

Использование новых технологий диагностики для выявления наследственных болезней обмена

Чурюмова Ю.А.^{1,2}, Вохмянина Н.В.³

¹ Санкт-Петербургское Государственное Казенное Учреждение Здравоохранения «Диагностический (медико-генетический) центр»

² Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России

³ Санкт-Петербургское Государственное Казенное Учреждение Здравоохранения «Диагностический (медико-генетический) центр» chury.yuliya@gmail.com, spbnat@yandex.ru

Применение новых технологий диагностики для раннего выявления наследственных болезней обмена показало их значительные преимущества (максимальная аналитическая специфичность и чувствительность, высокая пропускная способность) и целесообразность использования в неонатальном скрининге. Снижение количества ложноположительных результатов, одномоментное определение большого количества биохимических показателей в минимальном количестве биологического образца, существенно снизило общую продолжительность лабораторного исследования и обеспечило высокую производительность диагностического процесса. Однако недостаточная специфичность определяемых маркеров диктует необходимость применения молекулярно-генетических исследований как подтверждающих методов диагностики. Быстрота выполнения, относительная низкая стоимость, сравнительно простая интерпретация полученных результатов высокопроизводительного секвенирования следующего поколения (NGS), позволили рекомендовать его как завершающий этап диагностики неонатального скрининга.

Ключевые слова: неонатальный скрининг, высокопроизводительное секвенирование (NGS), наследственные болезни обмена.

Информация о конфликте интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

The use of new technologies of diagnostics for the detection of hereditary metabolic diseases

Churyumova Y.A.^{1,2}, Vokhmyanina N.V.³

¹ St. Petersburg State municipal health care institution» Diagnostic (medical genetics)

² Federal State Budgetary Institution «V.A. Almazov Federal North-West Medical Research Centre»

³ St. Petersburg State municipal health care institution» Diagnostic (medical genetics)

Application of new diagnostic technologies for early detection of hereditary metabolic diseases revealed their significant advantages (high analytical specificity and sensitivity, high bandwidth) and the appropriateness of their use in neonatal screening. Decrease of the number of false positive results, one definition of a large number of biochemical markers in a minimum quantity of biological sample made it possible to reduce the total duration of laboratory research and to ensure high performance diagnostic process. However, the lack of specificity of the markers requires to use molecular-genetic research as a supporting method of diagnosis. Speed of execution, the relative low cost, relatively simple interpretation of the obtained results of high-performance next-generation sequencing (NGS) allowed to recommend it as a the final stage of diagnosis of neonatal screening.

Keywords: neonatal screening, next-generation sequencing (NGS), hereditary metabolic diseases.

Введение

Неонатальный скрининг как комплекс мероприятий вторичной профилактики наследственных болезней обмена (НБО) широко распространен в общественном здравоохранении на международном уровне. Эти мероприятия направлены на раннее выявление тяжелых наследственных заболеваний у новорожденных с целью своевременного обеспечения лечебно-профилактических вмешательств для предотвращения и/или снижения осложнений, улучшения качества жизни и социальной адаптивности. Используемые рутинные первичные скрининговые методы позволяют идентифицировать максимальное количество значений, выходящих за референтные пределы. Однако высокая диагностическая

чувствительность, которая, как правило, превосходит специфичность диагностического метода, приводит к увеличению количества ложноположительных результатов.

Одним из решений этой проблемы для неонатального скрининга (повышение специфичности лабораторного метода) является применение новых высокоспецифичных технологий или совместное использование первичных скрининговых методов с тестами «второго уровня», подтверждающих первичные полученные результаты [1]. Так, появление метода тандемной масс-спектрометрии (ТМС) с 1990-х годов значительно расширило количество скринируемых заболеваний благодаря его чувствительности, специфичности, высокой пропуск-

ной способности и возможности одновременного мониторинга десятков анализов [2]. Применение ТМС было начато в биохимической лаборатории СПбГКУЗ «Диагностический центр (медико-генетический)» в 2009 году для неонатального селективного скрининга аминокислотопатий, органических ацидурий и нарушений митохондриального β -окисления жирных кислот. За это время (2010—2016 гг.) было обследовано 9565 пациентов и выявлено 13 наследственных болезней обмена, что подтвердило высокую суммарную частоту орфанных заболеваний и экономическую целесообразность данного скрининга.

При этом применение такой прогрессивной технологии как ТМС, показало, что «узким местом» скрининга по-прежнему остаются ложноположительные и неоднозначные результаты. Анализ полученных данных показал, что указанная проблема обусловлена недостаточной специфичностью самих исследуемых маркеров. Было установлено, что их уровень может повышаться при других заболеваниях и варьировать в зависимости от гестационного возраста и веса при рождении ребенка, питания, приема лекарственных препаратов, географических/этнических различий и т.д.

Внедрение новых хромато-масс-спектрометрических технологий (газовая и жидкостная хромато-масс-спектрометрия, ГХ-МС, ЖХ-МС) дает возможность определения более специфичных маркеров (например, органические кислоты), которые могут подтвердить предполагаемый диагноз. Помимо этого, перечисленные технологии расширяют спектр определяемых маркеров и позволяют заподозрить определенный наследственный метаболический дефект у пациента. Но, несмотря на совершенствование лабораторных технологий, которые оптимизируют и повышают диагностическую эффективность, сохраняется необходимость проведения подтверждающей молекулярно-генетической диагностики.

Стремительный технологический прогресс в области молекулярно-генетических методов способствовал внедрению в диагностику генетически-детерминированных заболеваний таких инновационных методов как высокопроизводительное секвенирование следующего поколения (NGS) [3]. NGS, в отличие от секвенирования по Сэнгеру, позволяет осуществлять массовое параллельное прочтение огромного количества фрагментов ДНК одновременно и установить последовательность всех экзонов или даже всего генома.

В контексте применения NGS в качестве теста завершающего этапа неонатального скрининга наиболее рациональным является таргетное секвенирование (TNGS) с использованием небольших панелей генов. Это обусловлено, прежде всего, относительно низкой стоимостью, а также возможностью избирательного исследования регионов «интереса», коими обычно являются экзоны или кодирующие участки интронов. Среди преимуществ TNGS необходимо отметить быстроту (TAT — 3—5 дней), сравнительно простую интерпрета-

цию полученных результатов, возможность избежать этические проблемы, связанные с обнаружением случайных находок [4, 5].

Так, с целью повышения эффективности неонатального скрининга, с апреля 2015 года, впервые в РФ, в биохимической лаборатории медико-генетического центра, был запущен пилотный проект по внедрению в алгоритм обследования по трем нозологиям — муковисцидоз, фенилкетонурия, галактоземия (МВ, ФКУ, ГАЛ) метода высокопроизводительного секвенирования (NGS). В данной статье приведены первые результаты данного исследования.

Материалы и методы

Исследование проводилось по результатам скринингового обследования указанных заболеваний в выборке 167189 новорожденных, родившихся в период с января 2015 по май 2017 года. По результатам ретеста было сформировано 3 группы новорожденных:

- 1) с повышенными значениями иммунореактивного трипсиногена, ИРТ (123);
- 2) с повышенными значениями фенилаланина, ФА (51);
- 3) с повышенными значениями общей галактозы, ГАО (157).

Всем новорожденным из указанных групп (331) проводилось молекулярно-генетическое тестирование соответствующих генов.

Молекулярно-генетическое тестирование осуществлялось с помощью тест-системы VariFind Neoscreen assay (ParseqLab, Россия) методом высокопроизводительного секвенирования (NGS). Данная тест-система основана на платформе IonPGM (LifeTechnologies, США) и позволяет идентифицировать 442 мутации в гене муковисцидоза *CFTR*, 99 мутаций в гене фенилкетонурии *PAH*, 50 мутаций в гене галактоземии *GALT*, а также выявлять ранее неизвестные мутации в кодирующих и клинически значимых регионах. Образцы ДНК были выделены из сухих пятен крови с использованием набора PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen/Life Technologies, США) в соответствии с инструкцией производителя.

Данные об окончательном диагнозе обследуемых пациентов были получены из заключения врача-генетика.

Результаты

Диагностика муковисцидоза

Среди 123 обследуемых с повышенными результатами ретеста на муковисцидоз (ИРТ > 70 нг/мл) 2 патогенных аллеля были идентифицированы у 18,7% пациентов (23 из 123) (табл. 1). Носителями одной патогенной мутации оказались 32,5% пациентов, а в 48,7% (60 из 123) случаях клинически значимых мутаций обнаружено не было. Было установлено, что 70% (42 из 60) детей с повышенным уровнем ретеста ИРТ в момент проведения

скрининга находились в стационаре по поводу других заболеваний (врожденные пороки сердца, гипербилирубинемия, инфекционные заболевания, заболевания печени). Диагноз *муковисцидоз* установлен в 96% случаев выявления 2 патогенных мутаций (22 из 23). В одном случае у ребенка с генотипом p.F508del/p.L467F тестирование родителей не проводилось. По данным клинических и лабораторно-инструментальных методов обследования на момент осмотра врачом-генетиком диагноз *муковисцидоз* подтвержден не был. Таким образом, процент ложноположительных результатов при тестировании по стандартному алгоритму с использованием реста (ИРТ1-ИРТ2) составил 82% (101 из 123), а при тестировании по предложенному алгоритму (ИРТ2-NGS) 0,04% (1 из 23).

Фенилкетонурия

По результатам секвенирования гена *PAH* у 76,5% пациентов (39 из 51) с повышенным уровнем фенилаланина в крови (ФА>122 мкмоль/л) обнаружены 2 патогенные мутации. В 11,75% выявлен только один патогенный аллель (6 из 51) и в стольких же случаях мутаций обнаружено не было. В гомозиготном состоянии мутация R408W встречалась в 25,6% случаев (20 из обнаруженных 78 патогенных аллелей), в 43,6% (34 из 78) была в компаунде с мутациями: p.Y414C; p.R243X; p.R261X; p.V177L; p.R252W; INV 10-11G>A (с.1066-11G>A); IVS

12+1G>A (с.1315+1G>A); p.V230I; p.L48S; p.E280K; p.P175H; p.A300S; p.A104D; а также с ранее не описанными мутациями: p.D435V; p.P175H; 663_664del2bp (p.Asp222Ter). В остальных 25,6% выявлены следующие генотипы: IVS11+1G>C (с.1199+1G>C)/p.A300S; p.I306V/p.E280K; p.V230I/K363fsdelG (p.Lys363Asnfs-Ter37); p.P281L/p.R297C; p.E390G/p.R261Q; p.V388M/p.P281L; p.P225T/p.E76D; IVS10-11G>A/p.E390G; p.R261Q/p.V230I; IVS10-11G>A/p.A403V (табл. 2), которые провоцировали гиперфенилаланинемию (доброкачественная ГФА), обычно не требующую специального лечения.

Примечательно, что из 78 обнаруженных аллелей всего 11 (14,1%) являются наиболее частыми и входят в панель, используемую для рутинной ДНК-диагностики. В то время как 67 аллелей (85%) удалось обнаружить только с применением расширенного секвенирования гена *PAH*. У новорожденных с генотипом R408W в гомозиготном состоянии, либо в компаунде с такими мутациями, как p.R252W; INV 10-11G>A; IVS 12+1G>A; p.R243X; p.R261X; p.L48S; p.E280K и 663_664del2bp уровень фенилаланина при ретестовом исследовании находился в диапазоне 1310—2270 мкмоль/л (в среднем 1582,7 мкмоль/л), в остальных случаях — в пределах 153—350 мкмоль/л (в среднем 281,9 мкмоль/л). Также необходимо отметить, что в 33,3% случаев (2 из 6) у пациентов, у которых выявлен только один патогенный ал-

Таблица 1

Генотипы обследованных новорожденных на муковисцидоз с двумя патогенными мутациями в гене *CFTR*

Генотип	Тривиальное название мутации	Количество новорожденных
p.F508del/p.F508del	F508del / F508del	3
c.1811+1,6kbA>G/p.F508del	1811+1,6kbA>G/F508del	1
p.Leu671Ter/p.F508del	2143delT/F508del	1
c.2988+1G>A/c.2988+1G>A	3120+1G>A/3120+1G>A	1
p.Leu671Ter/p.K598X	2143delT/K598X	1
p.F508del/p.R1066C	F508del/R1066C	1
p.F508del/ c.54-5940_273+10250del EXON2, EXON3	F508del/CFTR del2,3(21kb)	2
p.Asn415Ter/p.Trp882Ter	1367del5/W882X(TGG>TGA)	1
p.Tyr515X/ p.Glu92Lys	1677delTA/E92K	1
p.F508del/p.G542X	F508del/G542X	1
c.54-5940_273+10250del EXON2, EXON3/p.Gln98Arg	CFTR del2,3(21kb)/Q98R	1
p.F508del/c.580-1G>T	F508del/712-1G>T	1
p.G542X/c.54-5940_273+10250del EXON2, EXON3	G542X/ CFTR del2,3(21kb)	1
p.F508del/p.W1282X	F508del/W1282X	1
p.R334W/p.Leu671Ter	R334W/2143delT	1
p.Gln378AlafsX4 / p.Gln378AlafsX4	1259insA/1259insA	1
p.F508del/p.Arg792Ter	F508del/R792X	1
p.F508del/p.R117H	F508del/R117H	1
p.F508del/p.Thr1179Ilefs	F508del/3667ins4	1
p.F508del/p.L467F	F508del/L467F	1

лель установлен диагноз ФКУ. В связи с ограничениями метода NGS (невозможность обнаружения крупных делеций/инсерций) образцы крови данных пациентов направлены в ФГБНУ «Медико-генетический научный центр» для проведения дополнительных исследований гена РАН. В табл. 2 приведены данные о диагнозе пациентов с выявленными мутациями. В процессе проведения скрининга классической ФКУ с использованием только биохимических методов и в комплексе с ДНК-диагностикой процент ложноположительных результатов составил 47% (28 из 51) и 31% (12 из 39) соответственно.

Галактоземия

Для проведения молекулярно-генетического исследования на основе NGS было отобрано 157 новорожденных с положительными результатами неонатального

скрининга на галактоземию (ГАО>390 мкмоль/л (7,03 нг/дл)). В результате анализа у трех пациентов (19,1% обследованных) выявлена мутация p.Q188R в сочетании с патогенными аллелями p.K285N, IVS3-2A>C (с.329-2A>C), p.P66L (NM000155.3 с.197C>T). В 31 (19,7%) образце выявлен вариант Дуарте: в 6 (3,8%) — в гомозиготном состоянии (D2/D2); в 23 (14,6%) в сочетании с нормальным аллелем (D2/N, D1/N) и в 31 (19,7%) с патогенными аллелями (p.M142K/D1; p.Q188R/D1; p.Q188R/D2; p.L358P/D2; p.K285N/D2; p.W316X/D2; p.E352Q/D2; p.R148Q/D2). Клинический фенотип пациентов с генотипами p.Q188R/p.K285N, p.Q188R/IVS3-2A>C (с.329-2A>C) соответствовал классической галактоземии. У третьего пациента (p.Q188R/p.P66L) результат ретестового исследования общей галактозы в крови составил 1492 мкмоль/л (27 нг/дл), активность фермента галактозо-1-фосфату-

Таблица 2

Диагноз пациентов с выявленными мутациями

Генотип	Диагноз
R261Q/V230I	ГФА
V230I/K363fsdelG	ГФА
V230I/R408W	ГФА
IVS11+1G>C/ A300S	ГФА
R408W/D435V	ГФА
E390G/R261Q	ГФА
I306V/E280K	ГФА
V177L/R408W	ГФА
P281L/R297C	ГФА
R408W/R408W	ФКУ
R408W/Y414C	ФКУ
R252W/R408W	ФКУ
IVS12+1G>A/R408W	ФКУ
R261X/R408W	ФКУ
R408W/R243X	ФКУ
IVS10-11G>A/R408W	ФКУ
R408W/L48S	ФКУ
V388M/P281L	ФКУ
R408W/E280K	ФКУ
R408W/663_664del2bp	ФКУ
P225T/E76D	ФКУ
R408W/P175H	ФКУ
IVS10-11G>A/E390G	ГФА
IVS 10-11 G>/A403V	ГФА
R408W/A300S	ГФА
R408W/A104D	ФКУ
R408W/N	ФКУ
IVS4+5G>C/N	ФКУ

ридилтрансферазы была на нижней границе нормы (4,47 Ед/гНб). Также проводилось тестирование родителей, которое подтвердило транс-положение обнаруженных мутаций. При осмотре врачом-генетиком данных за галактоземию не было. Вариант р.Р66L (NM000155.3 с.197С>Т) описан в качестве патогенного в базах данных ClinVar, HGMD и ARUP, однако опубликованных данных нет. В связи с тем, что уровень общей галактозы может повышаться при различных состояниях, а также в случае носительства заболевания [6], скрининг выявил 98% ложноположительных результатов (3 из 154).

Выводы

Анализ полученных результатов проведенного исследования показал уменьшение количества ложноположительных результатов, что свидетельствует о превосходстве диагностической информативности алгоритмов скрининга, с применением тестирования ДНК в качестве подтверждающей диагностики. Генетическая информация, полученная на примере ФКУ, продемонстрировала возможность NGS потенциально выявлять «мягкие» мутации, лежащие в основе доброкачественной гиперфенилаланиемии, не требующей лечения, что является важным для дифференциальной диагностики. Помимо всего прочего, важным фактором, уменьшающим психологическое воздействие на родителей, является отсутствие необходимости повторного вызова и забора венозной крови у детей, так как количество ДНК для проведения TNGS достаточно при выделении из сухих пятен крови, предназначенных для неонатального скрининга.

Заключение

Программы неонатального скрининга разрабатывались для ранней экономически эффективной диагностики заболеваний, для которых принципиально необходимо раннее медицинское вмешательство для профилактики тяжелых последствий и отдаленных осложнений. С момента внедрения первого скринингового теста на ФКУ были достигнуты значительные успехи в этой области. Стало возможным расширить программы скрининга, включить большое количество различных расстройств и централизовать обследования в специальных лабораториях, подобно тестированию «у постели больного». Важными характеристиками скрининговых методов являются аналитическая специфичность и чувствительность вкпе с высокой пропускной способностью и своевременным получением результатов, отклоняющихся от нормы. Несмотря на то, что в настоящее время доступны такие высокоточные и сверхчувствитель-

ные методы как ТМС, ВЭЖХ, ГХ-МС, эти результаты все еще не могут быть патогенетически дифференциальными или диагностически показательными. Для уменьшения неоднозначности в диагностике генетически детерминированных заболеваний целесообразно применять более определенные тесты, такие, как ферментативные или молекулярно-генетические исследования. В России в некоторых регионах после проведения скрининга проводится ДНК-диагностика на наиболее часто встречающиеся мутации, но, благодаря этнической гетерогенности, спектр тестируемых мутаций оказывается гораздо шире, нежели состав панели.

Внедрение технологий секвенирования следующего поколения в неонатальный скрининг позволяет модернизировать подтверждающую диагностику тестируемых заболеваний, что способствует улучшению качества оказания медицинской помощи [7]. Для скрининговых программ экономической эффективности является применение таргетного секвенирования с использованием небольших панелей генов, которое наряду с доступностью позволяют одновременно обследовать несколько десятков пациентов. Интеграция TNGS в протоколы неонатального скрининга позволяет обеспечить раннюю диагностику НБО и своевременно начать лечебно-профилактические мероприятия, что отвечает современным стандартам надлежущей клинической практики.

Список литературы

1. Chace DH, Hannon WH. Impact of second-tier testing on the effectiveness of newborn screening. *Clin Chem.* 2010 Nov;56(11):1653-5.
2. Jicheng Q, Xiaonan W, Jia L, et al. Applying targeted next generation sequencing to dried blood spot specimens from suspicious cases identified by tandem mass spectrometry-based newborn screening. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2017 Aug 28;30(9):979-988.
3. Solomon BD, Pineda-Alvarez DE, Bear KA, et al. NISC Comparative Sequencing Program Applying Genomic Analysis to Newborn Screening. *Mol Syndromol.* 2012 Aug;3(2):59-67.
4. Lin X, Tang W, Ahmad S, et al. Applications of targeted gene capture and next-generation sequencing technologies in studies of human deafness and other genetic disabilities. *Hear Res.* 2012 Jun;288(1-2):67-76.
5. Bhattacharjee A, Sokolsky T, Wyman SK, et al. Development of DNA confirmatory and high-risk diagnostic testing for newborns using targeted next-generation DNA sequencing. *Genet Med.* 2015 May;17(5):337-47.
6. Воскобоева Е.Ю., Байдакова Г.В., Денисенков А.И., Денисенкова Е.В., Захарова Е.Ю. Галактоземия в России: Молекулярно-генетические особенности, неонатальный скрининг, подтверждающая диагностика. *Медицинская генетика Т.8, №6, 2009; 25-33.*
7. Байдакова Г.В., Захарова Е.Ю., Канивец И.В., Коновалов Ф.А., Стрельников В.В., Куцев С.И. Диагностика врожденных и наследственных болезней у детей: достижения и перспективы развития. *Вестник Росздравнадзора №3, 2016; С. 27-33.*