

**Генетика. Возможности диагностики
муковисцидоза в условиях РФ (инициатива РАН
и МГНЦ)**

*Елена Ивановна Кондратьева,
научно-клинический отдел муковисцидоза ФГБНУ «МГНЦ»*

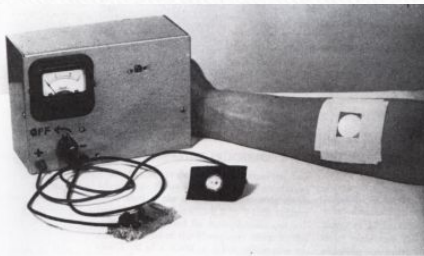
Показания к медико-генетическому консультированию

- Наследственное заболевание в семье
- Неблагоприятное течение беременности
- Повторные спонтанные аборт, мертворождения
- Близкородственные браки
- Возраст матери старше 35 лет, возраст отца
- Рождение ребенка с врожденными пороками развития (множественными и изолированными)
- Задержка/опережение физического развития пре- и постнатальная
- Задержка темпов психо-моторного развития, утрата ранее приобретенных навыков
- Внезапное ухудшение состояния ребенка (рвота, судорожный синдром, потеря сознания, нарушение мозгового кровообращения)
- Необычный запах от тела, волос, биологических жидкостей
- Мышечная слабость, мышечная гипотония
- Нарушение пигментации кожи

Разработка МВ диагностических тестов и критерии

ПОТОВЫЙ ТЕСТ
Gibson & Cook

1959



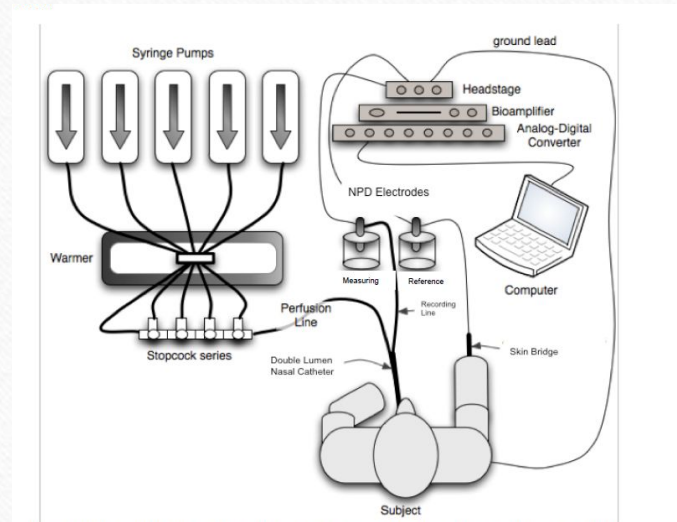
Тесты диагностики МВ

Потовый тест
Gibson & Cook

Разность назальных потенциалов
Knowles, Gatzky, Boucher

1959

1983



Тесты диагностики МВ

Потовый тест

Gibson & Cook

Разность назальных потенциалов

Knowles, Gatzky, Boucher

1959

1983

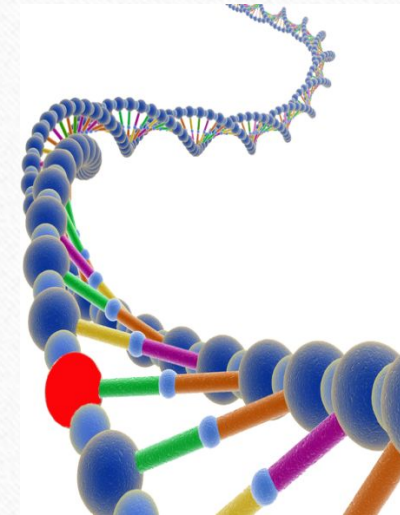
Ген CFTR

Riordan et al.

1989

Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Cloning and Characterization of Complementary DNA

JOHN R. RIORDAN, JOHANNA M. ROMMENS, BAT-SHEVA KEREM, NOA ALON,
RICHARD ROZMAHEL, ZBYSZKO GRZELCZAK, JULIAN ZIELENSKI, SI LOK,
NATASA PLAVSIC, JIA-LING CHOU, MITCHELL L. DRUMM, MICHAEL C. IANNUZZI,
FRANCIS S. COLLINS, LAP-CHEE TSUI



Тесты диагностики МВ

Потовый тест
Gibson & Cook

Разность кишечных потенциалов
Veeze et al.

Разность назальных потенциалов
Knowles, Gatzky, Boucher

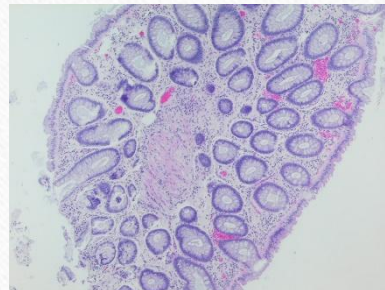
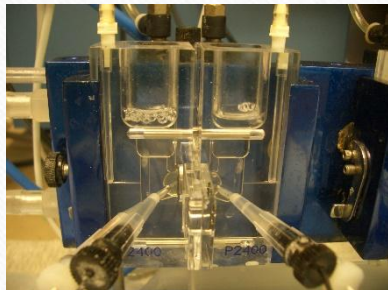
Ген CFTR
Riordan et al.

1959

1983

1989

1991



Тесты диагностики МВ

ПОТОВЫЙ ТЕСТ

Gibson & Cook

Разность кишечных потенциалов

Veeze et al.

Разность назальных потенциалов

Knowles, Gatzky, Boucher

ИРТ Неонатальный скрининг

Hammond et al.

Ген CFTR

Riordan et al.

1959

1983

1989

1991

Vol. 325 No. 11 TRYPSINOGEN ASSAY FOR CYSTIC FIBROSIS SCREENING — HAMMOND ET AL. 769

EFFICACY OF STATEWIDE NEONATAL SCREENING FOR CYSTIC FIBROSIS BY ASSAY OF TRYPSINOGEN CONCENTRATIONS

KEITH B. HAMMOND, M.S., STEVEN H. ABMAN, M.D., RONALD J. SOKOL, M.D., AND FRANK J. ACCURSO, M.D.

Abstract Background. To evaluate the feasibility and efficacy of measuring immunoreactive trypsinogen in blood to screen for cystic fibrosis, we performed this test in 279,399 newborns in Colorado from 1982 to 1987.

Methods. Immunoreactive trypsinogen was measured in dried blood spots when the infants were 1 to 4 days old; if the level was elevated ($\geq 140 \mu\text{g}$ per liter), the measurement was repeated (mean age, 38 days); if the level was again elevated, sweat testing was performed (mean age, 49 days). For the second test, two cutoff levels (120 and $80 \mu\text{g}$ per liter) were evaluated.

Results. We found an incidence of cystic fibrosis of 1 in 3827 (0.26 per 1000), with 3.2 newborns per 1000 requiring repeat measurement. When adjusted for race and compliance with testing, the incidence among the white infants (1 in 2521) was close to the expected incidence. The false positive rate with the initial cutoff level (92.2 percent) was similar to the rate found in neonatal screening programs for other diseases. False negative re-

sults occurred because of laboratory error or changes in procedure (three infants) and trypsinogen concentrations lower than the initial cutoff level (three infants) or lower than the remeasurement cutoff level of $120 \mu\text{g}$ per liter (one infant). Sweat tests were negative in 168 infants with an elevated initial trypsinogen level but a level below $80 \mu\text{g}$ per liter on remeasurement, confirming the value of $80 \mu\text{g}$ per liter as an appropriate cutoff for repeat-test results. Overall, 95.2 percent of the infants with cystic fibrosis (95 percent confidence interval, 85 to 99 percent) who did not have meconium ileus could be identified with the use of a trypsinogen cutoff level of $140 \mu\text{g}$ per liter on initial testing and $80 \mu\text{g}$ per liter on repeat testing.

Conclusions. Statewide screening for cystic fibrosis based on measurements of immunoreactive trypsinogen in dried blood spots is feasible and can be implemented with acceptable rates of repeat testing and false positive and false negative results. (N Engl J Med 1991; 325: 769-74.)



Консенсус по диагностике МВ-временная шкала

Американский фонд МВ (CFF)
консенсус по диагностике
Rosenstein et al.

The diagnosis of cystic fibrosis: A consensus statement

*Beryl J. Rosenstein, MD, and Garry R. Cutting, MD, for the Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel**

1998

Критерии диагностики 1998:

- Фенотипические характеристики, МВ у родственников или положительный неонатальный скрининг
- Лабораторное подтверждение мутации CFTR: потовый тест $Cl^- > 60 \text{ mmol/l}$
- или: определение мутаций в гене CFTR
- или: разность назальных потенциалов, характерная для МВ

Разность назальных потенциалов

Knowles, Gatzky, Boucher

Разность кишечных потенциалов

Veeze et al.

Потовый тест

Gibson & Cook

Ген CFTR

Riordan et al.

ИРТ Неонатальный скрининг

Hammond et al.

1959

1983

1989

1991

Консенсус по диагностике МВ-временная шкала

Американский фонд МВ (CFF)-консенсус по диагностике
Rosenstein et al.

**Cystic fibrosis:
terminology and diagnostic algorithms**

Европейское общество по муковисцидозу (ECFS) алгоритм диагностики
De Boeck et al.

De Boeck K¹, Wilschanski M², Castellani C³, Taylor C⁴,
Cuppens H⁵, Dodge J⁶, Sinaasappel M⁷

2006

Разность назальных потенциалов
Knowles, Gatz, Boucher

Разность кишечных потенциалов
Veeze et al.

Потовый тест
Gibson & Cook

Ген CFTR
Riordan et al.

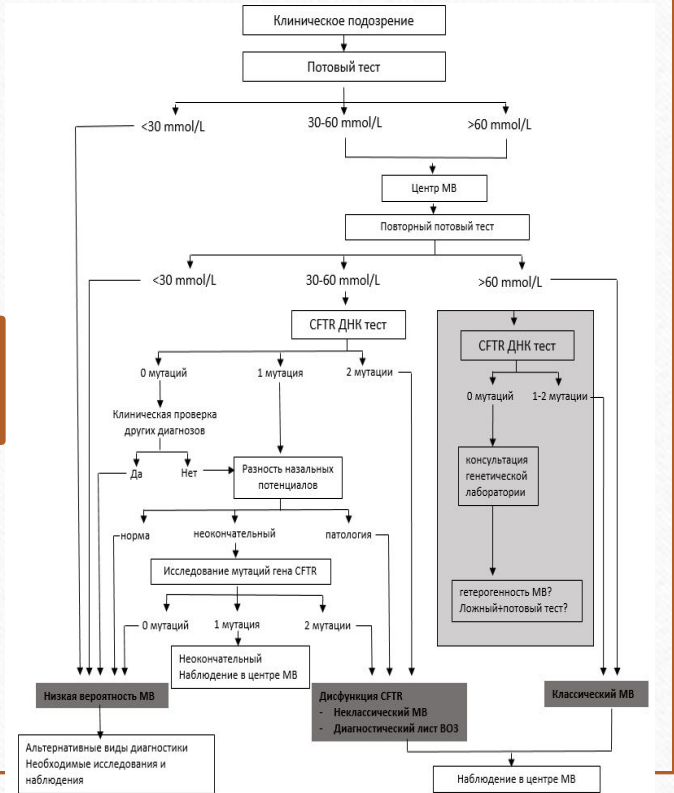
ИРТ Неонатальный скрининг
Hammond et al.

1959

1983

1989

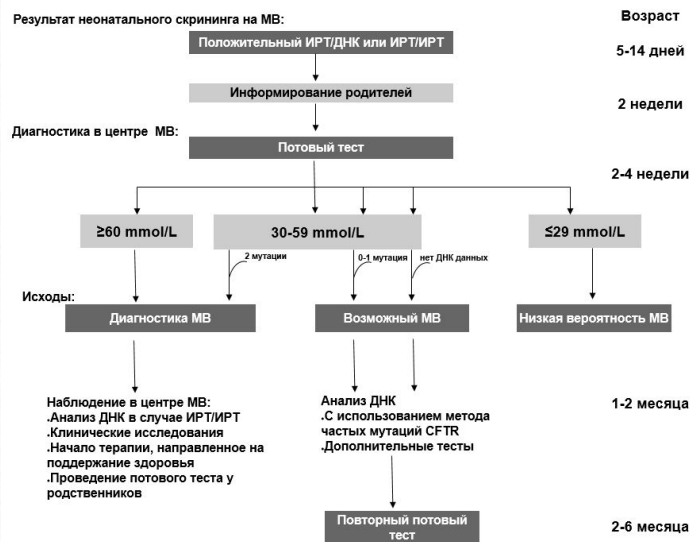
1991



Альтернативные виды диагностики
Необходимые исследования и наблюдения

Наблюдение в центре МВ

Консенсус по диагностике МВ-временная шкала



Американский фонд МВ (CFF)-консенсус по диагностике
Rosenstein et al.

Американский фонд МВ (CFF)-консенсус по диагностике, включая неонатальный скрининг
Farrell et al.

Европейское общество по муковисцидозу (ECFS)
Алгоритм диагностики
De Boeck et al.

1998

2006

2008

Разность назальных потенциалов
Knowles, Gatz, Boucher

Разность кишечных потенциалов
Veeze et al.

Потовый тест
Gibson & Cook

Ген CFTR
Riordan et al.

ИРТ Неонатальный скрининг
Hammond et al.

1959

1983

1989

1991

Критерии диагностики МВ

1 или > симптомов МВ

Потовый тест 2х Cl- > 60 mmol/l

или

или

родственники с МВ

И

2 мутации гена CFTR, приводящие к МВ

или

или

положительный неонатальный
скрининг

CFTR функция
типичная для МВ

Rosenstein 1998

De Boeck 2006

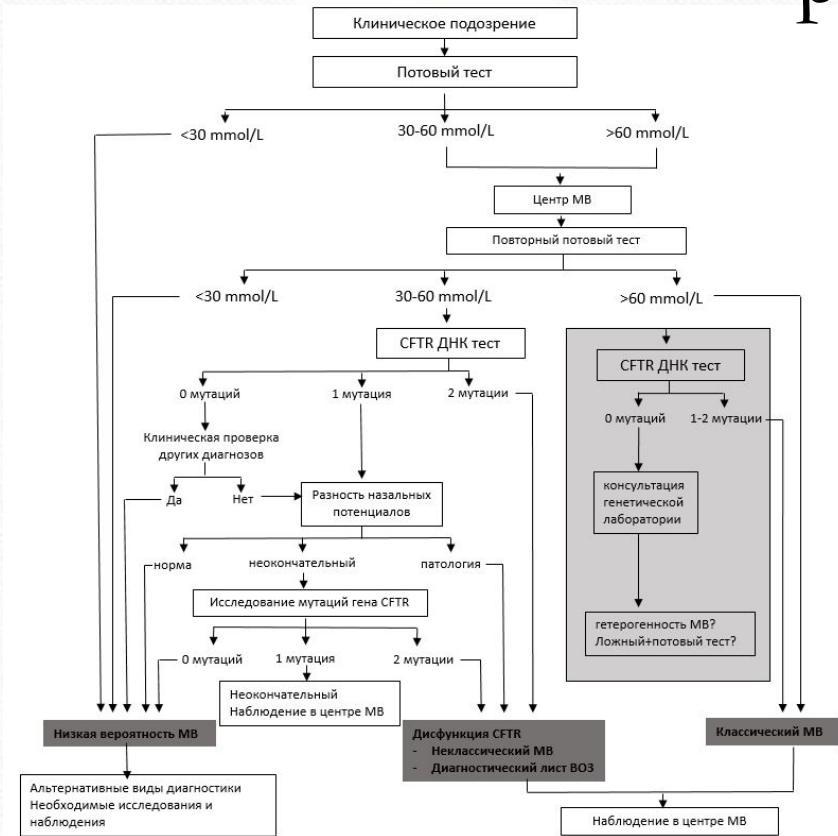
Farrell 2008

Castellani 2008

Mayell 2009



Европейское общество по муковисцидозу (ECFS) Рекомендации по диагностике (2006)



Дисфункция CFTR

OCCASIONAL REVIEW

Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms

K De Boeck, M Wilschanski, C Castellani, C Taylor, H Cuppens, J Dodge, M Sinaasappel, on behalf of the Diagnostic Working Group

Основные положения:

Потовый тест: пограничные значения
Cl-30-60 mmol/l

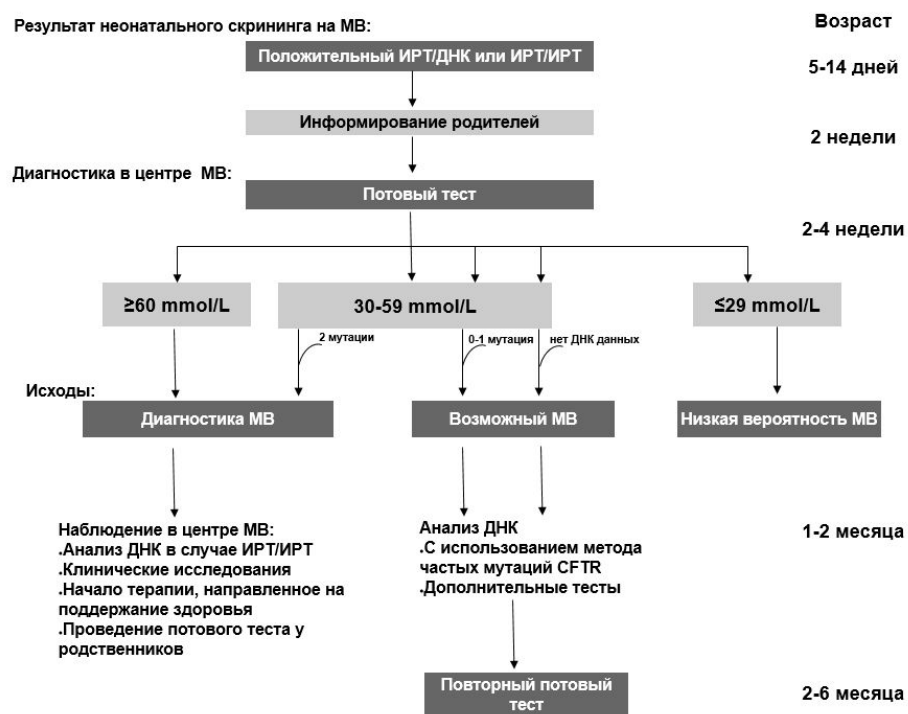
Рекомендуется измерение разности
назальных потенциалов; указывается
разность кишечных потенциалов

Пограничная категория:
дисфункция/неклассический МВ

Американский фонд МВ (CFF) Рекомендации по диагностике (2008)

Guidelines for Diagnosis of Cystic Fibrosis in Newborns through Older Adults: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Report

PHILIP M. FARRELL, MD, PhD, BERYL J. ROSENSTEIN, MD, TERRY B. WHITE, PhD, FRANK J. ACCURSO, MD, CARLO CASTELLANI, MD, GARRY R. CUTTING, MD, PETER R. DURIE, MD, FRCP, VICKY A. LEGRYS, DRA, CLS, JOHN MASSIE, MBBS, FRACP, PhD, RICHARD B. PARAD, MD, MPH, MICHAEL J. ROCK, MD, AND PRESTON W. CAMPBELL, III, MD



Основные положения:

Потовый тест: пограничные значения Cl- 40-60 mmol/l

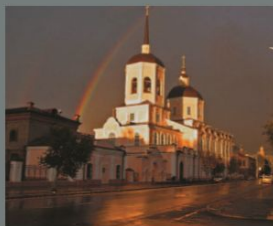
Указывается измерение разности назальных потенциалов/разность кишечных потенциалов не используется

Пограничная категория: неопределенный диагноз МВ

Основные документы

МУКОВИСЦИДОЗ

Регистр больных муковисцидозом
в Российской Федерации. 2015 год.



Общероссийская общественная организация
«Российская ассоциация для больных муковисцидозом»
и Российское респираторное общество



Российское общество медицинских генетиков
Российское респираторное общество
Союз педиатров России
Общероссийская общественная организация
«Всероссийская ассоциация для больных муковисцидозом»

Национальный консенсус
«Муковисцидоз: определение,
диагностические критерии, терапия»

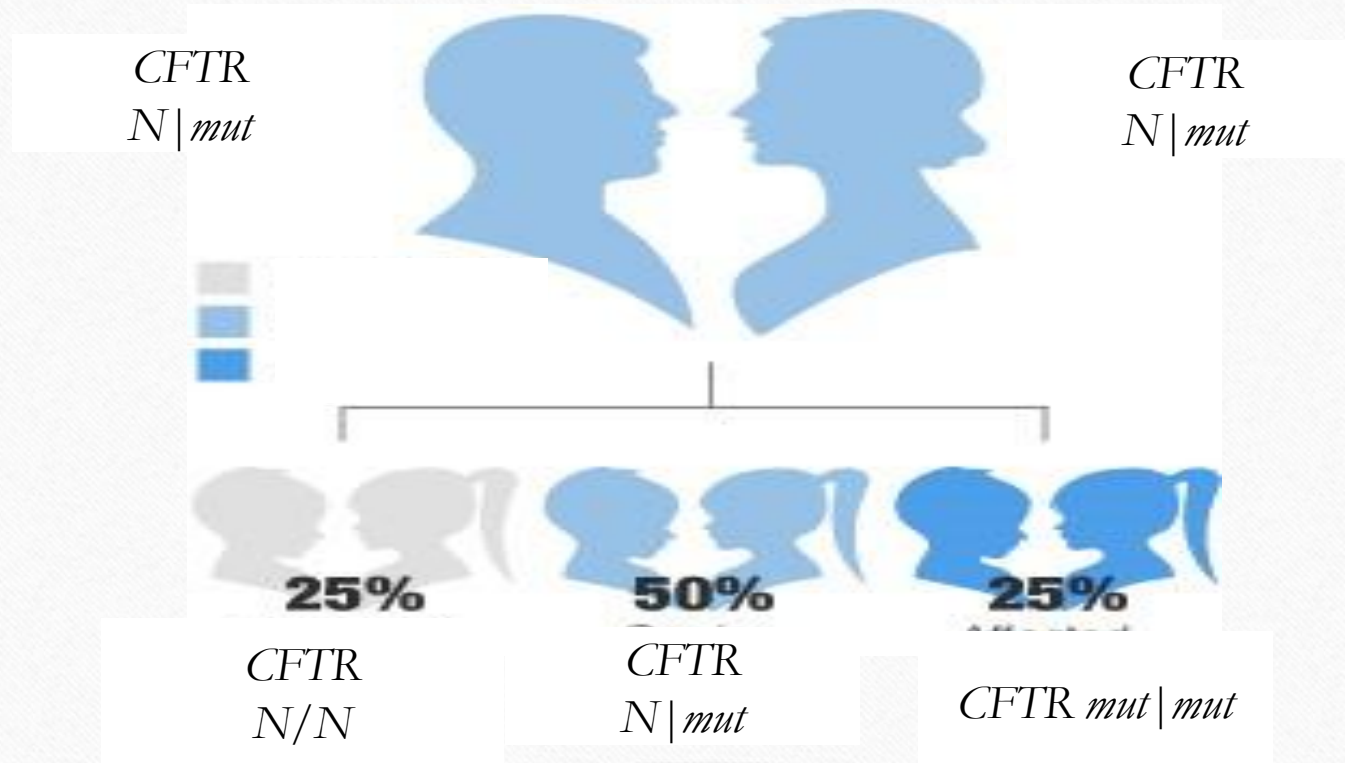
Координаторы:

Е.И. Кондратьева, Н.Ю. Каширская, Н.И. Капранов

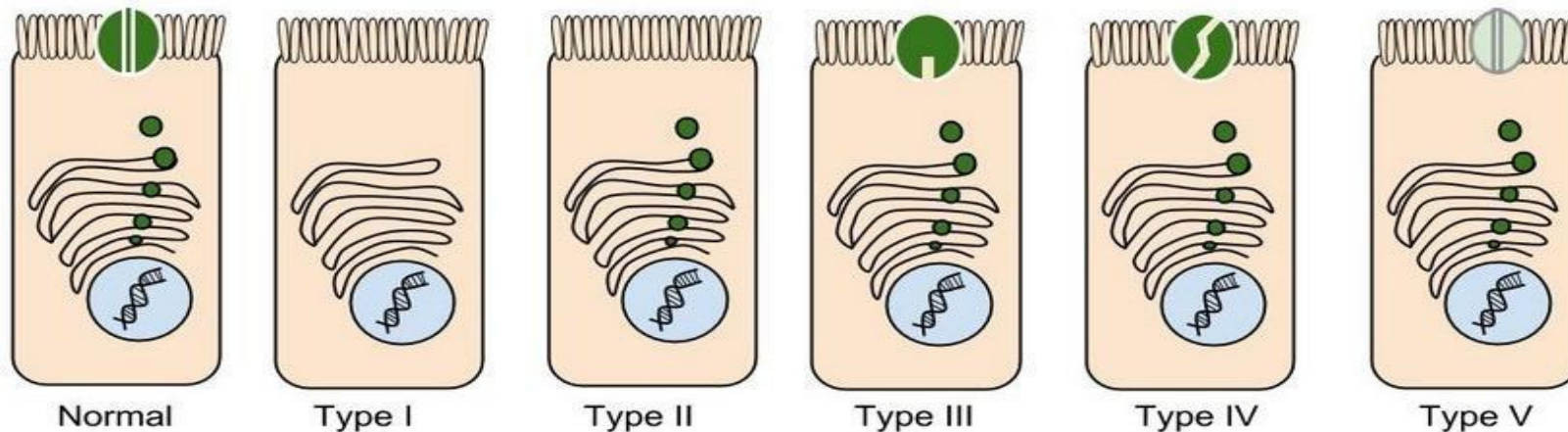


Москва
2016

Муковисцидоз- рецессивное заболевание



Классификация мутаций гена CFTR2ст №2



N	I	II	III	IV	V-VI
	<p>Нет синтеза</p> <p>Терапия разрабатывается</p>	<p>Нарушена сборка белка</p> <p>Корректоры VX-809 (люмакафтор)</p> <p>VX-661</p> <p>N6022 (+противовоспалительное действие)</p>	<p>Блок канала</p>	<p>Быстрое закрытие канала</p>	<p>Снижено кол-во N белка</p>
			<p>Потенциаторы –восстановление (активация) функции ионного канала</p> <p>Калидеко (ивакафтор, VX-770)</p>		



Виды мутаций

- В настоящее время известны 2019 мутации
- По состоянию на 17 марта 2017 года на веб-сайте CFTR2 аннотируемая 322 варианта:
 - CF-клинически значимые мутации: 281
 - Варианты различного клинического значения: 21
 - Не связанные с заболеванием: 12
 - Варианты неизвестного значения: 8

2011-2015гг

	2011	2012	2013	2014	2015
Генетическое исследование охват, %	91,8	91,1	87,5	87,7	88,2
доля выявленных мутаций, %*	80,0	80,4	79,1	79,5	81,9
– две выявленные мутации, %*	69,1	69,2	66,1	66,5	70,4
– одна выявленная мутация, %*	21,4	22,4	25,9	25,2	23,1
– обе мутации не выявлены, %*	9,5	8,4	8,0	8,3	6,5
F508del / F508del, %*	32,1	30,3	30,0	29,1	27,8
F508del / неF508del, %*	41,2	44,5	45,7	46,7	47,6
неF508del / неF508del, %*	26,7	25,2	24,3	24,2	25,6
F508del, аллельная частота, %*	52,79	52,85	52,21	51,53	51,67
CFTRdele2,3, аллельная частота, %*	6,32	5,91	5,94	5,93	5,68
E92K, аллельная частота, %*	2,65	2,64	2,58	2,62	2,43

№	mutations	Frequent, %	№	mutations	Frequent, %	№	mutations	Frequent, %
1	F508del	51,67	2	CFTRdele2,3	5,68	3	E92K	2,43
4	3849+10kbC>T	2,10	5	2143delT	1,90	6	W1282X	1,82
7	2184insA	1,80	8	N1303K	1,35	9	1677delTA	1,29
10	G542X	1,18	11	L138ins	1,07	12	394delTT	0,82
13	R334W	0,80	14	3821delT	0,45	15	S1196X	0,33
16	2789+5G>A	0,33	17	3272-16T>A	0,31	18	W1282R	0,29
19	3944delGT	0,29	20	S466X*	0,27	21	R1066C	0,26
22	c.1243-1247del	0,22	23	R553X	0,18	24	712-1G>T	0,16
25	3849G>A	0,16	26	621+1G>T	0,16	27	S945L	0,12
28	4015delA	0,12	29	S1159F	0,10	30	R1162X	0,10
31	CFTRdup 6b-10	0,10	32	R347P	0,10	33	L1335P	0,10
34	W1310X	0,10	35	1898+1G>A	0,10	36	G85E	0,10
37	E217G	0,08	38	S1159P	0,08	39	1716+1G>A	0,08
40	R1158X	0,08	41	1898+1G>C	0,08	42	Q98R	0,08
43	3659delC	0,06	44	1248+1G>A	0,06	45	R785X	0,06
46	I506T	0,06	47	R114H	0,06	48	604insA	0,06
49	4428insGA	0,06	50	D1152H	0,06	51	Y84X	0,06
52	1898+2T>C	0,06	53	4382delA	0,06	54	CFTRdel4-11	0,06
55	R75X	0,04	56	624delT	0,04	57	3085-3088delTTGA	0,04
58	681delC	0,04	59	D579Y	0,04	60	Y569H	0,04
61	Q493R	0,04	62	A96E	0,04	63	4022insT	0,04
64	R792X	0,04	65	2183AA>G	0,04	66	CFTRdele8	0,04
67	D110H	0,04	68	175delC	0,04	69	2184delA	0,04
70	574delA	0,04	71	p.I1328K	0,04	72	K598ins	0,02

№	Мутация	Частота,%	№	Мутация	Частота,%	№	Мутация	Частота,%
88	p.E1433G	0,02	89	Q290X	0,02	90	L863R	0,02
91	W401X	0,02	92	4005+1G>A	0,02	93	185+1G>T	0,02
94	c.1580dupA	0,02	95	L568F	0,02	96	P988R	0,02
97	1717-1G>A	0,02	98	1525-1G>A	0,03	99	K1468R	0,02
100	L1093P	0,02	101	R851X	0,02	102	R709X	0,02
103	G551D	0,02	104	W19G	0,02	105	3272-26A>G	0,02
106	L812X	0,02	107	c.3532-3535dup	0,02	108	4005+1G>T	0,02
109	Q1412X	0,02	110	CFTRdele19-22	0,02	111	D572N	0,02
112	G480S	0,02	113	3272-11A>G	0,02	114	4374+1G>A	0,02
115	G461E	0,02	116	T604I	0,02	117	Y1032C	0,03
118	CFTRdele2-8	0,02	119	E92A	0,02	120	G1249E	0,02
121	296+1G>T	0,02	122	c.1679+1G>T	0,02	123	R1102X	0,02
124	Q359K-T360K	0,02	125	p.I530T	0,02	126	2790-2A>G	0,02
127	E403D	0,02	128	p.F1078I	0,02	129	p.Q1038X	0,02
130	4095+1G>T	0,02	131	S549N	0,02	132	Y569D	0,02
133	p.W361X	0,02	134	Q1476X	0,02	135	406-1G>A	0,02
136	P205S	0,02	137	CFTRdele1-11	0,02	138	p.T1036N	0,02
139	c.1219delG	0,02	140	541del4	0,02	141	c.869+2T>G	0,02
142	324delC	0,02	143	4040delA	0,02	144	3791delC	0,02
145	2114delT	0,02	146	4025delG	0,02	147	3457delA	0,02
148	1027delG	0,02	149	3321delG	0,02	150	1366delG	0,02
151	2043delG	0,02	152	1680-1G>C	0,02	153	663delT	0,02
154	3359-11CT	0,02	155	583-11G	0,02	156	CFTR 11-18-20	0,02

Алгоритм ДНК-диагностики

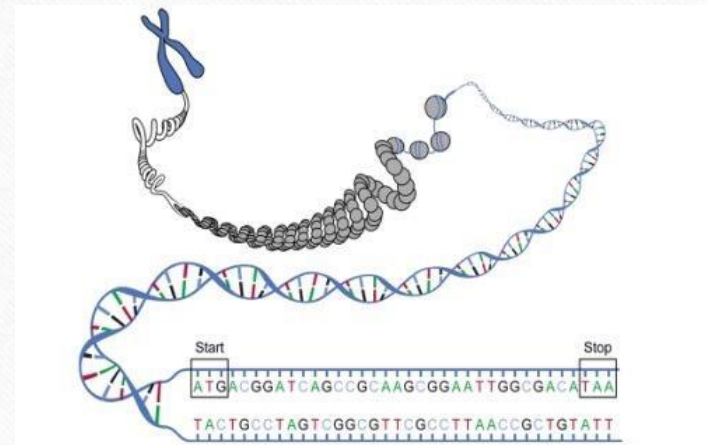
- Таргетный анализ

(поиск частых мутаций)

- Российская панель частых мутаций гена *CFTR* содержит 30 мутаций
- Суммарная доля мутаций составляет 80% от общего числа мутантных аллелей гена *CFTR*, встречающихся у больных муковисцидозом России

- Секвенирование гена *CFTR*

- Включая кодирующие и регуляторные области гена
- Частота выявления мутаций 98,7%

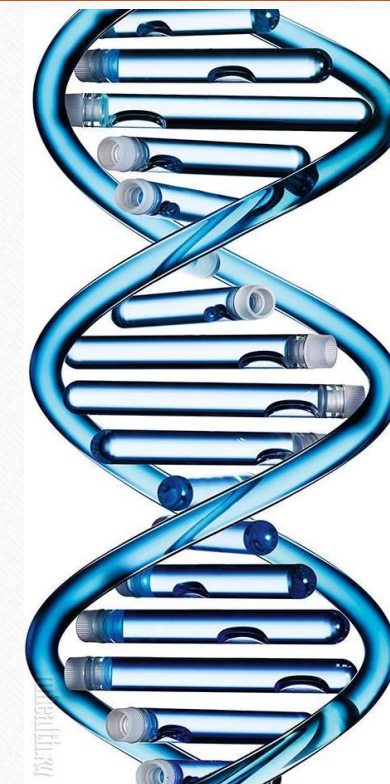


Пациент и его семья

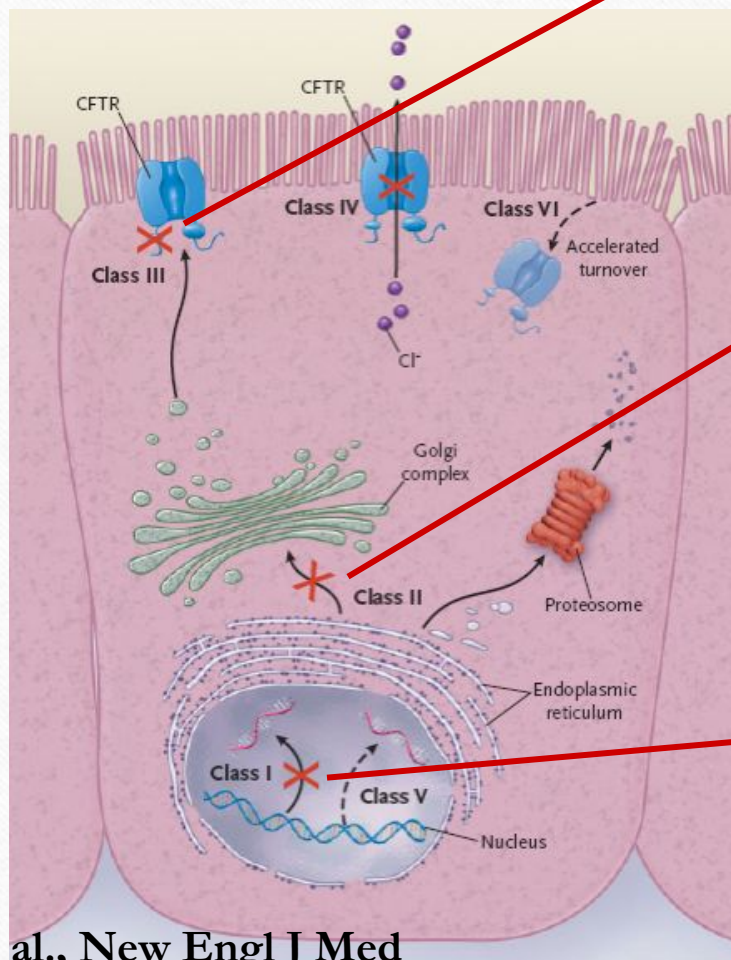


Значение ДНК-диагностики для пациента

- Подтверждение диагноза
- Определение прогноза течения заболевания
- Новые возможности терапии



CFTR - модуляторы



Потенциаторы – мишенью данных препаратов являются молекулы мутантного белка CFTR, располагающиеся в апикальной мембране. Действие потенциаторов направлено на восстановление (активацию) функции ионного канала, образованного мутантным белком CFTR (мутации III-IV классов) - **Генистин; Калидеко (VX-770)**.

Корректоры – лекарственные средства, позволяющие мутантному белку CFTR пройти через систему внутриклеточного качественного контроля и занять правильное расположение на апикальной мембране (мутации II класса) - **4-фенилбутират/генистин; аналог sildenafil-КМ11060; куркумин; VX-809**.

Вещества, способствующие **«прочитыванию» стоп-кодонов** в CFTR-mRNA и предотвращению преждевременной терминации синтеза молекулы белка, используются при лечении пациентов, имеющих нонсенс-мутации (мутации I класса).

Клинические исследования по муковисцидозу (01.06.2016)

Вид	количество	1	2	3	4
CFTR модуляторы	10	2	4	4	0
Антибактериальные препараты	2	0	1	1	0
Противовоспалительные	2	0	1	1	0
Нутритивная поддержка	2	1 –на животных	0	1	0
Муколитики	3	0	2	1	0
Наблюдательные	3				3
Всего	22	2	9	8	3

ДНК-диагностика в жизни семьи

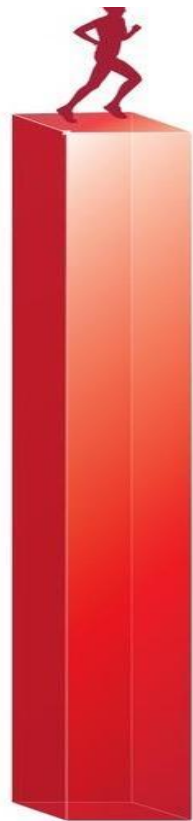
- Для родителей ребенка:
 - Прогноз потомства
 - Возможность пренатальной диагностики
 - Использование репродуктивных технологий (ЭКО)
- Для братьев, сестер и других родственников
 - Выяснение статуса носителя мутации



Фармакогенетика при муковисцидозе 2ст №3

В зависимости от активности ферментов биотрансформации выделяют фенотипы

**УЛЬТРА
БЫСТРЫЙ**



**БЫСТРЫЙ
(НОРМАЛЬНЫЙ)**



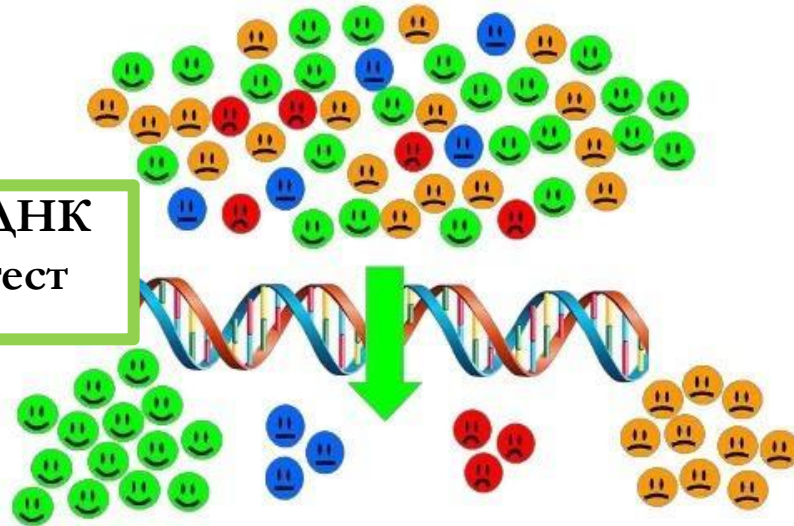
ПРОМЕЖУТОЧНЫЙ



МЕДЛЕННЫЙ



ДНК
тест



**БЕЗОПАСНО
ЭФФЕКТИВНО**

**БЕЗОПАСНО
НЕЭФФЕКТИВНО**

**НЕБЕЗОПАСНО
НЕЭФФЕКТИВНО**

**НЕБЕЗОПАСНО
ЭФФЕКТИВНО**

Разработки научно-клинического отдела муковисцидоза **ФГБНУ «МГНЦ»** и отделения муковисцидоза **ГБУЗ МО «МО КДЦД»** позволяют определить тактику

терапии:

2ст №4



Ген CFTR и рецидивирующий (или хронический) панкреатит

Панкреатит может быть обусловлен мутациями в ряде генов и встречаться как у людей без МВ, так и на его фоне.

Мутации в гене CFTR встречаются у 32-48% больных с хроническим панкреатитом с аутосомно-рецессивный типом наследования и у 10-15% больных МВ с сохранной функцией поджелудочной железы.

Больные МВ с «мягкими» мутациями чаще имеют панкреатит.

Помимо мутаций в гене CFTR при панкреатите встречаются мутации в генах SPINK1 (ингибитор сериновой протеазы, тип Казал 1; serine protease inhibitor, Kazal type 1),

PRSS1 (катионный трипсиноген),

A1AT (α 1-антитрипсин).

Предполагают возможность дигенного наследования панкреатита: часто у пациентов с панкреатитом обнаруживают гетерозиготное носительство мутаций в генах CFTR и PRSS1 или SPINK1

Куда обращаться :

- За направлением на генетическую диагностику - в отделение муковисцидоза ГБУЗ МО «МОКДЦД»
- Для проведения ДНК диагностики и генетического консультирования - в ФГБНУ "Медико-генетический научный центр" ,
Поликлиническое отделение, 115478, Москва, ул. Москворечье д.1. www.med-gen.ru, Тел. 8 (495)111-03-03

За направлением на генетическую диагностику - в отделение муковисцидоза ГБУЗ МО «МОКДЦД»

Правила записи на консультативный прием и в дневной стационар в отделение муковисцидоза ГБУЗ МО «МОКДЦД»

- Часы работы отделения с 9 до 18 часов. Телефон регистратуры: тел.8 (495) 587-33-66. Часы записи на прием с 9.00 до 15.00.
- Прием пациентов производится согласно микрофлоре дыхательного тракта. При записи необходимо назвать дату последнего бактериологического анализа и его результат, а также иметь в распечатанном виде на прием. Анализ должен быть сдан за 2 недели до приема в одной из двух бактериологических лабораторий г. Москвы:
 1. ГКБ №15 им. О.М. Филатова, ул. Вешняковская 23, бактериологическая лаборатория, тел. 8 (495) 375 12 24
 2. Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф.Гамалеи Российской академии медицинских наук, лаборатория молекулярной эпидемиологии госпитальных инфекций (адрес: улица Гамалеи 18, тел. 8 (499) 193 55 94, 8 (903) 536 62 37)

Для прикрепления к центру необходимо:

1. Получить в поликлинике направление по форме 057у в отделение муковисцидоза ГБУЗ МО «МОКДЦД» по адресу: МО, г. Мытищи, ул. Коминтерна, д.24а, стр.1. В направлении должно быть указано: для консультации, динамического наблюдения, обследования и лечения. Обязательно наличие даты, подписей, печатей.
2. Предоставить копии документов: паспорт родителя, свидетельство о рождении ребенка, страховой полис ребенка (если полис в виде пластиковой карты, то необходимо сопроводительное письмо страховой компании с датой получения полиса), СНИЛС, справка об инвалидности (при наличии), последняя выписка из стационара или амбулаторного приема в центре муковисцидоза, а для детей, которым необходимо исключить или подтвердить муковисцидоз - выписка из амбулаторной карты, справку о прививках, соскоб на энтеробиоз и кал на яйца глистов.

Куда обращаться:

для проведения ДНК диагностики и генетического консультирования

- Взять направление в МГНЦ в отделении муковисцидоза **ГБУЗ МО «МОКДЦД»**
- Записаться на прием в ФГБНУ "Медико-генетический научный центр" ,
Поликлиническое отделение, 115478, Москва, ул. Москворечье
д.1. www.med-gen.ru, Тел. 8 (495)111-03-03 (четверг – Шабалова Лидия
Абрамовна)
- При необходимости секвенирования гена *CFTR* отделение муковисцидоза
ГБУЗ МО «МОКДЦД» сделает консилиум специалистов.

Забор крови на ДНК диагностику – 1 раз

- Не нужна подготовка.
- В отделении муковисцидоза до 16.00.
- В поликлинике МГНЦ до 13.00.
- Количество минимально 3 мл.
- Пациент, родители, братья и сестры

Важная информация для родителей:

- В центре муковисцидоза проводится **диагностика и лечение** заболевания в рамках консультации или дневного стационара и с 15 января –суточного пребывания.
- Организовано обследование новорожденных по программе **неонатального скрининга**, детей любого возраста из групп риска по направлению участковых педиатров, узких специалистов.
- **Потовые пробы** проводятся с применением трех современных методик по определению проводимости пота на аппаратах - Нанодакт, Макродакт и модифицированный классический метод. **Консилиумы специалистов** центра проводятся 1 раз в неделю
- Консультации диетолога, кинезиотерапевта проводятся по предварительной записи.

Работает горячая линия по всем вопросам, связанным с диагностикой, обследованием и лечением.

Телефон горячей линии 8-495-228-33-88(пн-пт 10:00-14:00)