

*На правах рукописи*

**ЧУРЮМОВА**  
**Юлия Александровна**

**ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ В  
НЕОНАТАЛЬНОМ СКРИНИНГЕ МОНОГЕННЫХ НАСЛЕДСТВЕННЫХ  
БОЛЕЗНЕЙ ОБМЕНА**

**3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика**

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук профессор **Вавилова Татьяна Владимировна**

**Официальные оппоненты:**

**Ижевская Вера Леонидовна** - доктор медицинских наук, федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, заместитель директора по научной работе;

**Михайлова Светлана Витальевна** - доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующего отделением медицинской генетики.

**Ведущая организация:** федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «12» декабря 2023 года в 11:00 часов на заседании диссертационного совета 04.1.001.01 на базе ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 4/2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 197345, Санкт-Петербург, ул. Оптиков, д. 54 и на сайте <https://nrcerm.ru>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
кандидат медицинских наук доцент

**Санников Максим Валерьевич**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Наследственные болезни обмена (НБО) представляют собой разнообразный класс генетических расстройств, при которых специфические ферментативные дефекты препятствуют нормальному метаболизму экзогенных или эндогенных биохимических веществ [Ferreira C.R., 2019; Tluczek A., 2009]. В настоящее время известно более 500 различных НБО, причем приблизительно 25% из них проявляются в неонатальном периоде [Saudubray J.M., 2018]. Данная группа заболеваний является наиболее распространенной причиной смерти на первом году жизни, приводя к смертельным исходам более трех миллионов детей в возрасте до 5 лет в мире каждый год [Барашнев Ю.И., 2004; Christianson A., 2005]. Кроме того, аналогичное число детей с наследственной патологией выживает, имея серьезные осложнения, приводящие к инвалидности [Sayson B., 2015]. Диагностика данных заболеваний, как правило, затруднена по нескольким причинам [Зыков В.П., 2013; Mandal R., 2018]. Во-первых, клинические проявления различных форм НБО в большинстве своем не специфичны и схожи с таковыми при других заболеваниях, связанных с поражениями различных органов и их комбинаций. Во-вторых, патогенез одного и того же заболевания может обуславливать совершенно разные фенотипы в зависимости от возраста манифестации. В-третьих, диагностика определенных классов заболеваний требует назначения специфических лабораторных тестов. Поздняя диагностика этих метаболических нарушений приводит к необратимой умственной отсталости, неврологическим нарушениям, инвалидности и даже к смерти [Иллариошкин С.Н., 2021]. В России вклад наследственных болезней обмена в детскую заболеваемость и смертность также велик. По расчетным данным ежегодно рождается от 35000 до 75000 больных детей [Новиков П. В., 2013]. Для некоторых НБО установлена средняя частота: фенилкетонурия – 1:6971 [Волгина С.Я., 2017], муковисцидоз – 1:10296 [Колбин А.С., 2020], адреногенитальный синдром – 1:9563 [Карева М.А., 2014]; врожденный гипотиреоз – 1:3689 [Дедов И.И., 2018], галактоземия – 1:20149 [Баранов А.А., 2021].

**Степень разработанности темы.** Во многих странах с целью вторичной профилактики, направленной на раннее выявление наследственных болезней обмена, национальные программы здравоохранения предусматривают проведение массового скрининга новорожденных [Новиков П. В., 2012; Баранов А.А., 2015; Shanmuganathan M., 2019]. В России неонатальный скрининг с 2006 г. в рамках приоритетного проекта “Здоровье” был расширен до 5 наследственных заболеваний. Наряду с тестируемыми ранее фенилкетонурией и врожденным гипотиреозом в обследование были включены муковисцидоз, галактоземия, и адреногенитальный синдром. С 1 января 2023 года в дополнение к существующему скринингу проводится исследование методом тандемной масс-спектрометрии биохимических маркеров 36 заболеваний, для которых разработаны и успешно применяются схемы лечения, основанные на диетотерапии [Приказ Министерства Здравоохранения РФ от 13 июля 2022 г. N 274 н]. При этом, несмотря на высокие показатели чувствительности и специфичности определяемых биомаркеров, биохимический скрининг характеризуется низкими значениями положительной прогностической ценности, что обуславливает высокий процент ложноположительных результатов [Драпкина О.М., 2017; Waters D., 2018; Yang, N., 2020]. Помимо серьезных экономических затрат, ложноположительные результаты имеют существенные негативные последствия в виде тяжелого психологического стресса родителей [Waisbren S., 2016]. Эти факторы указывают на необходимость

проведения подтверждающих, более специфичных тестов при получении положительного результата [Захарова Е.Ю., 2017]. В настоящее время в России не регламентированы единые алгоритмы проведения подтверждающих лабораторных тестов в рамках программ неонатального скрининга [Павлов А.Е., 2013]. Существующие клинические рекомендации для отдельных заболеваний направлены на диагностику при обследовании конкретного пациента и не могут быть использованы в программах массового скрининга. Отсутствие четких рекомендаций по проведению подтверждающих тестов и маршрутизации пациентов с положительными результатами неонатального скрининга обуславливает “диагностическую одиссею”, затягивающую постановку диагноза и откладывающую лечение, а также повышает тревожность родителей таких детей.

Почти все заболевания, включенные в программу неонатального скрининга, являются моногенными и гены, ответственные за их развитие, хорошо изучены. В сочетании с существенным снижением стоимости секвенирования генома это создает благоприятные предпосылки для применения генетических тестов в структуре скрининга. Технология высокопроизводительного секвенирования, благодаря возможности одновременно быстро и точно определять последовательность групп генов в нескольких десятках образцов, позволит существенно повысить эффективность скрининговых программ. В связи с этим, в мире ведутся активные обсуждения возможности использования геномного секвенирования для популяционного скрининга, в том числе и неонатального [Ficicioglu C., 2017; Miller D.T., 2021]. Однако прежде, чем секвенирование генома будет реализовано в программах массового обследования новорожденных, необходимо научно обосновать его клиническую пользу и экономическую эффективность, а также определить способность выявлять патогенные и доброкачественные варианты исследуемых генов [Воскобоева Е.Ю., 2009; Колбин А.С., 2020]. Кроме того, необходимо рассмотреть этические и политические вопросы, касающиеся получения случайных находок для пациентов и их семей, вопросы надлежащего хранения и использования геномных данных [Дерябина С.С., 2015; Ижевская В.Л., 2022; Almannai M., 2016; Voemer F., 2017; Wertheim-Tysarowska, K., 2015].

Высокий процент ложноположительных результатов, обусловленных низкой распространенностью каждого заболевания в популяции, сложности, возникающие при интерпретации неоднозначных результатов биохимического скрининга, а также отсутствие протоколов подтверждающей диагностики, создают необходимость оптимизации алгоритмов неонатального скрининга наследственных заболеваний. С учетом этого были сформулированы цель и задачи настоящего исследования.

**Цель исследования.** Разработать и оценить эффективность алгоритма неонатального скрининга моногенных наследственных болезней обмена: муковисцидоза, фенилкетонурии и галактоземии с использованием технологии высокопроизводительного секвенирования (NGS) в популяции новорожденных в г. Санкт-Петербург.

#### **Задачи исследования**

1. Оценить диагностическую информативность лабораторных тестов, используемых для неонатального скрининга муковисцидоза, фенилкетонурии и галактоземии в рамках использования стандартного алгоритма.
2. Определить оптимальные пороговые значения показателей иммунореактивного трипсиногена (ИРТ1, ИРТ2) в точках принятия решений на основе ретроспективных данных неонатального скрининга на муковисцидоз.

3. Разработать алгоритм неонатального скрининга с включением NGS секвенирования в качестве теста второго уровня и сравнить его эффективность с существующим.

4. Определить значение NGS секвенирования для выявления генетических вариантов, обуславливающих развитие “мягких” форм моногенных наследственных заболеваний.

**Научная новизна исследования.** Впервые в РФ на большом клиническом материале (196217 новорожденных) произведена оценка эффективности программы неонатального скрининга на муковисцидоз, фенилкетонурию и галактоземию, проводимых по схеме двукратного определения соответствующих биохимических маркеров (ИРТ1/ИРТ2, ФА1/ФА2, ГАО1/ГАО2). Рассчитаны критерии информативности протоколов скрининга: чувствительность, специфичность, положительная прогностическая ценность, отрицательная прогностическая ценность, положительное и отрицательное отношение правдоподобия.

Впервые в рамках скрининга проведено исследование мутаций в генах CFTR, PAH и GALT методом высокопроизводительного секвенирования. Проведен анализ частот и спектра отдельных мутаций указанных генов в популяции Северо-Западного региона РФ.

Проведен сравнительный анализ алгоритмов диагностики муковисцидоза, фенилкетонурии и галактоземии с применением только биохимических и комплекса биохимических/молекулярно-генетических методов скрининга новорожденных.

Научно обоснована необходимость проведения подтверждающей молекулярно-генетической диагностики исследуемых моногенных заболеваний на третьем этапе скрининга новорожденных с целью ранней диагностики и своевременного начала лечебно-профилактических мероприятий. Предложен и апробирован новый методологический подход для проведения неонатального скрининга наследственных болезней обмена с применением NGS секвенирования.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Предложен научно обоснованный алгоритм диагностики с применением методов расширенного геномного тестирования, позволяющий верифицировать диагноз наследственного заболевания после проведения скрининговых исследований.

Определена аналитическая точность и клиническая польза рутинного применения метода секвенирования в программе массового скрининга новорожденных.

Показана возможность выявления больных муковисцидозом с генотипами, включающими редкие мутации, на основе анализа более 600 мутаций в гене CFTR методом NGS.

Продемонстрированы возможности NGS для выявления больных с гиперфенилаланиемией, обусловленной «мягким» генотипом, не требующих назначения лечебного питания.

Показано влияние гетерозиготного носительства мутантных аллелей гена GALT, а также аллелей, характерных для биохимической формы галактоземии Дуарте, на уровень общей галактозы в крови у новорожденных.

Представлены доказательства возможности идентификации гетерозиготных носителей патологических мутаций, не проявляющихся клинически, но дающих высокий риск развития заболевания в последующих поколениях, что позволяет повысить эффективность медико-генетического консультирования.

**Методология и методы исследования.** Для реализации поставленной цели была проработана отечественная и зарубежная литература, проведено комплексное ретроспективно-проспективное исследование, в котором использованы биохимические и молекулярно-генетические методы исследования образцов крови пациентов. Обработка полученных данных производилась с использованием современных методов и программ статистической обработки, в том числе применяемым к big data.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Несмотря на высокую чувствительность и специфичность лабораторных биохимических тестов, в связи с низкой распространенностью заболеваний муковисцидоза, фенилкетонурии и галактоземии в популяции и низкими показателями прогностической ценности положительных результатов, высока вероятность получения ложноположительных результатов при использовании стандартного алгоритма.

2. Первый этап биохимического скрининга с использованием измерения концентрации иммунореактивного трипсиногена показывает удовлетворительные диагностические характеристики теста и соответствие уровня порогового значения, заявленному по стандартному протоколу. В случае нарушения контрольных сроков забора крови для проведения ретестирования ИРТ, диагностическая ценность исследования теряется.

3. Диагностическая эффективность алгоритма неонатального скрининга моногенных наследственных болезней обмена максимальна при комплексном использовании биохимических методов и таргетного высокопроизводительного секвенирования NGS за счет достижения наибольшей прогностической ценности положительного результата.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Достоверность и обоснованность полученных результатов научной работы обеспечена детальным теоретическим анализом проблемы, репрезентативным объемом выборки обследованных пациентов, достаточным количеством проведенных исследований и адекватным статистическим анализом полученных данных. Сформированные и обследованные группы больных сопоставимы по полу, возрасту, репрезентативны по количеству и могли использоваться для решения поставленных задач.

Материалы диссертационного исследования были представлены на Международной научной конференции Научного Парка СПбГУ «Трансляционная биомедицина: современные методы междисциплинарных исследований в аспекте внедрения в практическую медицину» (Санкт-Петербург, 2015), на 1-й и 2-й Всероссийской научно-практической конференции «NGS в медицинской генетике» (Суздаль, 2016, 2017), на Российском конгрессе с международным участием «Молекулярные основы клинической медицины – возможное и реальное» (Санкт-Петербург, 2017, 2020), на Всероссийской школе по муковисцидозу с международным участием «Персонализированная медицина и муковисцидоз» (Коломна, 2018), на Первом Национальном конгрессе с международным участием «ЛАБРИН 2019» (Москва, 2019), на Пятом Юбилейном российском конгрессе лабораторной медицины (Москва, 2019), на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современные подходы и перспективы в оказании медицинской помощи больным с врожденными и (или) наследственными заболеваниями» (Санкт-Петербург, 2019), на Первой онлайн научно-практической конференции «Новые технологии в диагностике и лечении наследственных болезней» (Москва, 2020).

**Публикация результатов исследования.** По материалам диссертации опубликовано 13 печатных работ, из них 3 статьи в рецензируемых научных изданиях,

рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации для опубликования результатов диссертационных исследований.

**Личный вклад автора.** Автор лично участвовала в планировании и организации научной работы. Диссертант самостоятельно сформировала группы обследуемых, выполнила молекулярно-генетическое исследование образцов крови всех пациентов. Все материалы, представленные в диссертационном исследовании, получены, обобщены, статистически обработаны и проанализированы автором лично.

**Внедрение результатов в практику.** Результаты исследования используются в учебном процессе на кафедре лабораторной медицины и генетики ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России (Санкт-Петербург), в программах обучения кафедры клинической лабораторной диагностики, биологической и общей химии им. В.В. Соколовского ФГБУ ВО СЗГМУ им. И.И.Мечникова и внедрены в практику работы СПбГКУЗ «Диагностический центр (медико-генетический)».

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 105 страницах машинописного текста, содержит 25 таблиц, иллюстрирована 12 рисунками и состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы (включает 150 источников, из которых отечественные - 31, зарубежные - 119).

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Материалы и методы исследования.** Для реализации поставленной цели исследования проведено проспективное исследование. На первом этапе 196217 детям, родившимся с 01.01.2015 г. по 01.01.2018 г., проведены лабораторные тесты в рамках существующего стандартного алгоритма скрининга, предполагающего определение биохимических маркеров по следующей схеме:

- муковисцидоз: первичное измерение уровня иммунореактивного трипсиногена (ИРТ1) – повторное измерение (ретест) уровня ИРТ (ИРТ2) – алгоритм ИРТ1/ИРТ2;
- фенилкетонурия: первичное измерение уровня фенилаланина (ФА1) - повторное измерение (ретест) уровня ФА (ФА2) – алгоритм ФА1/ФА2;
- галактоземия: первичное измерение уровня общей галактозы (ГАО1) - повторное измерение (ретест) уровня ГАО (ГАО2) – алгоритм ГАО1/ГАО2.

На втором этапе по результатам скринингового тестирования было выделено 858 новорожденных с положительными результатами для дальнейшего анализа данных. Сформированы 4 группы обследуемых:

- 1) 264 новорожденных с повышенными значениями ретеста ИРТ (ИРТ2);
- 2) 80 новорожденных с повышенными значениями ретеста ФА (ФА2);
- 3) 514 новорожденных с повышенными значениями ретеста ГАО (ГАО2);
- 4) 110 здоровых новорожденных контрольной группы с нормальными значениями ФА, ИРТ и ГАО по результатам биохимического скрининга.

Критерии включения в группы: повышенные уровни ИРТ2, ГАО2 и ФА2 при проведении ретестов. Критерии исключения: одновременное повышение более чем одного маркера исследуемых заболеваний (ГАО2, ИРТ2, ФА2).

В четырех исследуемых группах (968) в дополнение к протоколам ИРТ1/ИРТ2, ФА1/ФА2, ГАО1/ГАО2 проведен анализ генов CFTR, GALT и PАН образцов ДНК методом NGS.

Материалом для биохимических методов исследования служила капиллярная кровь, взятая в родильном доме из пятки новорожденного на 4-5-й день жизни на бланки фильтровальной бумаги. Высушенные образцы крови доставлялись курьером в лабораторию СПбГКУЗ «Медико-генетический центр». Определение метаболитов (ИРТ, ФА, ГАО) проводилось в качественно взятых образцах крови.

#### 1. Биохимические методы:

Количественное определение биохимических маркеров проводили с использованием коммерческих наборов реагентов и полуавтоматического флуориметра Victor 2 (Perkin Elmer, США). Оценивали следующие показатели:

- иммунореактивный трипсиноген (ИРТ) – иммунофлуоресцентный метод; референтные значения: дети 3-20 дня жизни - < 70 нг/мл, дети 21-28 дней жизни - < 40 нг/мл;

- фенилаланин (ФА) – флуориметрический метод; референтные значения: дети от 3 дней до 1 года – <122 мкмоль/л;

- общая галактоза (ГАО) – флуоресцентный метод; референтные значения: дети от 3 дней до 1 года - <390 мкмоль/л.

Референтные значения использовались в соответствии с рекомендациями производителей тест-систем: «ИРТ-Неоскрин» (Иммуноскрин, Россия), «Галактоза-Неонатал» (Perkin Elmer, Финляндия), «ФКУ-Неоскрин» (Иммуноскрин, Россия).

#### 2. Молекулярно-генетический анализ.

Материалом для молекулярно-генетических методов исследования являлись образцы ДНК, выделенные из сухих пятен крови, используемых для биохимического неонатального скрининга. Выделение геномной ДНК проводилось с использованием набора реагентов «PureLink Genomic DNA» (Invitrogen, США), в соответствии с инструкцией производителя. Анализ 442 мутаций в гене CFTR, 99 мутаций в гене PАН, 40 мутаций в гене GALT проводили методом высокопроизводительного геномного NGS секвенирования с использованием тест-системы «VariFind Neosreen Assay» (Parseq Lab, Россия) и секвенатора Ion Personal Genome Machine (Life Technologies, США). В основе лежит метод полупроводникового секвенирования ДНК и технологии таргетного обогащения геномной ДНК Ampliseq с помощью мультиплексной ПЦР (Life Technologies, США).

### **Результаты исследования**

#### ***Оценка диагностической информативности лабораторных тестов, используемых для скрининга муковисцидоза в рамках стандартного алгоритма***

Неонатальный скрининг на МВ основан на двукратном количественном определении уровня иммунореактивного трипсиногена (ИРТ) в крови новорожденных: первичное определение ИРТ (ИРТ1) с 4-го по 21-й день жизни (cut-off < 70 нг/мл) и, в случае повышенного уровня ИРТ1, повторное определение (ретест) ИРТ (ИРТ2) на 21-й-28-й день жизни (cut-off < 40 нг/мл). Повышение уровня ИРТ1 отмечено у 678 из 196217 обследованных новорожденных, по результатам ретеста (ИРТ2) гипертрипсиногенемия сохранялась у 264 новорожденных.

Диагноз муковисцидоз в обследованной популяции был установлен 32 новорожденным, при этом повышенный уровень ИРТ2 наблюдался только у 31 ребенка, в 1 случае у ребенка с клиническими проявлениями муковисцидоза наблюдался

нормальный уровень ИРТ при первичном тестировании. Причиной ложноотрицательного результата теста ИРТ в указанном случае явилось наличие мекониального илеуса – обструкции терминального отдела подвздошной кишки – патогномичного признака муковисцидоза, который, может обуславливать низкие значения ИРТ (таблица 1).

Таблица 1

Результаты использования диагностического алгоритма ИРТ1/ИРТ2 в обследованной  
популяции

Результат алгоритма ИРТ1/ИРТ2	Заболевание		Всего
	Есть	Нет	
Положительный результат	31	233	264
Отрицательный результат	1	195952	195953
Всего	32	196185	196217

На основании полученных результатов уровня иммунореактивного трипсиногена, а также клинических данных, была проведена оценка информативности существующего диагностического алгоритма биохимического скрининга муковисцидоза (ИРТ1/ИРТ2), которая установила следующее: 1) чувствительность алгоритма составляет 94%; 2) специфичность – 99%; 3) положительная прогностическая ценность (ППЦ) – 12%; 4) отрицательная прогностическая ценность (ОПЦ) – 100%; 5) положительное отношение правдоподобия – 789; 6) отрицательное отношение правдоподобия – 17 (таблица 2).

Таблица 2

Характеристики информативности лабораторных тестов, используемых для скрининга  
муковисцидоза в рамках стандартного алгоритма (ИРТ1/ИРТ2)

Показатель	Значение	Границы доверительных интервалов	Уровень доверия
Чувствительность (Se)	0,94	0,80 - 1,00	99%
Специфичность (Sp)	0,99	0,99 - 0,99	99%
Положительная прогностическая ценность (PPV)	0,12	0,07 - 0,18	99%
Отрицательная прогностическая ценность (NPV)	1,0	1,0 - 1,0	99%
Положительное отношение правдоподобий (LR[+])	789	624 - 948	99%
Отрицательное отношение правдоподобий (LR[-])	17,0	4,9 - 314,1	99%
Распространенность заболевания(Prev)	0,00017	0,00010 - 0,00025	99%

Таким образом, несмотря на высокие показатели чувствительности (94%) и специфичности (99%), при проведении скрининга с использованием протокола ИРТ1/ИРТ2 сохраняется 88% вероятность получения ложноположительных результатов (PPV«+» 12%), что связано с низкой распространенностью муковисцидоза в обследуемой популяции (Prev = 1,7:10000). Также не исключена возможность получения

ложноотрицательных результатов теста. При проведении скрининга по протоколу ИРТ1/ИРТ2 обнаружен 1 пациент с отрицательным результатом, которому был поставлен диагноз муковисцидоз по данным клинической картины. В данном случае причиной ложноотрицательного результата явилось наличие мекониального илеуса, который, согласно литературным данным, может обуславливать низкие значения ИРТ в крови.

***Оценка диагностической информативности лабораторных тестов, используемых для скрининга фенилкетонурии в рамках использования стандартного алгоритма***

Согласно стандартному алгоритму первичное определение уровня фенилаланина (ФА1) проводилось на 4-5-й день жизни у доношенных и на 7-9-й день жизни у недоношенных новорожденных (cut-off<122 мкмоль/л). В случае получения повышенных значений фенилаланина производился повторный забор крови и повторное определение уровня фенилаланина (ФА2). Повышение уровня ФА1 отмечено у 118 из 196217 обследованных новорожденных, по результатам ретеста (ФА2) гиперфенилаланинемия сохранялась у 80 новорожденных.

При расчетах диагностической информативности использовался рекомендованный производителем cut-off для тестов ФА1 и ФА2 - 122 мкмоль/л. Образец с результатами двух тестов (ФА1 и ФА2), превышающих принятый порог, считался положительным, в противном случае – отрицательным (таблица 3).

Таблица 3

Результаты использования диагностического алгоритма ФА1/ФА2 в обследованной популяции

Результат алгоритма ФА1/ФА2	Заболевание		Всего
	Есть	Нет	
Положительный результат	35	45	80
Отрицательный результат	0	196137	196137
Всего	35	196185	196217

Были определены следующие характеристики диагностической информативности алгоритма ФА1/ФА2: 1) чувствительность – 97%; 2) специфичность – 100%; 3) положительная прогностическая ценность – 44%; 4) отрицательная прогностическая ценность – 100%; 5) положительное отношение правдоподобия – 37; 6) отрицательное отношение правдоподобия – 4150. Распространенность заболевания составила 1,8:10000 (Prev=0,00018).

При оценке предсказательной способности биохимического тестирования в алгоритме ФА1/ФА2 значение положительная прогностическая ценность составило 44%, означающее, что при получении положительного результата теста обследуемый может являться как больным, так и здоровым с практически равной вероятностью. В то же время наблюдается 100% отрицательная прогностическая ценность - шанс того, что пациент, имеющий отрицательный результат, болен составит лишь 1 из 10000. Таким образом, при биохимическом скрининге фенилкетонурии с использованием двукратного определения уровня фенилаланина сохраняется большая вероятность получения ложноположительных результатов (56%).

***Оценка диагностической информативности лабораторных тестов, используемых для скрининга галактоземии в рамках стандартного алгоритма***

В России проводится биохимический неонатальный скрининг на данное заболевание путем двукратного количественного измерения уровня общей галактозы (ГАО) в сухих пятнах крови новорожденных – алгоритм ГАО1/ГАО2. Первичное определение уровня общей галактозы (ГАО1) проводится на 4-5-й день жизни у доношенных и на 7-9-й день жизни у недоношенных новорожденных (cut-off<390 мкмоль/л). Повышение уровня ГАО1 отмечено у 739 из 196217 обследованных новорожденных, по результатам ретеста (ГАО2) положительный результат получен у 514 новорожденных (таблица 4).

Таблица 4

Результаты использования диагностического алгоритма ГАО1/ГАО2 в обследованной популяции

Результат алгоритма ГАО1/ГАО2	Заболевание		Всего
	Есть	Нет	
Положительный результат	2	512	514
Отрицательный результат	0	195703	195703
Всего	2	196215	196217

Были определены следующие характеристики диагностической информативности: 1) чувствительность – 75%; 2) специфичность – 100%; 3) положительная прогностическая ценность – 0,58%; 4) отрицательная прогностическая ценность – 100%; 5) положительное отношение правдоподобия – 287; 6) отрицательное отношение правдоподобия – 4,0. Распространенность заболевания составила 1,5:100000 (Prev=0,000015).

При оценке диагностической информативности протокола скрининга на галактоземию было получено низкое значение чувствительности (75%) и положительной прогностической ценности (0,6%). Учитывая количество случаев заболевания за 3 года (n=2), очевидно, что низкое значение положительной прогностической ценности, приводящее к получению 99% ложноположительных результатов скрининга, обусловлено низкой распространенностью данного заболевания в популяции (Prev=0,000015).

Таким образом, на основании анализа большого объема данных, отслеженных по неонатальному скринингу с использованием стандартных алгоритмов в течение 3 лет, показана высокая вероятность получения ложноположительных результатов и необходимость применения другой лабораторной технологии на этапе скрининга.

***Определение пороговых значений показателей иммунореактивного трипсиногена (ИРТ1, ИРТ2) в точках принятия решений на основе данных неонатального скрининга на муковисцидоз***

В настоящее время для иммунореактивного трипсиногена, в зависимости от срока взятия крови, используются два значения пороговой концентрации: 70 нг/мл со сроком взятия крови до 21-го дня жизни ребенка и 40 нг/мл – с 21-го по 28-й день. Указанные значения пороговых концентраций ИРТ и временные промежутки проведения первичного и повторного тестирования связаны с постепенным снижением уровня иммунореактивного трипсиногена в крови новорожденных в течение первого месяца жизни. Использование двух пороговых значений для иммунореактивного трипсиногена в биохимическом скрининге способствует исключению ложноотрицательных результатов за счет установления cut-off ИРТ1>70 нг/мл и минимизации ложноположительных за счет cut-off ИРТ2>40 нг/мл.

Точки отсечения 70 нг/мл и 40 нг/мл рекомендованы производителями наборов для определения ИРТ, однако, в силу специфических особенностей, в каждой тестируемой популяции должен быть определен собственный порог. В России до настоящего времени таких исследований для ИРТ не проводилось.

С целью определения пороговых значений иммунореактивного трипсиногена были проанализированы данные неонатального скрининга новорожденных с повышенными результатами скрининга на муковисцидоз (n=264). Определение точки отсечения для ИРТ1 и ИРТ2 производилось с помощью метода ROC-анализа.

Из данных ROC-анализа следует, что оптимальной точкой отсечения для ИРТ1 в срок до 21 дня жизни, обеспечивающей максимум чувствительности и специфичности метода, является точка, соответствующая концентрации ИРТ=71,5 нг/мл (AUC: 0,991) (рисунок 1).

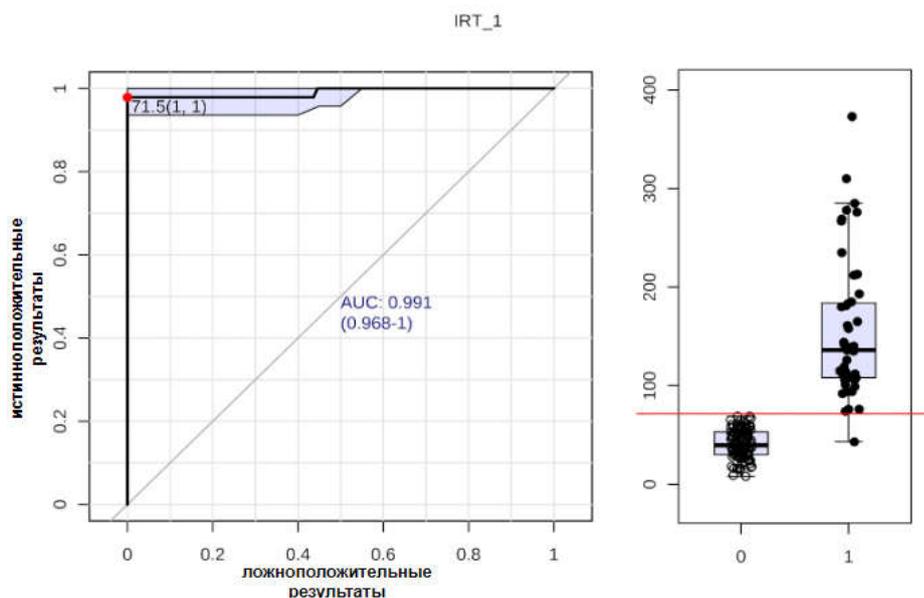


Рисунок 1. ROC-анализ концентрации ИРТ1 в группе обследованных детей.

Рассчитанное нами пороговое значение ИРТ1 соответствует точке отсечения (cut-off ИРТ1 <70 нг/мл), используемой в рамках стандартного биохимического алгоритма скрининга на муковисцидоз. По результатам проведенного ROC-анализа на основании полученных в нашем исследовании результатов измерения ИРТ2 определена точка отсечения, соответствующая концентрации 70,5 нг/мл (AUC:0,959) (рисунок 2).

Полученное значение для ИРТ2 существенно выше рекомендованного в настоящее время значения cut-off, равного 40 нг/мл, и практически соответствует значению cut-off для ИРТ1 (70 нг/мл). Ввиду того, что уровень ИРТ и, соответственно, пороговое значение зависит от возраста ребенка, был проведен анализ сроков забора крови для измерения ИРТ2 в группе обследуемых детей (n=264), по результатам которого было выявлено, что у 208 (79%) из 264 обследуемых новорожденных забор крови для проведения ретеста ИРТ 2 осуществлялся до 21-го дня жизни и только у 56 (21%) кровь взята в соответствующие для проведения ретеста сроки (с 21 по 28 день жизни).

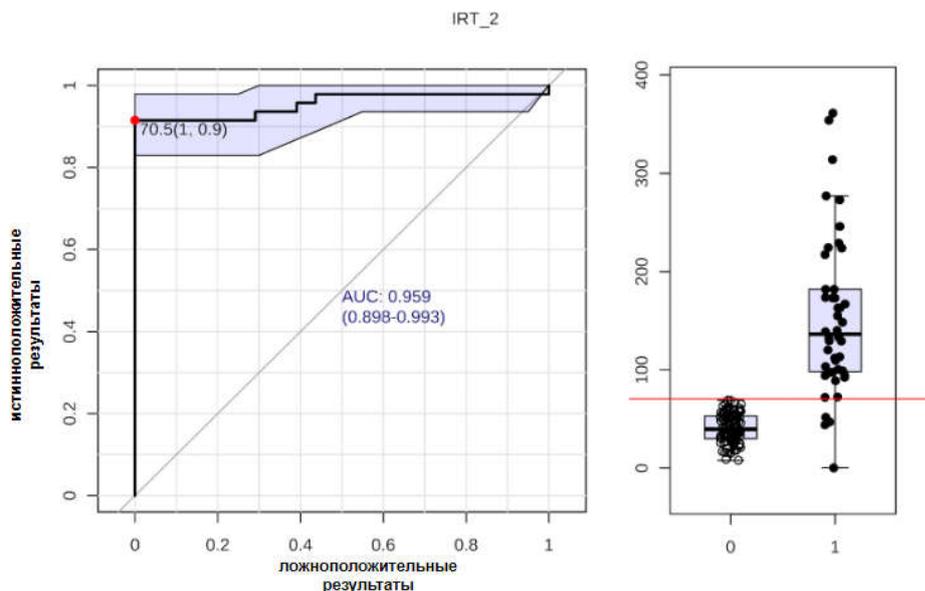


Рисунок 2. ROC-анализ концентрации ИРТ2 в группе обследованных детей.

Таким образом, из-за несоблюдения правильных сроков взятия крови рассчитанное значение cut-off для ретеста ИРТ2 не может применяться в существующем алгоритме биохимического скрининга на муковисцидоз. Нарушение преаналитического этапа при проведении ретеста ИРТ2 способствуют увеличению ложноположительных результатов скрининга на муковисцидоз.

***Разработка алгоритма неонатального скрининга с включением NGS секвенирования в качестве теста второго уровня***

Важным аспектом работы явилась оценка необходимости проведения подтверждающей диагностики скринируемых заболеваний с помощью молекулярно-генетического тестирования методом NGS-секвенирования ДНК. Для анализа были выбраны гены, мутации в которых определяют формирование фенотипа исследуемых болезней обмена, предложен и апробирован следующий алгоритм:

- 1) муковисцидоз: ИРТ1-ИРТ2-NGS секвенирование гена CFTR;
- 2) фенилкетонурия: ФА1-ФА2-NGS секвенирование гена PAH;
- 3) галактоземия: ГАО1-ГАО2-NGS секвенирование гена GALT (рисунок 3).

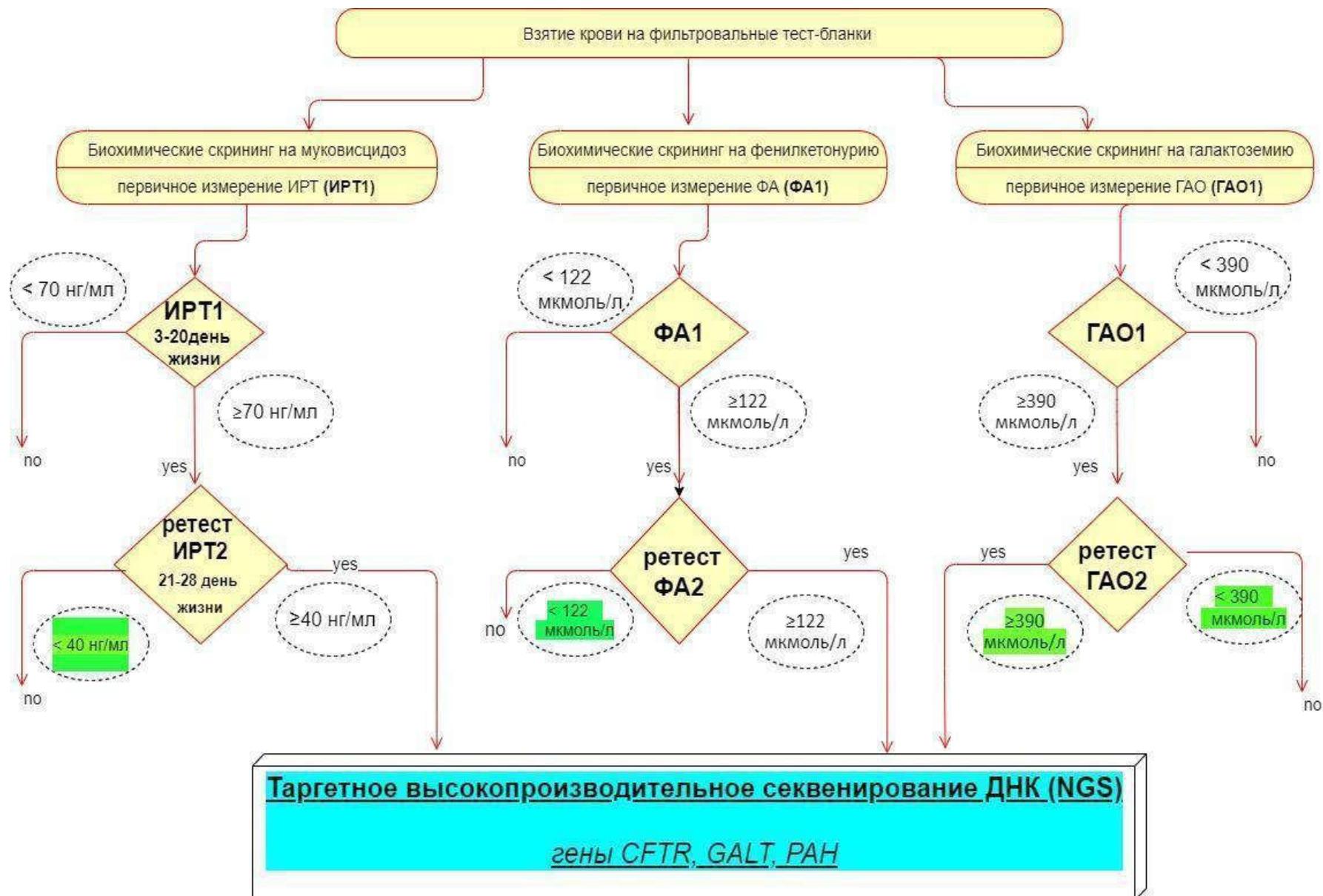


Рисунок 4. Схема предложенного алгоритма неонатального скрининга.

### **Сравнение эффективности существующего алгоритма неонатального скрининга с предложенным**

Для оценки NGS-метода был принят бинарный критерий: при наличии двух мутаций в исследуемом гене (CFTR-муковисцидоз, PAH-фенилкетонурия, GALT-галактоземия) результат считался положительным, а в любом другом случае – отрицательным. В процессе сравнения использовались данные об окончательном диагнозе обследуемых пациентов, полученные из заключения врача-генетика. Положительный результат NGS у пациента с соответствующим подтвержденным врачом-генетиком диагнозом считался истинно положительным. В случае, если при дальнейшем обследовании диагноз не подтверждался – ложноположительным. Соответственно, отрицательный результат NGS у пациента с неподтвержденным диагнозом считался истинно отрицательным, а отрицательный результат NGS с подтвержденным впоследствии диагнозом был определен как ложноотрицательный.

#### **Муковисцидоз**

ДНК-диагностика методом NGS проведена 264 детям: 263 новорожденным с повышенными результатами скрининга и 1 ребенку с отрицательным результатом скрининга (ИРТ1 = 43 нг/мл) с клинической картиной муковисцидоза (мекониальный илеус) (таблица 5).

Таблица 5

Результаты использования диагностического алгоритма ИРТ1/ИРТ2/NGS

Результат алгоритма ИРТ1/ИРТ2/NGS	Заболевание		Всего
	Есть	Нет	
Положительный результат	32	0	32
Отрицательный результат	0	232	232
Всего	32	232	264

При проведении генотипирования новорожденных в группе с повышенными значениями ИРТ2 положительный результат, соответствующий наличию двух патогенных мутаций в гене CFTR, получен у 32 пациентов (12%), у которых впоследствии был подтвержден диагноз муковисцидоз. В 262 случаях (88%) по данным NGS получен отрицательный результат, среди которых в 18 случаях (6,8) было обнаружено носительство одной патогенной мутации, а у 214 пациентов патогенных мутаций обнаружено не было. У всех пациентов с отрицательным результатом ДНК-диагностики диагноз муковисцидоз установлен не был.

Для характеристики информативности диагностического алгоритма ИРТ1/ИРТ2/NGS были определены следующие показатели: 1) чувствительность – 97,0%; 2) специфичность – 100%; 3) положительная прогностическая ценность – 98%; 4) отрицательная прогностическая ценность – 100%; 5) положительное отношение правдоподобия – 227; 6) отрицательное отношение правдоподобия – 33,9.

#### **Фенилкетонурия.**

Для диагностики фенилкетонурии был исследован ген PAH у 80 новорожденных с повышенными результатами неонатального скрининга (ФА2>122 мкмоль/л). По результатам секвенирования гена PAH у 32 (40%) из 80 новорожденных обнаружены 2 патогенные мутации, в 48 (60%) случаях получен отрицательный результат (таблица 6).

Таблица 6

Результаты использования диагностического алгоритма ФА1/ФА2/NGS

Результат алгоритма ФА1/ФА2/NGS	Заболевание		Всего
	Есть	Нет	
Положительный результат	32	0	32
Отрицательный результат	2	46	48
Всего	34	46	80

У одного ребенка (уровень ФА2 – 1310 мкмоль/л), с установленным диагнозом фенилкетонурия, в связи с ограничениями метода NGS (невозможность обнаружения крупных делеций/инсерций), выявлена только одна патогенная аллель. Еще у одного ребенка с повышенным неонатальным скринингом (уровень ФА2 – 2326 мкмоль/л) мутаций в гене РАН выявлено не было, что может быть связано с нарушениями обмена тетрагидробиоптерина, обусловленных мутациями в других генах. Таким образом, при проведении генетического тестирования в группе детей с подозрением на фенилкетонурию получено 2 ложноотрицательных результата.

Аналогичным образом определены показатели информативности алгоритма: 1) чувствительность – 92%; 2) специфичность – 98%; 3) положительная прогностическая ценность – 97%; 4) отрицательная прогностическая ценность – 94%; 5) положительное отношение правдоподобия – 44; 6) отрицательное отношение правдоподобия – 12.

Сравнительный анализ эффективности существующего и предложенного алгоритмов показал, что метод NGS уступает методу определения фенилаланина по чувствительности - при проведении генетического тестирования в группе детей с подозрением на фенилкетонурию получено 2 ложноотрицательных результата (таблица 8). Это обусловлено ограничениями метода, а также может быть вызвано наличием мутаций в других генах, исследование которых не производилось.

#### **Галактоземия.**

Исследование гена GALT проводилось в группе 514 новорожденных с подозрением на галактоземию. По результатам ДНК-теста у 2 (0,4%) пациентов установлен генотип с двумя патогенными мутациями, приводящими к развитию классической галактоземии, в 512 (99,6%) случаях получен отрицательный результат (таблица 7).

Таблица 7

Результаты использования диагностического алгоритма ГАО1/ГАО2/NGS

Результат алгоритма ГАО1/ГАО2/NGS	Заболевание		Всего
	Есть	Нет	
Положительный результат	2	0	2
Отрицательный результат	0	512	512
Всего	2	512	514

Определение информативности диагностического метода ГАО1/ГАО2/NGS: 1) чувствительность – 75,0%; 2) специфичность – 99,81%; 3) положительная прогностическая ценность – 75%; 4) отрицательная прогностическая ценность – 99,8%; 5) положительное отношение правдоподобия – 385; 6) отрицательное отношение правдоподобия – 4,0.

Исходя из вычисленных значений показателей информативности диагностических методов алгоритма, можно сделать вывод, что существующий протокол диагностики галактоземии при условии положительного результата имеет низкие диагностические показатели. Применение ДНК-диагностики в качестве подтверждающей позволяет минимизировать количество ложных срабатываний теста ГАО2.

Таким образом, проведенный статистический анализ показал превосходство основанного на NGS алгоритма над стандартным алгоритмом неонатального скрининга муковисцидоза, фенилкетонурии и галактоземии за счет достижения высоких значений прогностической ценности положительных результатов и существенного снижения количества ложноположительных результатов (таблица 8).

Таблица 8

Сравнительный анализ эффективности стандартного и предложенного алгоритмов неонатального скрининга моногенных наследственных заболеваний

Показатель	ИРТ1/ИРТ2	ИРТ1/ИРТ2 /NGS	ΦА1/ΦА2	ΦА1/ΦА2 /NGS	ГАО1/ГАО2	ГАО1/ГАО2/NGS
Se	0,94	0,97	0,97	0,92	0,75	0,75
Sp	0,99	1,00	1,0	0,98	1,00	1,00
PPV	0,12	0,98	0,44	0,97	0,006	0,75
NPV	1,00	1,00	1,0	0,94	1,00	1,00
LR[+]	789	227,1	4150	44	289	385
LR[-]	17	0,97	37	12	4	4

***Спектр выявленных генетических вариантов, обуславливающих развитие “мягких” форм моногенных наследственных заболеваний***

***Спектр идентифицированных мутаций в гене CFTR.***

Среди 32 пациентов с положительным результатом при проведении генотипирования методом NGS в 11 случаях (34%) присутствовала хотя бы одна редкая мутация, не входящая в основные российские панели для исследования частых мутаций. Наиболее частая мутация в Кавказской популяции F508del обнаружена в гомозиготном или компаунд-гетерозиготном состоянии в 41 аллели (64,06%) из 64, второй по частоте явилась мутация CFTRdele2,2(21kb) – в компаунд-гетерозиготном состоянии в 5 генотипах (7,81%), третьей – 2143delT – у 4 новорожденных (6,25%) в компаунд-гетерозиготном состоянии. В остальных 14 аллелях представлены редкие мутации, большая часть которых обуславливает развитие легких форм муковисцидоза (таблица 9).

У 18 пациентов с одной патогенной мутацией в генотипе обнаружено 3 аллели (16,67%) с мутацией F508del, 2 аллели (11,11%) с мутацией CFTRdele2,3(12kb), в 13 аллелях обнаружены редкие мутации (p.S1196X, p.359insT, p.574delA, p.3821delT, p.S1253R, p.E217G, p.IVS19-24G>A, p.F1052V, p.W1282R). Полученные результаты демонстрируют широкое генетическое разнообразие обследованной популяции, анализ всей кодирующей последовательности гена CFTR методом NGS секвенирования позволяет выявлять редкие генетические варианты.

Таблица 9

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

Генотип	Количество новорожденных
F508del/F508del	14
F508del/CFTRdele2,3 (21kb)	4
F508del/2143delT	2
3120+1G>A/3120+1G>A	1
CFTRdele2,3 (21kb)/Q98R	1
F508del/1811+1.6kbA>G	1
R1066C/ F508del	1
2143delT/K598X	1
F508del/W1282X	1
R792X/ F508del	1
F508del/R117H	1
F508del/2184insA	1
R334W/2143delT	1
1259insA/1259insA	1
F508del/2721del11	1

*Спектр идентифицированных мутаций в гене PAH.*

Из 32 новорожденных с двумя патогенными мутациями у 21 ребенка (65,6%) обнаружены патогенные аллели, характерные для классической фенилкетонурии (уровень фенилаланина >1200 мкмоль/л), а у 11 (34,4%) выявлены мутации, обуславливающие развитие легкой гиперфенилаланинемии (уровень фенилаланина 153-459 мкмоль/л). В группе обследованных, как и в большинстве европейских популяций, самой распространенной мутаций явилась R408W, которая была обнаружена в 44 из 64 идентифицированных патогенных аллелей (68,75%). В группе новорожденных с диагнозом фенилкетонурии данная аллель встретилась у 22 из 23 новорожденных (95,65%), из них в гомозиготном состоянии – у 15 (65,2%), у 6 (26,1%) – в компаунд-гетерозиготном состоянии с другими мутациями и у 1 пациента (4,35%) в гетерозиготном состоянии (таблица 10).

Таблица 10

Генотипы обследованных новорожденных с диагнозом фенилкетонурия

Генотип	Диагноз	Количество
R408W/R408W	ФКУ	15
R408W/IVS10-11G>A	ФКУ	2
R408W/R261X	ФКУ	1
R408W/R252W	ФКУ	2
R408W/IVS12+1G>A	ФКУ	1
R408W/n	ФКУ	1
n/n	ФКУ	1

Среди 11 новорожденных с диагнозом гиперфенилаланинемии из 22 патогенных аллелей в 5 выявлена мутация p.R408W (22,7%), а остальные 17 (77,2%) были представлены редкими мутациями, идентификация которых возможна только при расширенном тестировании гена PAH (рисунок 5).

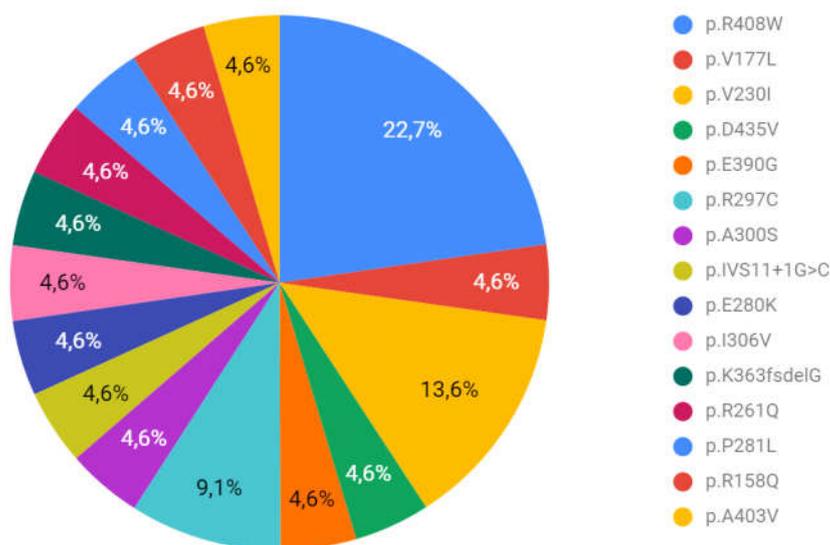


Рисунок 5. Генотипы обследованных новорожденных с диагнозом гиперфенилаланиемии.

Применение алгоритма ФА1/ФА2/NGS в неонатальном скрининге на фенилкетонурию позволяет выявлять мутации различного функционального типа, в том числе и «мягкие» генотипы, обуславливающие развитие легкой гиперфенилаланиемии, при которых пациентам не требуется назначение лечебного питания.

*Спектр идентифицированных мутаций в гене GALT.*

При анализе гена GALT в группе новорожденных с повышенным уровнем ГАО2 (514) патогенные мутации выявлены в 164 аллелях: у 67 пациентов (134 аллели) обнаружены две патогенные мутации и у 30 пациентов установлен статус носительства (30 аллелей).

Из 67 генотипов, содержащих две патогенные аллели, в 2 (3%) выявлены патогенные мутации, характерные для классической галактоземии (G/G); в 30 (44,8%) - обнаружены мутации галактоземии Дуарте и классической галактоземии в компаунд-гетерозиготном состоянии (G/N); в 35 (52,2%) - мутации варианта Дуарте в гомозиготном состоянии (D/D) (рисунок 6).

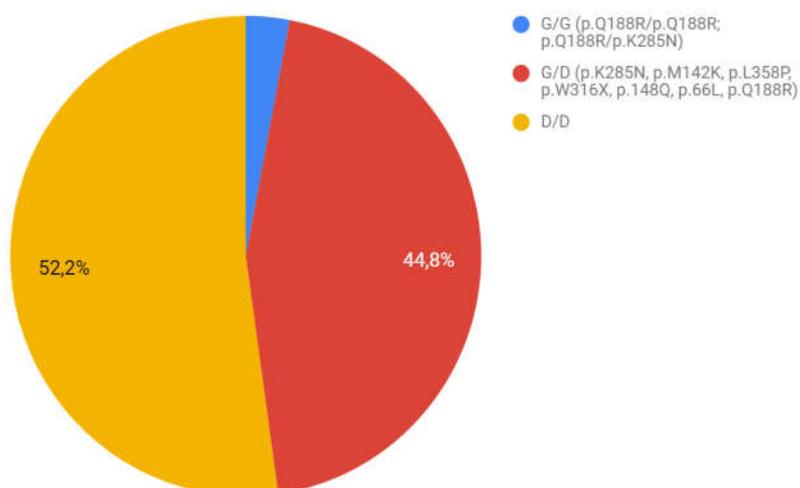


Рисунок 6. Генотипы новорожденных, обследованных на галактоземию, с двумя патогенными мутациями в гене GALT (n=67).

Самой распространенной мутацией, характерной для классической галактоземии, в европейской популяции является p.Q188R. В нашем исследовании данная мутация также явилась самой частой и идентифицирована в 32 (51,6%) генотипах из 62: у обоих пациентов (100%) с генотипом G/G, у 13 новорожденных (43,3%) с генотипом G/D и в 19 случаях (63,3%) гетерозиготного носительства патогенной мутации (G/N). Данные о частоте встречаемости мутации p.Q188R в выборке новорожденных, обследованных на галактоземию, представлены на рисунке 7.

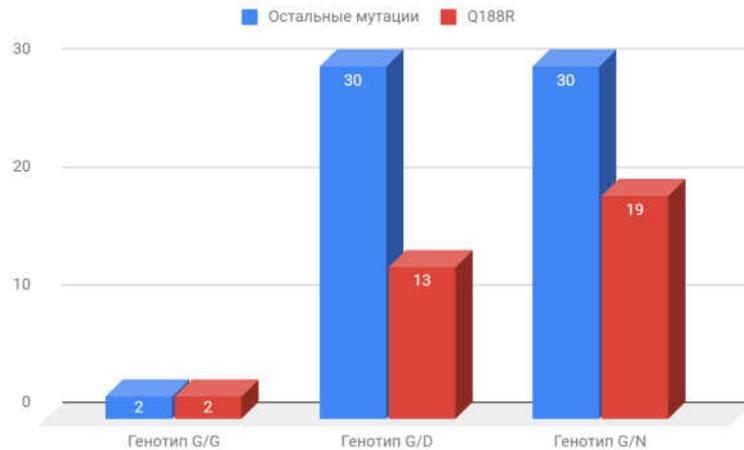


Рисунок 7. Частота встречаемости мутации p.Q188R в выборке новорожденных с мутациями, характерными для классической галактоземии (n=62).

Второй по частоте встречаемости в нашем исследовании явилась мутация p.K285N, которая обнаружена у 11 (17,7%) из 62 новорожденных с аллелями, содержащими мутации классической галактоземии. В остальных генотипах обнаружены более редкие генетические варианты в гене GALT: p.M142K, p.IVS3-2A>G, p.L358P, p.P66L, p.D28N, p.W316X, p.R148Q (рисунок 8).

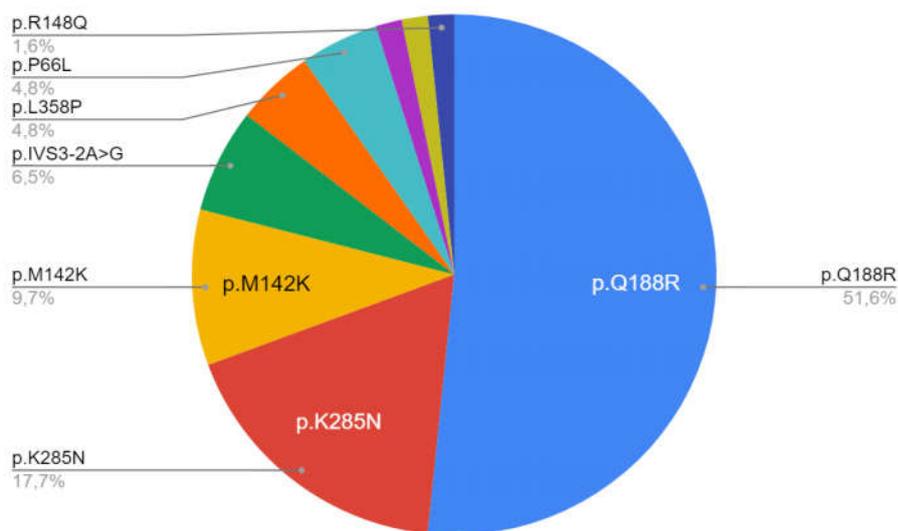


Рисунок 8. Спектр и частота встречаемости мутаций новорожденных с мутациями, характерными для классической галактоземии G/N (n=62).

Спектр обнаруженных мутаций в выборке новорожденных с повышенным уровнем общей галактозы, наряду с наиболее частыми мутациями (p.Q188R, p.K285N, p.M142K), включает редкие генетические варианты (21%), не входящие в российские диагностические панели.

Таким образом, с использованием NGS-секвенирования гена GALT удалось подтвердить диагноз классической галактоземии лишь у 2 (0,4%) новорожденных из 514 с повышенным уровнем общей галактозы. В 18 % случаев (95 новорожденных из 514) повышение уровня общей галактозы в крови связано с гетерозиготным носительством мутантных аллелей гена GALT, а также аллелей, характерных для биохимической формы галактоземии Дуарте. Доброкачественные варианты галактоземии (варианты Дуарте) приводят к повышению уровня общей галактозы в крови новорожденных, определение которых позволяет исключить тяжелые формы галактоземии. В 80% случаев (417 из 514) ложноположительные результаты, получены в результате неспецифичности биохимического маркера галактоземии. Это подчеркивает необходимость проведения молекулярно-генетической диагностики для подтверждающей диагностики неонатального скрининга галактоземии.

## ВЫВОДЫ

1. Используемые биохимические тесты для скрининга фенилкетонурии, муковисцидоза и галактоземии имеют высокие показатели чувствительности и специфичности, обеспечивающие отсутствие ложноотрицательных результатов при массовом обследовании новорожденных.

2. Низкая распространенность указанных заболеваний в популяции приводит к получению неудовлетворительных значений положительной прогностической ценности скрининговых биохимических тестов, что обуславливает высокий процент ложноположительных результатов: 88% при скрининге муковисцидоза; 56% - фенилкетонурии и 99% - галактоземии.

3. Оптимальная точка отсечения концентрации иммунореактивного трипсиногена при проведении первичного тестирования на муковисцидоз соответствует пороговому значению, предусмотренному стандартным протоколом. Фактором, существенно изменяющим результаты повторного тестирования и снижающим диагностическую ценность скрининга в целом, является нарушение контрольных сроков забора крови для проведения ретеста.

4. Включение таргетного геномного высокопроизводительного секвенирования NGS в стандартный алгоритм неонатального скрининга на муковисцидоз, фенилкетонурию и галактоземию в качестве теста второго уровня позволяет достичь 97% прогностической ценности положительных результатов, что существенно повышает эффективность диагностики моногенных наследственных болезней обмена.

5. Использование высокопроизводительного секвенирования для анализа всей последовательности генов CFTR и PАН в неонатальном скрининге позволяет идентифицировать генотипы, обуславливающие развитие более легких форм заболеваний, которые представляют особые трудности для диагностики муковисцидоза и фенилкетонурии.

6. Гетерозиготное носительство мутантных аллелей и аллелей биохимической формы галактоземии Дуарте в сочетании с низкой распространенностью классической галактоземии в популяции обуславливает получение более 90 % ложноположительных результатов биохимического скрининга.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

Результаты проведенного исследования позволяют сформулировать практические рекомендации для врачей клинической лабораторной диагностики, генетиков, педиатров, неонатологов.

1. С целью своевременного выявления больных детей на досимптоматическом этапе необходимо внедрение в учреждения практического здравоохранения современных методов ДНК-диагностики в качестве подтверждающего этапа скрининга.

2. Для снижения количества ложноположительных результатов биохимического скрининга муковисцидоза необходимо проведение организационных мероприятий с детскими лечебно-профилактическими учреждениями по соблюдению сроков забора крови для ретеста ИРТ.

3. Учитывая тот факт, что существующий протокол диагностики галактоземии при условии положительного результата имеет низкие диагностические показатели, необходим пересмотр пороговых значений теста ГАО.

4. Полученные данные генотипирования у носителей патогенных аллелей в генах PAH, CFTR и GALT рекомендованы для использования при медико-генетическом консультировании семей для будущего потомства.

## **ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Последующее развитие темы исследования связано с разработкой и апробацией панели для секвенирования трех групп наследственных болезней обмена: аминокислотопатий, органических ацидурий и дефектов митохондриального  $\beta$ -окисления жирных кислот, с целью подтверждающей диагностики проводимого селективного скрининга новорожденных указанных заболеваний. В дальнейшем научно-обоснованные уточнения применения NGS в диагностике болезней обмена необходимо выполнить для других нозологий, включенных в Приказ Министерства здравоохранения РФ от 21 апреля 2022 г. № 274н "Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи пациентам с врожденными и (или) наследственными заболеваниями".

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

**Статьи в научных журналах и изданиях, входящих в перечень рецензируемых Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки РФ для опубликования основных результатов диссертационных исследований**

1. Чурюмова Ю.А. Совершенствование алгоритма неонатального скрининга на наследственные болезни обмена с помощью технологии секвенирования следующего поколения / Ю.А. Чурюмова, Т.В. Вавилова, Н.В., Вохмянина // Лабораторная служба. – 2017. – Т.6, № 3. – С.190–198.

2. Чурюмова Ю.А. Использование новых технологий диагностики для выявления наследственных болезней обмена / Ю.А. Чурюмова, Н.В. Вохмянина // Медицинская генетика. – 2017. – Т. 16, № 10. – С.18–22.

3. Чурюмова Ю.А. Молекулярно-генетическая диагностика в неонатальном скрининге аутосомно-рецессивных наследственных болезней обмена с применением таргетного секвенирования / Ю.А. Чурюмова, О.В. Калинина, Т.В. Вавилова // Лабораторная служба. – 2022. – Т.11, №3. – С.8-16.

**Статьи, тезисы докладов в материалах конференций**

4. Чурюмова Ю.А., Диагностическое значение NGS секвенирования в неонатальном скрининге муковисцидоза, фенилкетонурии и галактоземии в Санкт-Петербурге / Ю.А. Чурюмова, А.Ю. Морозова, Н.В. Вохмянина // Сборник материалов Международной научной конференции Научного Парка СПбГУ «Трансляционная биомедицина: современные методы междисциплинарных исследований в аспекте внедрения в практическую медицину». – СПб: Изд-во: Санкт-Петербургский государственный университет, 2015. – С.114–115.
5. Чурюмова Ю.А. Результаты применения NGS секвенирования в ранней диагностике муковисцидоза, фенилкетонурии и галактоземии в Санкт-Петербурге / Ю.А. Чурюмова, А.Ю. Морозова, Н.В. Вохмянина // Сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции «NGS в медицинской генетике». – Суздаль, 2016. – С.30.
6. Чурюмова Ю.А. Анализ спектра мутаций в гене PAH методом NGS у новорожденных с положительными результатами неонатального скрининга на фенилкетонурию / Ю.А. Чурюмова // Сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции «NGS в медицинской генетике». – Суздаль, 2017. – С.41.
7. Чурюмова Ю.А. Диагностическая эффективность применения NGS-секвенирования в алгоритме неонатального скрининга / Ю.А. Чурюмова, Т.В. Вавилова // Медицинский алфавит. – 2018. – Т. 2, № 19 (356). – С. 15–16.
8. Чурюмова Ю.А. Таргетное высокопроизводительное секвенирование в качестве теста второго уровня неонатального скрининга / Ю.А. Чурюмова, Т.В. Вавилова // Сборник материалов IV Общероссийской конференции с международным участием «Перинатальная медицина: от прегравидарной подготовки к здоровому материнству и детству». – Санкт-Петербург, 2018. – С.86.
9. Чурюмова Ю.А. Молекулярно-генетическая диагностика моногенных заболеваний в неонатальном скрининге / Ю.А. Чурюмова, Т.В. Вавилова // Сборник материалов Всероссийской молодежной медицинской конференции «Алмазовские чтения — 2018». – Санкт-Петербург, 2018. – С.109.
10. Simakova T. Inborn Errors of Metabolism (IEM) - analytical validation of NGS assays for confirmative diagnostics / T. Simakova, M. Glushkova, A. Slepchenkov, Y. Churyumova, [et al.] // Abstracts of the European Human Genetics Conference Gothenburg. – Sweden. – 2019. – P.14.
11. Чурюмова Ю.А. Современные диагностические возможности выявления наследственных болезней обмена. Разбор клинических случаев / Ю.А. Чурюмова, Н.В. Вохмянина, Л.В. Лязина [и др.] // Сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции по медицинской генетике с международным участием «Современные подходы и перспективы в оказании медицинской помощи больным с врожденными и наследственными заболеваниями». – СПб: Феникс, 2019. – С.177–187.
12. Чурюмова Ю.А. Новый интегрированный протокол неонатального скрининга для подтверждения наследственных болезней обмена / Ю.А. Чурюмова, Н.В. Вохмянина // Сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции по медицинской генетике с международным участием «Современные подходы и перспективы в оказании медицинской помощи больным с врожденными и наследственными заболеваниями». – СПб: Феникс, 2019. – С.188–194.
13. Шляга С.В. Расширение диагностических возможностей неонатального селективного скрининга наследственных болезней обмена при помощи секвенирования нового поколения. Описание клинических случаев / С.В. Шляга, Ю.А. Чурюмова, Н.В. Вохмянина [и др.] // Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике. – Новосибирск : Академиздат, 2019. – С. 137–146.

### Список сокращений

АГС – адреногенитальный синдром

ГАО – общая галактоза

ИРТ – иммунореактивный трипсиноген

НБО – наследственные болезни обмена

НС – неонатальный скрининг

ОПЦ - отрицательная прогностическая ценность

ППЦ - положительная прогностическая ценность

ФА – фенилаланин

AUC – площадь под ROC-кривой

LR [+] – отношение правдоподобий для позитивов

LR [-] – отношение правдоподобий для негативов

NGS (от англ. «next generation sequencing») – высокопроизводительное секвенирование ДНК

NPV – предсказательность негативов

PPV – предсказательность позитивов

Se – чувствительность

Sp – специфичность

TAT (от англ. «turn-around time») – время оборота теста

TNGS (от англ. «targeted next generation sequencing») – таргетное высокопроизводительное секвенирование ДНК

WES (от англ. «whole exome sequencing») – полноэкзомное секвенирование ДНК

WGS (от англ. «whole genome sequencing») – полногеномное секвенирование ДНК.