценка параметров эритроцитов и электрофорез гемоглобина), а также при отсутствии точковых изменений по результатам ПЦР или секвенирования по Сэнгеру, выполнялся поиск протяженных делеций в генах глобинов методом MLPA [13].

1.1.5. Метод фрагментного анализа

Для анализа числа копий повторов при болезнях экспансии широко применяется метод фрагментного (микросателлитного) анализа. Метод фрагментного анализа основан на анализе участков генетической последовательности путем ПЦР-амплификации с использованием специфических праймеров, которые соответствуют уникальным последовательностям, окружающим каждый микросателлитный участок. Затем путем электрофореза в полиакриламидном геле или автоматического капиллярного электрофореза определяют «размер» аллелей, сопоставляя их с набором стандартных фрагментов ДНК известной длины. Данный метод относительно прост и доступен для большинства лабораторий, что делает его широко используемым в ПС. Микросателлитный анализ может предоставить количественную информацию о числе повторов в микросателлитных локусах, что позволяет оценить «генетическую нагрузку». В ПС метод фрагментного анализа в настоящее время может применяться для анализа CGG-повторов в гене *FMRI*, CAG-повторов в гене *HTT* и др. [14,15]. Так, при реализации австралийского проекта «Миссия Маккензи» у женщин дополнительно оценивалось носительство синдрома Мартина-Белл. Для этого использовали коммерческие наборы для

обнаружения экспансии тринуклеотидных повторов CGG в гене *FMRI* с последующим высокопроизводительным автоматическим капиллярным электрофорезом, а также анализ наличия «прерывателей» AGG [16].

1.1.6. Секвенирование по Сэнгеру

Данный метод обеспечивает высокую точность результатов (до 98%), что делает его надежным для определения последовательности нуклеотидов, его результаты могут быть легко подтверждены и воспроизведены. Секвенирование по Сэнгеру хорошо подходит для анализа фрагментов до 1000 пар нуклеотидов, но метод неэффективен для больших геномов из-за медленной скорости и дорогостоящего оборудования. В Великобритании скрининг на носительство муковисцидоза проводят как целенаправленно на преконцепционном и антенатальном этапах в группах высокого риска (например, пациентам с семейной историей заболевания или при кровнородственном браке), так и «оппортунистически», выявляя находки в проекте «100000 Геномов». Одним из подходов является секвенирование всей кодирующей последовательности гена *CFTR* методом терминации цепи [17].

1.2. Подход секвенирования следующего поколения в ПС

Второй подход, используемый в ПС — это определение генетических вариантов с помощью технологии высокопроизводительного секвенирования или секвенирования следующего поколения (NGS), который позволяет выполнять параллельное определение нуклеотидных последовательностей множества различных нитей ДНК. Подход секвенирования в отличие от подхода генотипирования не ограничивается исследованием четко определенных генетических изменений, а нацелен на поиск любых вариантов во всех фрагментах ДНК, которые включены в панель секвенирования.

Данный метод позволяет получать большие объемы генетической информации: параллельно можно прочитывать целые геномы множества образцов, что снижает стоимость секвенирования за пару нуклеотидов (bp). Качество данных секвенирования зависит от используемой технологии и может потребовать более тщательной обработки, фильтрации и подтверждения (перепроверка с помощью секвенирования по Сэнгеру). При NGS в зависимости от поставленных целей можно использовать таргетное, полноэкзомное (WES) или полногеномное (WGS) секвенирование. Подход

секвенирования в целом отличается высокой производительностью, широкими техническими возможностями по определению разного типа генетических изменений и возможностью автоматизации процессов. Из недостатков стоит отметить достаточно высокую стоимость реактивов и расходных материалов, необходимость оснащения лаборатории дорогостоящим оборудованием для секвенирования и множеством вспомогательных приборов для пробоподготовки, а также затраты на обработку и хранение данных (необходимы мощные вычислительные ресурсы). Однако, необходимо отметить, что существуют ограничения в идентификации некоторых типов генетических вариантов методом NGS. Так, данный метод плохо выявляет структурные изменения хромосом (инверсии, транслокации, протяженные инсерции и делеции), изменение числа хромосом (полиплоидия, анеуплоидия), протяженные участки нуклеотидных повторов, варианты в генах с наличием в геноме близкого по последовательности псевдогена, а также варианты в GC-богатых участках.

1.2.1. Таргетные панели секвенирования

Данный метод секвенирования направлен на анализ определенных генов, участков генома или генетических вариаций, имеющих установленное клиническое значение в отношении исследуемого фенотипа. Таргетные панели разрабатываются таким образом, чтобы амплифицировать и секвенировать только те области генома, которые клинически необходимы в рамках генетического обследования конкретной популяции. В отличие от полноэкзомного и полногеномного секвенирования, таргетные панели генерируют меньший объем данных, что облегчает их анализ и обработку. Выделяют 2 типа таргетных панелей: лабораторные и биоинформатические. Лабораторные таргетные панели праймеров разрабатываются конкретной лабораторией (либо коммерческой организацией), в них включаются те участки генома, которые интересны для конкретного исследования. Биоинформатические панели таргетного анализа представляют собой специальный протокол анализа данных NGS, который позволяет проводить анализ конкретных регионов на основе данных полноэкзомного секвенирования. Данный метод широко применяется в международных программах скрининга. Одна из лабораторий, участвовавших в проекте «Миссия Маккензи», использовала целевые панели на территориях Квинслэнда, Южной Австралии и Виктории. Анализ данных экзона был биоинформатиче-

ски ограничен генами, выбранными для исследования [16]. В 2019 г. в Китае был выполнен государственный проект расширенного скрининга. В нем приняли участие почти 10500 человек 34 разных народностей. Исследовались 11 распространенных в стране аутосомно-рецессивных заболеваний: альфа-талассемия, бета-талассемия, поликистоз почек, фенилкетонурия, болезнь Вильсона-Коновалова, GJB2-ассоциированная глухота, синдром Пендреда, болезнь Помпе, гиперфенилаланинемия с дефицитом тетрагидробиоптерина типа А, галактоземия, мышечная дистрофия Дюшенна-Беккера [18]. Такие скрининги часто нацелены на закрытые популяции. Например, подобный тест проводят для населения рыбацкой деревни в Нидерландах, основанной в XIV веке и насчитывающей около 21500 жителей. В деревне распространены строгие религиозные взгляды, по причине которых браки часто заключаются между местными. Это привело к распространенности четырех тяжелых нозологий в этом обществе. К ним относятся понтocerebellарная гипоплазия 2 типа, синдром Пены-Шокейра 1 типа, ризомелическая точечная хондродисплазия 1 типа, несовершенный остеогенез типа IIB/III [19].

1.2.2. Полноэкзомное секвенирование (WES)

Этот метод также основан на NGS, направлен на анализ экзона, то есть совокупности всех экзонов в геноме человека. Экзоны — это участки генов, занимающие примерно 1-2% генома человека, которые кодируют белки и являются ключевыми для функционирования организма. В отличие от полногеномного секвенирования (WGS), WES сосредотачивается только на экзонах, что делает анализ более экономичным и быстрым. Но в то же время пропускаются неэкзонные области, в которых могут находиться патогенные варианты. Сегодня WES является одним из основных методов выбора в ПС для выполнения анализа носительства с использованием расширенных панелей генов. Многие коммерческие тесты используют этот подход. На государственном уровне он также может быть применен. Его использовали как основную составляющую скрининга в «Миссии Маккензи» [16]. Секвенирование клинического экзона (порядка 7000 генов, для которых достоверно описаны фенотипы) применялось у более чем 2200 ранее необследованных саудовских семей в качестве теста первого уровня. Этот подход особенно актуален в подобных странах, где существует традиция близкородственного брака, из-за чего

количество и спектр заболеваний могут быть значительно шире, чем в других государствах [20].

1.2.3. Полное геномное секвенирование (WGS)

Технология NGS позволяет анализировать всю генетическую информацию, содержащуюся в геноме организма. Она включает в себя все геномные области, в том числе включая экзоны (кодирующие области генов), интроны, регуляторные и некодирующие области генома. Данный метод позволяет выявить разнообразные типы генетических вариаций, включая однонуклеотидные полиморфизмы (SNP), структурные вариации, инсерции, делеции и многое другое. Минусами WGS является высокая стоимость, по сравнению с другими методами, в том числе WES или таргетным секвенированием следующего поколения, а также наибольший объем информации, который необходимо проанализировать. Метод WGS пока широко не задействован в ПС, но за счет преодоления части технических ограничений, существующих для методов WES и таргетного секвенирования, в будущем может стать фаворитом по мере снижения стоимости реактивов и расходных материалов.

1.3. Комбинированный подход ПС

В рамках данного подхода преконцепционное исследование выполняется с использованием комбинации молекулярных тестов, что позволяет сочетать технические возможности разных методов для лучшей выявляемости различных типов генетических вариантов. Как правило, в этом случае основным методом исследования является NGS (таргетное или экзомное), а в качестве вспомогательных методов анализа некоторых вариантов, которые NGS не позволяет идентифицировать, добавляют методы генотипирования (ПДФ, ПЦР-ПДФ, ПЦР в реальном времени, микросателлитный анализ и др.). Прогрессирующая мышечная дистрофия Дюшенна (МДД) — это наследственное X-сцепленное нервно-мышечное заболевание, вызванное мутацией гена *DMD*, кодирующего белок дистрофин, приводящей к отсутствию или недостаточной функции дистрофина. Ген *DMD* — один из самых больших генов человека, содержит 79 экзонов. Среди патогенных вариантов примерно в 65% случаев встречаются крупные делеции, примерно 10% вариантов представлены дупликациями, а остальные случаи — точковыми и малыми мутациями, из которых 10–15% представлены нонсенс-вариантами. Поскольку таргетное

или экзомное секвенирование не позволяет эффективно выявлять структурные изменения хромосом, основным методом выбора в отношении исследования вариантов в гене *DMD* является MLPA с последующим поиском точковых мутаций с использованием секвенирования. Известно, что причиной возникновения спинальной мышечной атрофии является делеция экзонов 7–8 в гене *SMN1*, который расположен в локусе 5q13 и кодирует белок выживаемости мотонейронов (survival motor neuron). Диагностика СМА осложняется наличием гена *SMN2*, который по своей последовательности практически идентичен гену *SMN1*. В настоящее время наиболее эффективным способом анализа делеции экзонов 7–8 в гене *SMN1*, в том числе при ПС, является ПЦР в реальном времени. Генетической причиной синдрома ломкой X-хромосомы или синдрома Мартина-Белла является увеличение числа тринуклеотидных повторов *CGG* в гене *FMR1* (fragile X mental retardation-1). У здоровых людей число повторов в этом гене колеблется от 5 до 54. Если их больше 200, то наработка белка с гена *FMR1* нарушается, что приводит к развитию синдрома Мартина-Белла и клиническому проявлению заболевания. Для молекулярной диагностики повторов в гене *FMR1* применение таргетного или полноэкзомного секвенирования не эффективно. Оценка количества повторов может выполняться методом микросателлитного анализа. При врожденной дисфункции коры надпочечников в случае недостаточности 21-гидроксилазы основной причиной заболевания являются патогенные варианты в гене *CYP21A2*. Наличие псевдогена *CYP21A1P*, гомологичного гену на 87%, существенно осложняет проведение молекулярно-генетической диагностики. В этом случае требуется комплексный подход, при котором в первом варианте можно применить генотипирование: определение методом ПЦР-ПДФ точковых мажорных патогенных вариантов и методом ПЦР в реальном времени или MLPA провести делеционно-дупликационный анализ. Или, во втором варианте, использовать как генотипирование (методом ПЦР в реальном времени или MLPA проанализировать наличие делеций), так и секвенирование (после наработки с помощью ПЦР ампликона, содержащего ген *CYP21A2*, применить метод NGS для анализа всей последовательности гена на наличие патогенных вариантов).

Согласно последним рекомендациям ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics), признанными авторитетными на территории США, Австралии и большинстве европейских стран, относительно скрининга носительства, всем, кто планирует

ет беременность, или уже беременным следует предлагать скрининг на заболевания с расчётной частотой носительства не менее 1:200, обязательно включая X-сцепленные состояния, муковисцидоз и спинальную мышечную атрофию. Парам, вступившим в близкородственный брак, следует рассмотреть даже более подробный скрининг. Также анализ большего числа генов рекомендуется, если того требует семейная или личная история пациента. Выполнение данных рекомендаций невозможно без использования комбинированного подхода [21].

2. Результаты применения программ ПС в мире

На сегодняшний день, ПС зарекомендовал себя как эффективная стратегия раннего выявления носительства генетических болезней с аутосомно-рецессивным и X-сцепленным типами наследования в популяции. ПС все больше использует новые возможности, предлагаемые молекулярной генетикой, прежде всего технологиями высокопроизводительного секвенирования нового поколения. Реализация национальных программ ПС по отдельным наследственным заболеваниям, которая проходила в разных странах мира с 70-х гг., показала отличные результаты по снижению числа (до 95%) рождения больных детей [17]. Сравнение различных программ ПС носительства, а также результаты их внедрения представлены в **таблице**. Необходимо однако отметить, что большая часть ранних программ ПС выполнялась с использованием биохимических и гематологических методов при определении бета-талассемии и болезни Тея-Сакса. Результаты внедрения ПС с использованием молекулярно-генетических методов на данный момент достаточно сложно оценить, так как универсальные программы расширенного скрининга носительства стали применяться относительно недавно.

Тем не менее, опубликованные результаты внедрения в Израиле масштабного скрининга муковисцидоза и спинально-мышечной атрофии выглядят весьма обнадеживающими. Анализ состояния здоровья детей, родившихся за 4 года (с 2014 до 2017), показал снижение количества новорожденных с заболеванием на 57% для СМА и на 50% для муковисцидоза. Причем наибольшее количество больных детей родилось в семьях из арабских и ультраортодоксальных общин, которые знали о риске наследования патологии на этапе планирования беременности. Авторы исследования подчеркивают, что дальнейшее снижение показателя рождения детей с тяжелыми моногенными патологиями воз-

можно путем оптимизации доступности скрининга, непрерывного образования населения и лиц, осуществляющих уход, а также заинтересованных сторон некоторых религиозных и социальных сообществ для повышения осведомленности о важности и эффективности скрининга носителей [10].

Заключение

ПС моногенных заболеваний направлен на выявление пар, находящихся на этапе планирования беременности, у которых повышен риск передачи патогенных вариантов, ответственных за развитие аутосомно-рецессивных или X-сцепленных генетических заболеваний. Своевременно установленная информация о носительстве патогенных вариантов помогает продумать тактику планирования беременности для предотвращения рождения детей с наследственной патологией в семьях с высоким риском. В задачи ПС входит выявление генетического риска и предупреждение генетических болезней, повышение информированности потенциальных родителей, что в конечном счете приводит к снижению уровня стресса и тревожности в период планирования беременности. Результаты реализации скрининга носительства моногенных болезней в мире показывают значительное снижение количества больных детей в популяции после внедрения прекоцепционных программ. В настоящее время можно выделить 3 основных молекулярных подхода ПС — генотипирование, секвенирование и комбинация 2 вышеуказанных методов. Огромное значение имеет правильный выбор метода генетического исследования, учитывая технические возможности в выявлении тех или иных типов генетических нарушений и принимая во внимание возможные ограничения используемого метода. Зная особенности молекулярной диагностики каждого заболевания, распространенность патологии в популяции, а также частоту встречаемости отдельных патогенных вариантов в исследуемой группе, можно подобрать наилучшую стратегию ПС. Так, для таких распространенных заболеваний, как муковисцидоз и фенилкетонурия более предпочтительным является подход с использованием NGS, при котором будет охвачено большинство патогенных вариантов из всех известных. При диагностике спинальной мышечной атрофии, где наиболее частым вариантом является делеция экзона 7 в гене *SMN1*, актуально использовать ПЦР в реальном времени. При миодистрофии Дюшенна/Беккера наиболее часто обнаруживаются мутации (обычно де-

леции) одного или нескольких экзонов гена, реже — точковые мутации или дупликации, поэтому на первом этапе ее диагностика требует применения метода лигазной цепной реакции с последующим секвениро-

ванием для определения точковых мутаций. Для диагностики врождённой дисфункции коры надпочечников приходится использовать комплекс методов от ПЦР-ПДРФ анализа до NGS.

Таблица. Результаты различных программ ПС носительства.

Table. Results from various preconception carrier screening programs.

Страна	Заболевание	Описание	Группа исследования	% снижения частоты рождения больных детей	Ссылка
Австралия	Болезнь Тея-Сакса	Добровольный, ориентированный на еврейское население. Начат в 1995 году	Школьники	50%	[22]
Англия	Бета-талассемия	Добровольная всеобщая программа скрининга с 1985 г.	Аntenatalный период	80%	[23]
Израиль	Муковисцидоз	Добровольный всеобщий скрининг с 2008 г.	Аntenatalный период	> 50%	[24]
Италия	Бета-талассемия	Добровольная всеобщая программа скрининга с 1975 г.	До брака или antenatalный период	95%	[25, 26]
Италия	Муковисцидоз	Добровольный всеобщий скрининг с 1994 г.	Преко́нцепционный или antenatalный период	15% (годовая)	[27]
Канада	Болезнь Тея-Сакса	Программа добровольного скрининга групп высокого риска, 1979–1992 гг.	Школьники, пары перед вступлением в брак	90%	[28]
Канада	Бета-талассемия	Программа добровольного скрининга групп высокого риска, 1979–1992 гг.	Школьники, пары перед вступлением в брак	94%	[28, 29]
Кипр	Бета-талассемия	Квази-обязательная проверка некоторых киприотов-греков и обязательная государственная проверка киприотов-турок. Универсальный скрининг с 1973 года	До брака, преко́нцепционный или antenatalный период	85%	[30, 31]
Палестинский округ, сектор Газа	Бета-талассемия	Обязательный скрининг. Универсальный с 2000 года.	До брака	75–80%	[32]
Саудовская Аравия	Бета-талассемия	Обязательный скрининг. Универсальный с 2003 года.	До брака	Минимальные изменения (89% пар-носителей все еще состоят в браке, а расторжение брака широко не практикуется)	[33]
Шотландия	Муковисцидоз	Добровольный всеобщий скрининг с 1990 г.	Аntenatalный период	65%	[34]
Израиль	Спинальная мышечная атрофия	Добровольный бесплатный скрининг с 2008 г.	До брака	57%	[10]
Израиль	Муковисцидоз	Национальная программа скрининга в репродуктивных целях с 2002 г.	До брака	50%	[10]

Можно выделить несколько параметров, на которые стоит обратить внимание при выборе метода, который планируется для использования в ПС. Во-первых, при проведении ПС необходимо знать структуру популяции для того, чтобы проводить релевантный поиск распространённых патогенных вариантов в генах, ответственных за заболевания, характерные для определённого региона. Нужно обязательно учитывать наличие “мутаций основателя”, генетически изолированных популяций (например, евреев ашкенази), распространённость близкородственных браков и т.п. Стоит отметить, что этническая принадлежность обследованных индивидуумов при ПС может играть большую роль при разработке панелей вариантов ПС. Этнически специфичный подход, который осуществляется в мультинациональном Израиле, позволил добиться колоссальных результатов в предотвращении рождения детей с серьёзными заболеваниями, а также уменьшении «генетического груза», так как учитывалась частота заболеваний в разных этнических группах, проживающих на территории страны. Во-вторых, следует принимать во внимание технические возможности лаборатории. Для некоторых методов подразумевается наличие дорогостоящего оборудования и реагентов. Также необходимо иметь квалифицированные кадры, которые смогут правильно выполнить исследование и затем корректно интерпретировать полученные результаты. В-третьих, при выборе метода должны учитываться стоимость услуги и потребность населения в таких исследованиях. Высокая стоимость ПС может стать фактором, который будет препятствовать доступу к анализу. Таким образом, внедрение и реализация программ ПС позволяют значительно снизить количество случаев рождения детей с наследственными заболеваниями, а также улучшить общий уровень здоровья населения за счёт уменьшения процента инвалидов и случаев смерти среди детей, что в дальнейшем позволит снизить нагрузку на систему здравоохранения. Наличие большого количества разнообразных методов делает прекоцепционный скрининг доступным практически для каждой лаборатории. Выбор метода зависит от конкретных задач и возможностей лаборатории, которые ограничиваются бюджетом, наличием квалифицированных кадров, а также оборудованием.

Литература

- Conijn T., Nijmeijer S.C.M., Lakeman P., et al. Preconception expanded carrier screening: Impact of information presented by text or video on genetic knowledge and attitudes. *J Genet Couns.* 2021;30(2):457-469. doi: 10.1002/jgc4.1332.
- Nybo Andersen A.M., Urhoj S.K. Is advanced paternal age a health risk for the offspring? *Fertil Steril.* 2017;107(2):312-318. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.12.019
- Kong A., Barnard J., Gudbjartsson D.F., et al. Recombination rate and reproductive success in humans. *Nat Genet.* 2004;36(11):1203-6. doi: 10.1038/ng1445.
- Zlotogora J. The Israeli national population program of genetic carrier screening for reproductive purposes. How should it be continued? *Isr J Health Policy Res.* 2019;8(1):73. doi: 10.1186/s13584-019-0345-1.
- Singer A., Sagi-Dain L. Impact of a national genetic carrier-screening program for reproductive purposes. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2020;99(6):802-808. doi: 10.1111/aogs.13858.
- McClaren B.J., Delatycki M.B., Collins V., Metcalfe S.A., Aitken M. 'It is not in my world': an exploration of attitudes and influences associated with cystic fibrosis carrier screening. *Eur J Hum Genet.* 2008;16(4):435-44. doi: 10.1038/sj.ejhg.5201965.
- PCR Protocols, second edition / ed. Bartlett J., Stirling D. Humana Press Inc., 2003
- Zamba-Papanicolaou E., Koutsou P., Daiou C., et al. High frequency of Friedreich's ataxia carriers in the Paphos district of Cyprus. *Acta Myol.* 2009;28(1):24-26.
- Асеев М.В., Баранов В.С., Баранова Е.В., и др. Эволюция предиктивной медицины / под редакцией В. С. Баранова. Санкт-Петербург: Эко-Вектор, 2021.
- Singh C., Roy-Chowdhuri S. Quantitative Real-Time PCR: Recent Advances. *Methods Mol Biol.* 2016;1392:161-76. doi: 10.1007/978-1-4939-3360-0_15.
- Archibald A., Smith M., Burgess T. et al. Reproductive genetic carrier screening for cystic fibrosis, fragile X syndrome, and spinal muscular atrophy in Australia: outcomes of 12,000 tests. *Genet Med.* 2018; 20: 513-523. <https://doi.org/10.1038/gim.2017.134>
- Shimer G. H. Jr., Backman K.C. Ligase chain reaction. *Methods in molecular biology.* 1995; 46: 269-78. doi:10.1385/0-89603-297-3:269
- Kountouris P., Kousiappa I., Papasavva T., et al. The molecular spectrum and distribution of haemoglobinopathies in Cyprus: a 20-year retrospective study. *Sci Rep.* 2016; 6:26371. <https://doi.org/10.1038/srep26371>
- Rajan-Babu I.S., Lian M., Chong S.S. Triplet-Primed PCR Assays for Accurate Screening of FMRI CGG Repeat Expansion and Genotype Verification. *Curr Protoc.* 2022;2(5):e427. doi: 10.1002/cpz1.427.
- Bastepe M., Xin W. Huntington Disease: Molecular Diagnostics Approach. *Curr Protoc Hum Genet.* 2015;87:9.26.1-9.26.23. doi: 10.1002/0471142905.hg0926s87.
- Archibald A.D., McClaren B.J., Caruana J., et al. The Australian Reproductive Genetic Carrier Screening Project (Mackenzie's Mission): Design and Implementation. *J Pers Med.* 2022;12(11):1781. doi: 10.3390/jpm12111781.
- Rowe C.A., Wright C.F. Expanded universal carrier screening and its implementation within a publicly funded healthcare service. *J Community Genet.* 2020; 11: 21-38. <https://doi.org/10.1007/s12687-019-00443-6>
- Zhao S., Xiang J., Fan C. et al. Pilot study of expanded carrier screening for 11 recessive diseases in China: results from 10,476 ethnically diverse couples. *Eur J Hum Genet.* 2019; 27: 254-262. <https://doi.org/10.1038/s41431-018-0253-9>
- Mathijssen I. B., Henneman L., van Eeten-Nijman J. M., et al. Targeted carrier screening for four recessive disorders: High detection rate within a founder population. *European Journal of Medical Genetics.* 2015; 58(3): 123-128. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2015.01.004>

20. Monies D., Abouelhoda M., Assoum M., et al. Lessons Learned from Large-Scale, First-Tier Clinical Exome Sequencing in a Highly Consanguineous Population [published correction appears in Am J Hum Genet. 2019 Oct 3;105(4):879]. Am J Hum Genet. 2019;104(6):1182-1201. doi:10.1016/j.ajhg.2019.04.011
21. Gregg A.R., Aarabi M., Klugman S. et al. Screening for autosomal recessive and X-linked conditions during pregnancy and preconception: a practice resource of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). Genet Med. 2021; 23: 1793–1806. <https://doi.org/10.1038/s41436-021-01203-z>
22. Lew R.M., Proos A.L., Burnett L., et al. Tay Sachs disease in Australia: reduced disease incidence despite stable carrier frequency in Australian Jews. Med J Aust. 2012;197(11):652-4. doi: 10.5694/mja12.11010.
23. Greengross P., Hickman M., Gill M., Dugan B., Davies S.C. Outcomes of universal antenatal screening for haemoglobinopathies. J Med Screen. 1999;6(1):3-10. doi: 10.1136/jms.6.1.3.
24. Stafler P., Mei-Zahav M., Wilschanski M., et al. The impact of a national population carrier screening program on cystic fibrosis birth rate and age at diagnosis: Implications for newborn screening. J Cyst Fibros. 2016;15(4):460-6. doi: 10.1016/j.jcf.2015.08.007.
25. Cao A., Cossu P., Falchi A.M., et al. Antenatal diagnosis of thalassemia major in Sardinia. Ann N Y Acad Sci. 1985;445:380-92. doi: 10.1111/j.1749-6632.1985.tb17208.x.
26. Cao A., Furbetta M., Galanello R., et al. Prevention of homozygous beta-thalassemia by carrier screening and prenatal diagnosis in Sardinia. Am J Hum Genet. 1981;33(4):592-605.
27. Castellani C., Picci L., Tridello G., et al.. Cystic fibrosis carrier screening effects on birth prevalence and newborn screening. Genet Med. 2016;18(2):145-51. doi: 10.1038/gim.2015.68.
28. Mitchell J.J., Capua A., Clow C., Scriver C.R. Twenty-year outcome analysis of genetic screening programs for Tay-Sachs and beta-thalassemia disease carriers in high schools. Am J Hum Genet. 1996;59(4):793-8.
29. Scriver C.R., Bardanis M., Cartier L., et al. Beta-thalassemia disease prevention: genetic medicine applied. Am J Hum Genet. 1984;36(5):1024-38.
30. Angastiniotis M.A., Hadjiminis M.G. Prevention of thalassaemia in Cyprus. Lancet. 1981;1(8216):369-71. doi: 10.1016/s0140-6736(81)91682-2.
31. Cowan R.S. Moving up the slippery slope: mandated genetic screening on Cyprus. Am J Med Genet C Semin Med Genet. 2009;151C(1):95-103. doi: 10.1002/ajmg.c.30202.
32. Tarazi I., Al Najjar E., Lulu N., Sirdah M. Obligatory premarital tests for beta-thalassaemia in the Gaza Strip: evaluation and recommendations. Int J Lab Hematol. 2007;29(2):111-8. doi: 10.1111/j.1751-553X.2006.00836.x.
33. Alhamdan N.A., Almazrou Y.Y., Alswaidi F.M., Choudhry A.J. Premarital screening for thalassemia and sickle cell disease in Saudi Arabia. Genet Med. 2007;9(6):372-7. doi: 10.1097/gim.0b013e-318065a9e8.
34. Cunningham S., Marshall T. Influence of five years of antenatal screening on the paediatric cystic fibrosis population in one region. Arch Dis Child. 1998;78(4):345-8. doi: 10.1136/ad.78.4.345.
2. Nybo Andersen A.M., Urhoj S.K. Is advanced paternal age a health risk for the offspring? Fertil Steril. 2017;107(2):312-318. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.12.019
3. Kong A., Barnard J., Gudbjartsson D.F., et al. Recombination rate and reproductive success in humans. Nat Genet. 2004;36(11):1203-6. doi: 10.1038/ng1445.
4. Zlotogora J. The Israeli national population program of genetic carrier screening for reproductive purposes. How should it be continued? Isr J Health Policy Res. 2019;8(1):73. doi: 10.1186/s13584-019-0345-1.
5. Singer A., Sagi-Dain L. Impact of a national genetic carrier-screening program for reproductive purposes. Acta Obstet Gynecol Scand. 2020;99(6):802-808. doi: 10.1111/aogs.13858.
6. McClaren B.J., Delatycki M.B., Collins V., Metcalfe S.A., Aitken M. 'It is not in my world': an exploration of attitudes and influences associated with cystic fibrosis carrier screening. Eur J Hum Genet. 2008;16(4):435-44. doi: 10.1038/sj.ejhg.5201965.
7. PCR Protocols, second edition / ed. by Bartlett J., Stirling D. Humana Press Inc., 2003
8. Zamba-Papanicolaou E., Koutsou P., Daiou C., et al. High frequency of Friedreich's ataxia carriers in the Paphos district of Cyprus. Acta Myol. 2009;28(1):24-26.
9. Aseev M.V., Baranov V.S., Baranova E.V., et al. Evolyutsiya prediktivnoy meditsiny / pod redaktsiyey V. S. Baranova. [The evolution of predictive medicine / ed. by V. S. Baranov]. St. Petersburg: Eco-Vector, 2021. (In Russ.)
10. Singh C., Roy-Chowdhuri S. Quantitative Real-Time PCR: Recent Advances. Methods Mol Biol. 2016;1392:161-76. doi: 10.1007/978-1-4939-3360-0_15.
11. Archibald A., Smith M., Burgess T. et al. Reproductive genetic carrier screening for cystic fibrosis, fragile X syndrome, and spinal muscular atrophy in Australia: outcomes of 12,000 tests. Genet Med. 2018; 20: 513–523. <https://doi.org/10.1038/gim.2017.134>
12. Shimer G. H. Jr., Backman K.C. Ligase chain reaction. Methods in molecular biology. 1995; 46: 269-78. doi:10.1385/0-89603-297-3:269
13. Kountouris P., Kousiappa I., Papasava T., et al. The molecular spectrum and distribution of haemoglobinopathies in Cyprus: a 20-year retrospective study. Sci Rep. 2016; 6:26371. <https://doi.org/10.1038/srep26371>
14. Rajan-Babu I.S., Lian M., Chong S.S. Triplet-Primed PCR Assays for Accurate Screening of FMR1 CGG Repeat Expansion and Genotype Verification. Curr Protoc. 2022;2(5):e427. doi: 10.1002/cpz1.427.
15. Bastepe M., Xin W. Huntington Disease: Molecular Diagnostics Approach. Curr Protoc Hum Genet. 2015;87:9.26.1-9.26.23. doi: 10.1002/0471142905.hg0926s87.
16. Archibald A.D., McClaren B.J., Caruana J., et al. The Australian Reproductive Genetic Carrier Screening Project (Mackenzie's Mission): Design and Implementation. J Pers Med. 2022;12(11):1781. doi: 10.3390/jpm12111781.
17. Rowe C.A., Wright C.F. Expanded universal carrier screening and its implementation within a publicly funded healthcare service. J Community Genet. 2020; 11: 21–38. <https://doi.org/10.1007/s12687-019-00443-6>
18. Zhao S., Xiang J., Fan C. et al. Pilot study of expanded carrier screening for 11 recessive diseases in China: results from 10,476 ethnically diverse couples. Eur J Hum Genet. 2019; 27: 254–262. <https://doi.org/10.1038/s41431-018-0253-9>
19. Mathijssen I. B., Henneman L., van Eeten-Nijman J. M., et al. Targeted carrier screening for four recessive disorders: High detection rate within a founder population. European Journal of Medical Genetics. 2015; 58(3): 123–128. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2015.01.004>

References

1. Conijn T., Nijmeijer S.C.M., Lakeman P., et al. Preconception expanded carrier screening: Impact of information presented by text or video on genetic knowledge and attitudes. J Genet Couns. 2021;30(2):457-469. doi: 10.1002/jgc4.1332.

20. Monies D., Abouelhoda M., Assoum M., et al. Lessons Learned from Large-Scale, First-Tier Clinical Exome Sequencing in a Highly Consanguineous Population [published correction appears in Am J Hum Genet. 2019 Oct 3;105(4):879]. Am J Hum Genet. 2019;104(6):1182-1201. doi:10.1016/j.ajhg.2019.04.011
21. Gregg A.R., Aarabi M., Klugman S. et al. Screening for autosomal recessive and X-linked conditions during pregnancy and preconception: a practice resource of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). Genet Med. 2021; 23: 1793–1806. <https://doi.org/10.1038/s41436-021-01203-z>
22. Lew R.M., Proos A.L., Burnett L., et al. Tay Sachs disease in Australia: reduced disease incidence despite stable carrier frequency in Australian Jews. Med J Aust. 2012;197(11):652-4. doi: 10.5694/mja12.11010.
23. Greengross P., Hickman M., Gill M., Dugan B., Davies S.C. Outcomes of universal antenatal screening for haemoglobinopathies. J Med Screen. 1999;6(1):3-10. doi: 10.1136/jms.6.1.3.
24. Stafler P., Mei-Zahav M., Wilschanski M., et al. The impact of a national population carrier screening program on cystic fibrosis birth rate and age at diagnosis: Implications for newborn screening. J Cyst Fibros. 2016;15(4):460-6. doi: 10.1016/j.jcf.2015.08.007.
25. Cao A., Cossu P., Falchi A.M., et al. Antenatal diagnosis of thalassemia major in Sardinia. Ann N Y Acad Sci. 1985;445:380-92. doi: 10.1111/j.1749-6632.1985.tb17208.x.
26. Cao A., Furbetta M., Galanello R., et al. Prevention of homozygous beta-thalassemia by carrier screening and prenatal diagnosis in Sardinia. Am J Hum Genet. 1981;33(4):592-605.
27. Castellani C., Picci L., Tridello G., et al.. Cystic fibrosis carrier screening effects on birth prevalence and newborn screening. Genet Med. 2016;18(2):145-51. doi: 10.1038/gim.2015.68.
28. Mitchell J.J., Capua A., Clow C., Scriver C.R. Twenty-year outcome analysis of genetic screening programs for Tay-Sachs and beta-thalassemia disease carriers in high schools. Am J Hum Genet. 1996;59(4):793-8.
29. Scriver C.R., Bardanis M., Cartier L., et al. Beta-thalassemia disease prevention: genetic medicine applied. Am J Hum Genet. 1984;36(5):1024-38.
30. Angastiniotis M.A., Hadjiminas M.G. Prevention of thalassaemia in Cyprus. Lancet. 1981;1(8216):369-71. doi: 10.1016/s0140-6736(81)91682-2.
31. Cowan R.S. Moving up the slippery slope: mandated genetic screening on Cyprus. Am J Med Genet C Semin Med Genet. 2009;151C(1):95-103. doi: 10.1002/ajmg.c.30202.
32. Tarazi I., Al Najjar E., Lulu N., Sirdah M. Obligatory premarital tests for beta-thalassaemia in the Gaza Strip: evaluation and recommendations. Int J Lab Hematol. 2007;29(2):111-8. doi: 10.1111/j.1751-553X.2006.00836.x.
33. Alhamdan N.A., Almazrou Y.Y., Alswaidi F.M., Choudhry A.J. Premarital screening for thalassemia and sickle cell disease in Saudi Arabia. Genet Med. 2007;9(6):372-7. doi: 10.1097/gim.0b013e318065a9e8.
34. Cunningham S., Marshall T. Influence of five years of antenatal screening on the paediatric cystic fibrosis population in one region. Arch Dis Child. 1998;78(4):345-8. doi: 10.1136/adc.78.4.345.