

На правах рукописи

Донников Максим Юрьевич

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ
МУКОВИСЦИДОЗА У ДЕТЕЙ НА РЕГИОНАЛЬНОМ УРОВНЕ
(НА ПРИМЕРЕ ХМАО-ЮГРЫ)**

14.01.08 – педиатрия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Пермь – 2020

Работа выполнена в бюджетном учреждении высшего образования Ханты-Мансийского автономного округа – Югры «Сургутский государственный университет» (ректор – доктор педагогических наук, профессор С.М. Косенок)

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Мещеряков Виталий Витальевич

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, доцент,
проректор по учебной работе,
заведующая кафедрой госпитальной
педиатрии ФГБОУ ВО ОмГМУ
Минздрава России (г. Омск)

Павлинова Елена Борисовна

доктор медицинских наук,
главный научный сотрудник,
заведующая отделением пульмонологии
ФГАУ «НМИЦ здоровья детей»
Минздрава России (г. Москва)

Симонова Ольга Игоревна

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится: « » _____ 2020 г. в 10:00 на заседании диссертационного совета Д 208.067.02 при ФГБОУ ВО ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России (614000, г. Пермь, ул. Петропавловская, 26).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России по адресу: 614000, г. Пермь, ул. Петропавловская, 26, с авторефератом – на сайтах <http://www.psma.ru/> и <http://www.vak.minobrnauki.gov.ru/>

Автореферат разослан « » _____ 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, доцент

Карпунина Наталья Сергеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Муковисцидоз (МВ) – самое частое аутосомно-рецессивное заболевание человека [Е.И. Кондратьева, Н.И. Капранов, 2018; С.А. Красовский и соавт., 2019]. С распространением неонатального скрининга (НС) диагностика МВ становится пресимптоматической [P.M. Farrell et al., 2017], что во многом определяет раннее начало терапии, предупреждает развитие тяжелых осложнений и улучшает прогноз [G. Tridello et al., 2018]. Одной из актуальных проблем НС считается высокое число ложноположительных результатов [З.А. Кусова, 2011; V.L. Therell et al., 2012], что определяет необходимость совершенствования подходов к оценке результатов НС. Прогресс в клинико-лабораторных и генетических технологиях [M. Le Gallo et al., 2017] обеспечивает формирование и накопление специализированных международных баз данных, содержащих генетическую, фенотипическую, клиническую информацию о МВ [P.R. Sosnay et al., 2017]. Создание национальных регистров пациентов с МВ [Е.И. Кондратьева, Н.А. Ильенкова и соавт., 2018] имеет важное практическое значение в улучшении организации специализированной помощи при МВ [И.К. Ашерова, 2012; Н.И. Капранов, 2014; Е.Б. Павлинова, 2018]. Использование новых препаратов таргетной терапии МВ требует точного и быстрого определения мутаций в гене *CFTR* [Е.И. Кондратьева, 2018; M. Narutyunyan M et al., 2018]. В связи с этим актуальными являются вопросы генной диагностики с целью планирования более адекватного лечения [G. Cabrini, 2019]. В настоящее время известно более 2 000 мутаций гена *CFTR* [Н.В. Петрова и соавт., 2019], причем их спектры обладают выраженной популяционной специфичностью, что затрудняет генную диагностику МВ в гетерогенных популяциях [Н.В. Петрова и соавт., 2019], типичным примером которых является население ХМАО-Югры.

Степень разработанности темы

Знание эпидемиологии МВ важно для рационального планирования ресурсов здравоохранения по оказанию медицинской помощи пациентам на конкретной территории [A.D. Jackson et al., 2018]. Научное обобщение эпидемиологических данных по МВ у детей в ХМАО-Югре отсутствует. С начала проведения НС врачи курируют две группы пациентов – с НС и без НС. Ранняя диагностика МВ на основе массового внедрения НС не может не отразиться на особенностях течения заболевания и подходах к его терапии. В литературе отсутствуют данные о сравнительном анализе таких особенностей в группах с НС и без НС.

В РФ используется протокол НС в виде двукратного определения уровней иммунореактивного трипсиногена (ИРТ) [З.А. Кусова, 2011]. В РФ у 1 новорождённого из 100 - 200 регистрируется повышенный уровень иммунореактивного трипсиногена с высоким уровнем ложноположительных результатов [С.А. Красовский и соавт., 2019]. Данные об эффективности НС в ХМАО-Югре отсутствуют. В русскоязычной научной литературе приведены только практические результаты НС МВ без обсуждения подходов, позволяющих оптимизировать общепринятый протокол оценки НС [З.А. Кусова, 2011], например, в вопросе использования локальных референсных величин и пороговых уровней ИРТ.

Необходимость постановки полного генетического диагноза ограничивается возможностями лабораторий на местах, что определяет необходимость внедрения доступного для региональных условий метода генной диагностики. Таковым может быть анализ кривых плавления высокого разрешения (англ. high resolution melting analysis, HRMA) на первом этапе генной диагностики МВ [M.P. Audrezet et al., 2008; P. Krenkova et al., 2009], однако в РФ он не внедрён в практику.

Цель исследования

Повышение качества оказания медицинской помощи детям с муковисцидозом на основе исследования особенностей течения болезни в условиях массового неонатального скрининга и оптимизации ранней диагностики заболевания на региональном уровне.

Задачи исследования

1. Исследовать эпидемиологические особенности муковисцидоза у детей на территории ХМАО-Югры по данным регионального регистра за период 2012 - 2018 г.г.

2. Представить клинический анализ когорты пациентов с муковисцидозом в ХМАО-Югре по данным регистра в динамике за период с 2012 по 2018 г.г. в условиях массового внедрения неонатального скрининга этого заболевания.

3. Исследовать клинические особенности течения муковисцидоза у детей при ранней диагностике заболевания на основе внедрения его неонатального скрининга.

4. Усовершенствовать оценку результатов неонатального скрининга на основе разработки метода «плавающих» референсных значений иммунореактивного трипсиногена в популяции новорождённых ХМАО-Югры и оценить эффективность метода.

5. Оценить эффективность внедрения метода «анализа кривых плавления» на первом этапе молекулярно-генетической диагностики муковисцидоза у детей в условиях региональной медико-генетической консультации и представить структуру генных мутаций в популяции больных на территории ХМАО-Югры.

Положения, выносимые на защиту

1. Многолетний анализ регионального регистра пациентов с МВ позволяет установить эпидемиологические и клинические особенности заболевания в динамике в условиях массового внедрения НС.

2. Ранняя диагностика МВ на основе внедрения неонатального скрининга и своевременно начатая базисная терапия определяют клинический патоморфоз заболевания, характеризующийся более благоприятным течением болезни.

3. Разработка региональных референсных значений иммунореактивного трипсиногена на основе метода определения его «плавающего» порогового уровня и внедрение метода анализа кривых плавления на первом этапе молекулярно-генетической диагностики муковисцидоза позволяют повысить качество неонатального скрининга и обеспечить полную генную диагностику в абсолютном большинстве случаев в региональных условиях.

Научная новизна работы

Установлены эпидемиологические особенности МВ на территории ХМАО-Югры. Доказано, что высокая распространённость МВ у детей связана с эффектом «накопления» больных на фоне высокого уровня рождаемости, установлены прямые связи между распространённостью МВ, уровнем рождаемости и удельным весом детского населения в общей популяции.

Установлено, что когорта детей с муковисцидозом на территории ХМАО-Югры характеризуется ростом абсолютного числа больных, удельного веса пациентов с неонатальным скринингом и статистически значимым увеличением среднего возраста пациентов за период ведения регионального регистра. Клинические особенности течения муковисцидоза определяются сочетанным влиянием двух факторов – возраста ребёнка при постановке диагноза и длительностью заболевания.

Установлено, что ранняя диагностика на основе внедрения массового неонатального скрининга и своевременно начатая базисная терапия муковисцидоза способствуют более благоприятному течению заболевания.

Установлены чувствительность (100,0 %) и специфичность (98,1 %) неонатального скрининга муковисцидоза на территории ХМАО-Югры при использовании стандартных пороговых значений иммунореактивного трипсиногена, рекомендованных изготовителем реактивов для данного исследования.

Установлены региональные пороговые значения иммунореактивного трипсиногена для популяции новорождённых детей ХМАО-Югры на основе разработки метода «плавающих» референсных его значений. Показано, что внедрение разработанного метода позволяет повысить специфичность неонатального скрининга до 99,6 % и сохранить его чувствительность на уровне 100 %.

Впервые в Российской Федерации установлены специфичность (100 %) и чувствительность (97,3 %) метода анализа кривых плавления на первом этапе молекулярно-генетической диагностики МВ. Метод не позволяет выявить протяженные гетерозиготные делеции/инсерции и сложные перестройки в гене *CFTR*, что требует проведения методики MLPA.

Впервые установлена структура мутаций в гене *CFTR* в популяции пациентов с этим заболеванием в региональных условиях ХМАО-Югры.

Теоретическая и практическая значимость работы

Определены основные проявления клинического патоморфоза МВ у детей при своевременно начатой базисной терапии в условиях ранней диагностики заболевания на основе массового внедрения его НС.

Установленные региональные для ХМАО-Югры эпидемиологические показатели при МВ могут быть использованы при планировании ресурсов здравоохранения для оказания медицинской помощи этому контингенту больных.

Установленные клинические особенности течения МВ в группах детей с ранней диагностикой заболевания на основе НС и без НС с более поздней постановкой диагноза определяют необходимость дифференцированного подхода при организации лечебно-профилактических мероприятий пациентам.

Использование разработанного метода «плавающих» референсных значений иммунореактивного трипсиногена позволяет уменьшить количество ложноположительных результатов и сократить тем самым затраты на дальнейшее обследование на муковисцидоз (потовый тест, молекулярная диагностика), внедрение метода анализа кривых плавления на первом этапе молекулярно-генетической диагностики позволяет сократить время и материальные затраты на проведение исследования и в большинстве случаев установить тип мутации в гене *CFTR* в лаборатории регионального уровня.

Связь работы с научными программами

Настоящее исследование проводилось в рамках реализации государственного задания «Генетические аспекты предиктивной, превентивной и персонализированной медицины наследственных и возраст-ассоциированных заболеваний у человека на Севере» (руководитель – д.м.н., проф. В.В. Мещеряков). Исследования были одобрены локальным этическим комитетом Сургутского государственного университета.

Соответствие работы паспорту специальности

В диссертационной работе были определены клинические особенности течения МВ при ранней его диагностике на основе массового внедрения НС,

усовершенствована интерпретация результатов НС и проведена оценка эффективности внедрения метода анализа кривых плавления на первом этапе генной диагностики МВ в региональных условиях, что соответствует паспорту специальности 14.01.08 – педиатрия (п. 3 – физиология и патология детей периода новорожденности, раннего, дошкольного и школьного возраста; п 5 – клиника, диагностика и лечение врождённых и наследственных болезней).

Апробация работы

Основные результаты работы были представлены в виде докладов и опубликованы в виде тезисов на XII, XIII, XIV Национальных конгрессах «Актуальные проблемы муковисцидоза» (Москва, 22-24 апреля 2015 г., Сергиев Посад, 27-28 апреля 2017 г., Красноярск, 25-26 апреля 2019 г.); на VII Конгрессе педиатров стран СНГ «Ребенок и общество: проблемы здоровья, развития и питания» (Сочи, 23-24 октября 2015 г.); на XVI, XVIII Национальных конгрессах «Инновационные технологии в педиатрии и детской хирургии» (Москва, 24-26 октября 2017 г.; 22-24 октября 2019 г.); на XX, XXI Конгрессах педиатров России с международным участием «Актуальные проблемы педиатрии» (Москва, 16-18 февраля 2018 г., 15-17 февраля 2019 г.); на 41-й конференции Европейского общества по муковисцидозу (European Cystic Fibrosis Society, ECFS; Белград (Сербия); 06-10 июня 2018 г.); на II, III, IV Всероссийских научно-практических конференциях «Фундаментальные и прикладные проблемы здоровьесбережения человека на севере» (Сургут, 21 октября 2017 г., 20-21 октября 2018 г., 25 октября 2019 г.); на 52-й конференции Европейского общества генетики человека (European Society of Human Genetics, ESHG), г. Стокгольм (Швеция), 15-18 июня 2019 г.

Личный вклад автора

Тема диссертационной работы выбрана соискателем совместно с научным руководителем. Автор анализировал литературные источники по теме диссертации. Личное участие автора заключалось в наборе материала: выкопировка данных из учётной медицинской документации (журналы регистрации анализов и их результатов на НС – учётная форма №250/у; медико-генетическая карта больного – учётная форма 003/у), динамическое наблюдение за детьми, включенными в группы исследования, с проведением клинического и интерпретацией функционального, биохимического и молекулярно-генетического обследования.

Автор владеет методиками, которые использовались в исследовании: биохимический неонатальный скрининг, HRM-анализ, секвенирование по Сэнгеру. Диссертант самостоятельно проводил их и анализировал результаты. Автор самостоятельно провёл математическую обработку материала, написал диссертацию и подготовил автореферат. Доля личного участия соискателя в совместных публикациях превышает 90%.

Реализация результатов исследования

Результаты научного исследования внедрены в практику работы медико-генетической консультации БУ ХМАО-Югры «Окружной кардиологический диспансер «Центр диагностики и сердечно-сосудистой хирургии» (628416, г. Сургут, пр. Ленина, 69/1) и в учебный процесс на кафедре детских болезней медицинского института БУ ВО «Сургутский государственный университет» (628412, г. Сургут, пр. Ленина, 1).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 18 печатных работ, в том числе 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикации материалов докторских и

кандидатских диссертаций, 5 статей в изданиях базы данных Scopus. Получено одно Свидетельство РФ на программу ЭВМ.

Структура и объем работы

Диссертация написана в традиционном стиле и состоит из титульного листа, оглавления, введения, обзора литературы, главы, посвященной материалам и методам, используемым в ходе исследования; третьей, четвертой и пятой глав, в которых представлены собственно результаты диссертации; шестой главы, содержащей обсуждение полученных результатов, выводы и практические рекомендации. В конце работы находится список сокращений и приложение. Общий объем диссертационного исследования составляет 134 страницы машинописного текста. В списке литературы автор проанализировал 237 научных источников, 185 из которых – иностранных авторов. Иллюстративный материал диссертационного исследования включает 13 таблиц и 18 рисунков.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал, методы и дизайн исследования

Работа выполнена на кафедре детских болезней (заведующий – д.м.н., проф. В.В. Мещеряков) медицинского института (директор – Почётный работник высшего профессионального образования РФ, д.м.н., проф. Л.В. Коваленко) БУ ВО «Сургутский государственный университет» (ректор – Засл. Учитель РФ, д.п.н., проф. С.М. Косенок). Набор материала осуществлялся в медико-генетической консультации БУ ХМАО-Югры «Окружной кардиологический диспансер «Центр диагностики и сердечно-сосудистой хирургии» (гл. врач – к.м.н., доц. И.А. Урванцева), педиатрическом отделении № 2 БУ «Сургутская клиническая городская больница» (гл. врач – к.м.н. М.С. Курносиков), в БУ «Нижевартовская окружная детская клиническая больница» (главный врач – О.Р. Юлдашев).

Настоящее исследование является прикладным. Исследование включало общие методы эмпирического исследования (наблюдение, описание, измерение, сравнение), специальные (клинические, лабораторные, функциональные) и статистические методы. Организация исследования проведена в соответствии с требованиями клинической эпидемиологии как составляющей доказательной медицины. Исследование проведено в 3 этапа. Дизайн исследования представлен на рис. 1.

На первом этапе для решения первых трех задач настоящей работы проведено сплошное когортное ретроспективное исследование – анализ клинко-эпидемиологических показателей МВ на территории ХМАО-Югры за период ведения регистра заболевания (2012-18 г.г.). Критерием включения явились все случаи установленного диагноза МВ в 2012-18 г.г., вошедшие в региональный регистр. Оценивалась динамика заболеваемости, распространённости, смертности, среднемноголетние уровни этих показателей и их прирост (убыль), динамика гендерно-возрастной структуры, среднего возраста пациентов и среднего возраста постановки диагноза с 2012 до 2018 г.г. Анализу подвергались также клинко-лабораторные и функциональные параметры двух групп наблюдения – детей с МВ с НС и без него. В связи с очевидным влиянием стажа заболевания на его течение, более старшим возрастом детей без НС, по сравнению с его наличием, в регистре 2018 года, проведена стандартизация групп сравнения по возрасту. Минимальный возраст в группах был определён по группе без НС: в 2012 г. (первый год ведения регистра) самыми младшими были больные, рождённые в первой половине 2006 года, возраст которых в 2012 году составил 6 лет. Максимальный возраст в группах

сравнения был выбран по когорте детей с МВ с НС: в 2018 году максимальный возраст 12 лет имели дети с МВ, рождённые во второй половине 2006 года (начало НС). Исходя из этого принципа в группу детей с МВ без НС вошли 11 пациентов 6-12 лет (даты рождения: 01.01.2000 – 31.05.2006) из регистра 2012 года, в группу с НС – 16 детей того же возраста (даты рождения: 01.06.2006 – 31.12.2012) из регистра 2018 года. Анализировались клинические, лабораторные и функциональные показатели больных, полученные путём выкопировки данных из регистра 2012 и 2018 г.г. и историй болезней пациентов.

На втором этапе для решения 4-й задачи проведено сплошное ретроспективно-проспективное когортное исследование, в которое на этапе оценки эффективности НС МВ и определения ППУ ИРТ включались результаты всех новорожденных детей на территории ХМАО-Югры с 2006 по 2017 гг. (ретроспективная часть) и результаты НС МВ за 2018-2019 гг. (проверочный этап исследования, проспективная часть). Уровни ИРТ измеряли с помощью коммерческих наборов AutoDelfia/Delfia Neonatal IRT kits (Perkin-Elmer, Финляндия). Статистическая обработка данных (подсчет числа ложноположительных результатов, общего количества исследований за каждый исследуемый промежуток времени) проводилась в программе MS Office Excel. Расчет плавающего порогового уровня (ППУ) на уровне 99,5 перцентиля для всех подтвержденных с помощью НС случаев МВ в ХМАО-Югре (n=32, период 2006 – 2017 гг.) проводился с использованием программы fIRT (floating level of IRT), разработанной совместно с IT-специалистами БУ ВО «Сургутский государственный университет». Во время проспективного этапа исследования результатов НС МВ в период 2018-2019 гг. использовали в сравнении оба подхода – стандартный (с фиксированным ПУ ИРТ-1 на уровне 57,8 нг/мл) и инновационный (с ППУ), при котором наполнение выборки данных (не менее 1 000 образцов с данными ИРТ-1) динамично менялось каждый рабочий день по принципу «скользящего окна».

На третьем этапе для решения 5-й задачи для верификации применимости последовательно выполняемых молекулярно-генетических методик (анализ кривых плавления высокого разрешения (HRMA) и классическое секвенирование по Сэнгеру) с целью оптимизации генной диагностики в условиях региональной лаборатории (расширение спектра мутаций) было проведено сплошное когортное одномоментное исследование 43 контрольных образцов геномной ДНК (гДНК) с известными мутациями. В группу вошли 38 образцов гДНК, выделенных из образцов периферической венозной крови пациентов с подтвержденным диагнозом МВ и выявленными мутациями в гене *CFTR*, и 5 образцов гДНК от здоровых доноров.

Для проведения расширенной генной диагностики мутаций в гене *CFTR* для всей группы пациентов окружного регистра в количестве 54 человек с подтвержденным диагнозом МВ использовали периферическую венозную кровь, отобранную в вакуэтты с ЭДТА.

Геномную ДНК выделяли из образцов цельной периферической крови и сухих пятен крови на бланках НС методом колоночной экстракции. ПЦР с последующим HRM-анализом проводились в соответствии с протоколом [M.P. Audrezet et al., 2008] и рекомендациями производителя набора для HRM “Precision Melt Supermix” (Bio-Rad, США) на термоциклере “CFX96” (Bio-Rad, США) с опцией контролируемого плавления. Для обработки результатов HRMA использовалось программное обеспечение “Precision Melt Analysis Software” (Bio-Rad, США). Секвенирование отдельных экзонов гена *CFTR* и MLPA выполняли на генетическом анализаторе “GenomeLab GeXP” (Beckman-Coulter, США).

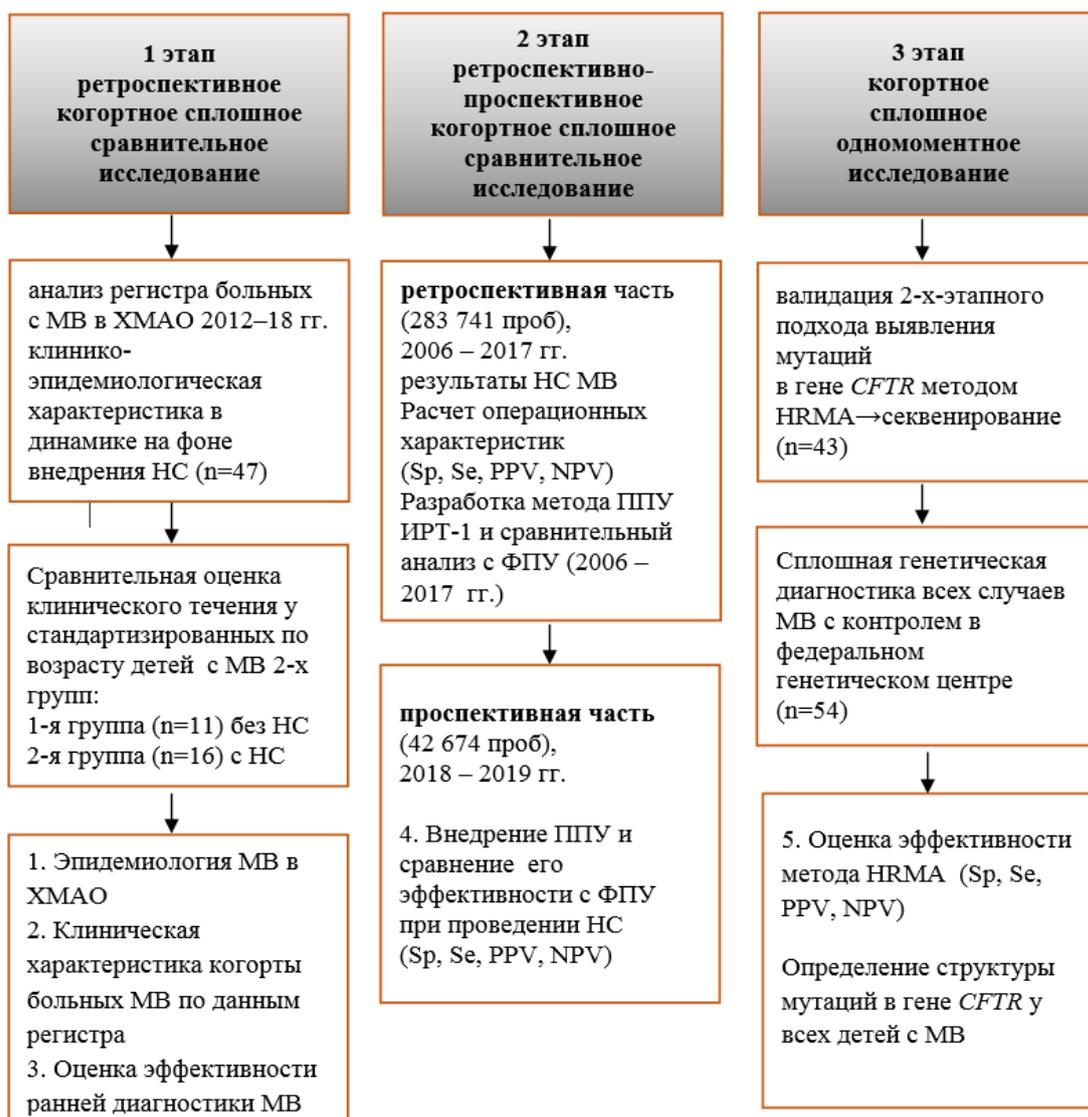


Рис. 1. Дизайн исследования

Статистическая обработка материала осуществлялась с использованием современных принципов математического анализа медико-биологических исследований [С. Гланц С, 1999] в лицензионной программе Statistica 10.0. В связи с несоответствием большинства числовых совокупностей принципу нормальности их распределения, в работе применялись непараметрические методы медико-биологической статистики; характеристика вариационного ряда представлялась как Me ($Q1$ - $Q3$), где Me – медиана, $Q1$ и $Q3$ – нижний и верхний (первый и третий) квартили; статистическая значимость различий показателей, выраженных долей от целого в двух сравниваемых группах исследовалась методом углового преобразования Фишера; статистическая значимость различий средних величин в группах сравнения определялась методом Манна-Уитни; связи между количественными показателями устанавливали методом ранговой корреляции Спирмена. Критическое значение уровня статистической значимости при проверке нулевых гипотез принималось равным 0,05 во всех случаях.

Диагностическую эффективность метода HRMA и fIRT (floating IRT) оценивали расчётом операционных характеристик диагностического теста – чувствительности (Se) и специфичности (Sp), прогностической ценности положительного (PPV) и отрицательного (NPV) результата.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эпидемиологические особенности МВ у детей ХМАО-Югры по данным регионального регистра в период с 2012 по 2018 г.г.

В таблице 1 представлены основные эпидемиологические показатели МВ в ХМАО-Югре за 7-летний период с 2012 по 2018 г.г. Обращает на себя внимание факт значительных колебаний частоты рождения детей с МВ в разрезе каждого года (от 0,0 в 2014 до 1-го случая на 5 560 живорождённых в 2012 г.). Вероятно, это связано с относительно малым числом новорождённых на отдельно взятой территории и редкостью самого заболевания.

Таблица 1

Эпидемиология МВ в ХМАО-Югре в 2012-2018 г.г.

Показатели	Годы							Средне-многолетний показатель
	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	
Число пациентов с МВ	42	42	39	49	54	57	57	48,6
Число вновь выявленных случаев	5	2	0	4	3	3	3	2,9
Число умерших	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,14
Численность населения (тыс. чел.)	1 573	1 591	1 605	1 619	1 636	1 651	1 662	1 620
Число новорождённых (тыс. чел.)	27,8	27,8	27,7	26,9	25,6	23,3	23,2	26,0
Распространённость на 100 000 населения	2,67	2,64	2,43	3,03	3,30	3,45	3,43	3,00
Заболееваемость на 100 000	0,32	0,13	0,00	0,25	0,18	0,18	0,18	0,18
Частота (1 случай МВ на кол-во новорождённых)	5 560	13 900	0, 00	6 725	8 533	7 767	7 733	9 025
Смертность на 100 000 населения	0,064	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,009

Это обосновывает необходимость расчёта среднемноголетнего показателя, который за период ведения регистра (2012-18 г.г.) составил 1 случай на 9 025 новорождённых, что соответствует таковому в РФ и практически не отличается от наших результатов по данным НС за более длительный период – 2006-17 г.г. (табл. 6). За период ведения регистра был один случай летального исхода от МВ в 2012 году у подростка, а среди детей 0-14 лет с МВ смертности не было. При сравнении регистров МВ шести регионов УРФО (Ямало-Ненецкий и Ханты-Мансийский автономные округа, Свердловская, Челябинская, Тюменская и Курганская области) в ХМАО-Югре установлена наибольшая распространённость МВ, что логично связать с наиболее высоким уровнем рождаемости на этой территории и как следствие - наиболее выраженным эффектом «накопления» пациентов в когорте детей в течение 2012-18 г.г. (период ведения регистров МВ). Доказательством этому являются установленные нами положительные сильные связи между рождаемостью в регионах УРФО и распространённостью МВ ($r = 0,80$), удельным весом детей в структуре населения и распространённостью МВ ($r = 0,70$; $< 0,05$ в обоих случаях методом ранговой корреляции).

Клинико-лабораторные и функциональные особенности когорты детей с МВ в ХМАО-Югре по данным регистра в динамике за период с 2012 по 2018 г.г. в условиях внедрения массового скрининга заболевания

Когорта включённых в региональный регистр пациентов с МВ в динамике с 2012 до 2018 г.г. характеризовалась ростом количества больных на 35,7% в основном

за счёт детей 0-14 лет (на 43,3%). Увеличение среднего возраста пациентов в 1,46 раза также произошёл главным образом за счёт детей 0-14 лет - в 2,1 раза (у больных старше 14 лет - в 1,23 раза), что оказалось статистически значимым ($p < 0,05$ в обеих возрастных группах).

Таблица 2.

Возрастная и гендерная характеристика больных МВ в ХМАО-Югре в 2012-2018 г.г.

Показатели	Годы							% прироста	p 2012 - 2018
	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018		
Все пациенты									
Число пациентов с МВ	42	42	39	49	54	57	57	35,7	-
Возраст Me(Q1-Q3)	6,3 (3,1-15,1)	8,4 (4,1-17,0)	7,7 (4,9-16,8)	7,80 (4,5-14,0)	8,00 (4,9-15,0)	8,7 (5,4-16,0)	9,2 (5,2-16,0)	46,0	0,02*
М/Ж (абс)	22/20	21/21	19/20	24/25	26/28	27/30	26/31	18,2/55,0	-
М/Ж (%)	52,4/ 47,6	50,0/ 50,0	48,7/ 51,3	49,0/ 51,0	48,1/ 51,9	47,4/ 52,6	45,6/ 54,4	-	> 0,05**
в т. ч. 0-14 лет (дети)									
Число пациентов с МВ	30	29	27	37	37	39	43	43,3	-
% от общего числа с МВ	71,4	69,0	69,2	75,5	68,5	68,4	75,4	-	> 0,05**
Возраст Me(Q1-Q3)	3,78 (2,16-7,66)	4,20 (2,55-7,88)	4,88 (3,44-8,12)	5,50 (3,88-8,50)	6,70 (3,55-8,77)	7,50 (3,65-9,11)	8,00 (3,31-9,80)	111,6	0,01*
М/Ж (абс)	13/17	13/16	13/14	18/19	17/20	18/21	20/23	53,8/35,3	-
М/Ж (%)	43,3/ 56,7	44,8/ 55,2	48,1/ 51,9	48,6/ 51,4	45,9/ 54,1	46,1/ 53,9	46,5/ 53,5	-	> 0,05**
Пациенты старше 14 лет									
Абс	12	13	12	12	17	18	14	16,7	-
% от общего числа с МВ	28,6	31,0	30,8	24,5	31,5	31,6	24,6	-	> 0,05**
Возраст Me(Q1-Q3)	19,1 (16,5-21,7)	20,9 (17,6-22,7)	21,1 (18,0-23,1)	22,1 (19,0-24,1)	22,1 (16,9-24,9)	23,2 (18,2-26,5)	23,5 (19,5-27,5)	31,4	0,02
М/Ж (абс)	9/3	8/5	6/6	6/6	9/8	9/9	6/8	-33,3/ 166,7	-
М/Ж (%)	75,0/ 25,0	61,5/ 38,5	50,0/ 50,0	50,0/ 50,0	47,1/ 52,9	50,0/ 50,0	42,9/ 57,1	-	< 0,05**

Примечание: * - метод Манна-Уитни; ** - метод углового преобразования Фишера

Данную закономерность логично связать с ростом абсолютного количества больных детей 0 -14 лет. Статистически значимых изменений возрастно-половой структуры включённых в регистр больных за период с 2012 по 2018 г.г. не установлено ($p > 0,05$): пациенты в возрасте 0 - 14 лет стабильно составляли более 2/3 в общей когорте больных МВ при незначительном преобладании лиц женского пола в обеих возрастных группах ($p > 0,05$).

Установлен в динамике рост удельного веса включённых в регистр больных, кому проводился НС (2012 г. - 38,1%; 2018 г. - 64,1%; $p < 0,05$). При этом группа детей с НС по данным регистра 2018 г. характеризовалась статистически значимо меньшим возрастом постановки диагноза, в отличие от группы пациентов без НС (табл. 3). Пациенты с НС имели в 2018 году меньший средний возраст, чем больные без НС. После внедрения массового НС диагноз заболевания стал устанавливаться преимущественно на 1-м году жизни.

Таблица 3.

Сравнительная возрастная оценка пациентов с МВ с НС и без НС из регистра 2018 г.

Показатели	Пациенты без скрининга (n = 22)	Пациенты со скринингом (n = 35)	P
Возраст постановки диагноза, Ме (Q1-Q3)	5,90 (0,79-7,56)	0,28 (0,14-1,25)	0,001*
Средний возраст пациентов с МВ, Ме (Q1-Q3)	17 (13-26)	6 (3-8)	0,01*
Диагноз установлен до 1 года Абс/%	6/27,3	25/71,4	<0,01**
Диагноз установлен от 1 г до 3 лет Абс/%	3/13,6	6/17,2	<0,01**
Диагноз установлен от 3 до 7 лет Абс/%	5/22,7	2/5,70	<0,01**
Диагноз установлен от 7 до 14 лет Абс/%	6/27,3	2/5,70	<0,01**
Д/з установлен в возрасте старше 14 лет Абс/%	2/9,10	0/0,00	<0,01**

Примечание: * - метод Манна-Уитни; ** - метод углового преобразования Фишера

Методом ранговой корреляции исследованы связи между основными клинико-функциональными показателями МВ и, с одной стороны – возрастом постановки диагноза, с другой – длительностью заболевания. Установлены статистически значимые связи между возрастом при постановке диагноза МВ и ИМТ ($r = - 0,80$, $p < 0,05$), показателем ОФВ1 ($r = - 0,64$, $p < 0,05$), суммарным числом койко-дней в текущем году ($r = 0,81$, $p < 0,05$), что логично считать отражением негативного влияния поздней диагностики МВ на течение заболевания. Средней силы статистически значимая связь ($r = 0,64$, $p < 0,05$) между ОФВ1 и ИМТ отражает патогенетическую связь между состоянием питания и функциональным состоянием бронхо-лёгочной системы у больного ребёнка. Статистически значимые обратные связи между возрастом на момент обследования, ИМТ ($r = - 0,66$, $p < 0,05$), показателем ОФВ1 ($r = - 0,62$, $p < 0,05$), суммарным числом койко-дней в текущем году ($r = 0,63$, $p < 0,05$) косвенно свидетельствуют об ухудшении клинико-функциональных показателей по мере увеличения возраста пациента, отражая процесс прогрессирования заболевания.

Сравнительная оценка клинико-лабораторных и функциональных особенностей МВ у детей с НС и без НС. В табл. 4 представлена сравнительная оценка 2-х групп детей с МВ, стандартизированных по возрасту. Отсутствие статистически значимых различий ($p > 0,05$) по возрасту на момент анализа данных пациентов, гендерной структуре, результатов генной диагностики, уровню хлоридов пота свидетельствовали о сопоставимости сравниваемых групп по основным параметрам, которые напрямую или опосредованно могут влиять на особенности течения заболевания. На более тяжёлое течение заболевания в группе без НС указывают более низкие показатели индекса массы тела (ИМТ) и объёма форсированного выдоха за первую его секунду (ОФВ1) по данным спирометрии.

Установленные закономерности свидетельствуют о более тяжёлом поражении лёгких с нарушением бронхиальной проходимости и худшем нутритивном статусе пациентов без НС с более поздней по возрасту больных постановкой диагноза МВ. Как видно из таблицы 4, в группе без НС диагноз устанавливался статистически значительно позже, чем у детей с НС. Результаты бактериологического мониторинга мокроты пациентов свидетельствовали о более неблагоприятной ситуации в группе без НС: более частая встречаемость интермиттирующей колонизации *Ps. Aeruginosa* ($p < 0,05$) характеризовала более тяжёлое течение хронического бронхолёгочного процесса при поздней диагностике МВ.

Таблица 4.

Сравнительная оценка клинических, лабораторных и функциональных показателей в группах детей с МВ с НС и без НС (стандартизация по возрасту пациентов)

Показатели	Пациенты без скрининга n=11	Пациенты со скринингом n=16	P
Возраст в годах Me(Q1-Q3)	8,50(6,11-10,2)	8,32(7,00-9,11)	0,063**
Пол:			
М абс/%	5/45,5	7/43,8	>0,05*
Ж абс/%	6/54,5	9/56,2	
Возраст постановки диагноза в годах Me(Q1-Q3)	4,50(1,38-6,53)	0,63(0,15-1,82)	0,038**
Генетический диагноз:			
Установлены обе мутации абс/%	11/100,0	16/100,0	>0,05*
Мутация F508del абс/%	10/90,9	13/81,3	>0,05*
F508del в гомозиготном положении абс/%	1/9,10	1/6,30	>0,05*
F508del в компаунде абс/%	9/81,8	12/75,0	>0,05*
Сочетание других мутаций	1/9,10	3/18,7	>0,05*
Хлориды пота ммоль/л Me(Q1-Q3)	101,5(98,9-113,4)	102,0(77,5-108,5)	0,82**
Мекониевый илеус абс/%	0/00,0	1/6,25	>0,05*
ИМТ кг/м ² Me(Q1-Q3)	15,3(14,9-15,6)	19,4(17,7-19,9)	0,025**
ОФВ1 в % от среднестатистической нормы Me(Q1-Q3)	93,0(86,5-95,0)	100,0(95,0-111,3)	0,011**
Интермиттирующая колонизация <i>Ps. aeruginosa</i> абс/%	5/45,5	2/12,5	<0,05*
Хр. колонизация <i>St. aureus</i> абс/%	8/72,7	11/68,8	>0,05*
Нейтр. жир более чем на ++	3/27,3	5/31,3	>0,05*

Примечание: ** метод Манна-Уитни; * - метод углового преобразования Фишера

В соответствии с данными табл. 5, статистически значимых различий по частоте госпитализаций в сравниваемых группах не установлено ($p > 0,05$), в то время как суммарное число дней госпитализации пациентов без НС оказалось статистически значительно больше, чем в группе с НС ($p < 0,05$). Это можно связать с тем, что в большинстве случаев плановые госпитализации пациентов с МВ осуществляются один раз в квартал, при этом в группе без НС имела место необходимость более длительных пребываний в стационаре, ввиду более тяжёлого течения заболевания в условиях более поздней его диагностики.

Все пациенты обеих групп пожизненно получали панкреатические ферменты, средняя доза которых не имела статистически значимых различий ($p > 0,05$) у детей с НС и без НС. С целью улучшения реологических свойств бронхиального секрета и

улучшения мукоцилиарного клиренса все больные ежедневно пожизненно ингалировали один раз в день дорназу альфа в дозе 2,5мг с использованием компрессорного ингалятора; применяли кинезитерапию, которой они и их родители были обучены специалистами регионального центра МВ; получали регулярные курсы жирорастворимых витаминов и препараты урсодезоксихолевой кислоты. Отсутствие различий по частоте использования этих видов терапии свидетельствует о сопоставимости сравниваемых групп по подходам к базисной терапии МВ.

Таблица 5.

Сравнительная оценка лечебных подходов в группах детей с МВ с НС и без НС (стандартизация по возрасту пациентов)

Показатели	Пациенты без скрининга n=11	Пациенты со скринингом n=16	P
Число госпитализаций в текущем году	4(4-5)	4(3-4)	0,081**
Суммарное число к/дней	70(56-70)	53(47-56)	0,004**
Дорназа альфа постоянно	11/100,0	16/100,0	-
Панкреатические ферменты (минимикросферы) постоянно абс./%	11/100,0	16/100,0	-
Доза панкреатина (минимикросферы) в сутки ед. по липазе на 1 кг массы Me(Q1-Q3)	3750 (2100-4400)	3500 (2000-4800)	0,54**
Антибиотики В/В	10/90,9	12/75,0	>0,05*
Антибиотики В/В более 3 мес в году абс./%	9/81,8	4/25,0	<0,01*
Антибиотики ингаляционные	7/63,6	8/50,0	>0,05*
Антибиотики ингаляционные более 3 мес в году абс./%	5/45,5	4/25,0	>0,05*
Антибактериальные препараты таблетированные	10/90,9	4/25,0	<0,01*
Антибактериальные препараты таблетированные более 3 мес в году абс./%	9/81,8	2/12,5	<0,01*
Азитромицин	2/18,2	1/6,25	>0,05*
Азитромицин более 3 мес в году абс./%	2/18,2	1/6,25	>0,05*
Бронхолитики	10/90,9	7/43,8	<0,01*
Бронхолитики длительностью более 3 мес в году абс./%	5/45,5	0/0,00	<0,01*
Ингаляционные стероиды			
Ингаляционные стероиды более 3 мес в году абс./%	5/45,5	0/0,00	<0,05*
Системные стероиды абс./%	0/0,00	0/0,00	-
Урсодезоксихолевая к-та более 3 мес в году абс./%	11/100,0	16/100,0	-
Жирорастворимые витамины более 3 мес в году абс./%	11/100,0	16/100,0	-
Кинезитерапия абс./%	11/100,0	16/100,0	-

Примечание: ** метод Манна-Уитни; * - метод углового преобразования Фишера

В то же время в группе без НС курсы внутривенной антибиотикотерапии были более продолжительными в их совокупности в течение года наблюдения, чаще и более длительно назначались таблетированные антибактериальные препараты (в основном – ципрофлоксацин при колонизации *Ps. Aeruginosa*), что оказалось статистически значимым ($p < 0,05$). Детям без НС чаще и более длительными курсами назначались ингаляционные бронхолитики и ингаляционные глюкокортикостероиды ($p < 0,05$ в обоих случаях), что свидетельствовало о тяжёлом поражении бронхолёгочного аппарата с выраженной бронхиальной обструкцией при

более поздней диагностики МВ. Факты применения системных глюкокортикостероидов в группах наблюдения не установлены. Макролиды использовались с одинаковой частотой в обеих группах ($p > 0,05$ по методу углового преобразования Фишера).

Эффективность и оптимизация НС на территории ХМАО-Югры в период 2006 – 2019 г.г. По данным региональной медико-генетической консультации (г. Сургут), в период 2006 – 2017 гг. был обследован 283 741 ребенок, при этом среднемноголетний охват (доля обследованных НС детей от всего числа живорожденных) НС МВ составил 96,3% (таблица 6); за период бесперебойного проведения НС в 2009 – 2017 гг. охват составил 98,9%. За время проведения НС было выявлено 32 пациента с подтвержденным диагнозом МВ. Всего в Окружном регистре по состоянию на конец 2019 г. состояло 58 пациентов с МВ (из них 49 детей, 9 взрослых).

Таблица 6

Результаты НС на МВ в ХМАО-Югре в период 2006–2017 гг.

* 2006 – НС выполнялся с июня по декабрь; 2008 г. – НС выполнялся кроме марта

год	число живорожд.	число обследов-х новорожд.	% охвата НС	ИРТ1(+)	ИРТ2(+)	случаи МВ	частота МВ
2006	20 030	16 926	84,5%*	113	4	1	1 : 20 030
2007	21 348	21 169	99,2%	368	29	2	1 : 10 674
2008	22 766	17 738	77,9%*	305	30	0	-
2009	23 350	23 318	99,9%	496	57	6	1 : 3 892
2010	24 509	24 405	99,6%	433	45	3	1 : 8 170
2011	24 893	24 695	99,2%	401	40	3	1 : 8 298
2012	27 320	26 761	98,0%	616	100	4	1 : 6 830
2013	27 462	26 863	97,8%	750	160	3	1 : 9 154
2014	27 384	27 299	99,7%	591	130	1	1 : 27 384
2015	26 665	26 312	98,7%	568	132	3	1 : 8 888
2016	25 324	25 116	99,2%	518	104	3	1 : 8 441
2017	23 566	23 139	98,2%	404	95	3	1 : 7 855
ВСЕГО:	294 617	283 741	96,3%	5 563	926	32	1 : 9 207

Положительный тест ИРТ-1 был выявлен в 5 563 случаях, что составило 1,96% от общего числа первичного теста. Положительный ИРТ-2 (ретест) был выявлен в 926 случаях (16,6% от объемов положительного теста ИРТ-1 и 0,33% от объемов всех исследований). Частота МВ в регионе составила 1: 9 207 новорожденных, что соответствует общероссийским показателям [Капранов Н.И., 2014]. Операционные характеристики теста ИРТ-1 следующие: уровень чувствительности (Se) – 100,0% из-за отсутствия ложноотрицательных показателей, тогда как среднемноголетняя специфичность (Sp) – 98,1% из-за наличия 5 531 ложноположительного результата ИРТ-1. Прогностичность положительного результата (PPV) весьма низка и составила 0,65% за период 2006-2017 гг., тогда как прогностичность отрицательного результата (NPV) равна 100%, что также обусловлено отсутствием ложноотрицательных результатов. В период 2006-2013 гг. наблюдался постепенный рост числа положительных результатов ИРТ-1 с пиком в 2013 г. (рис. 2) при отсутствии роста в числе вновь выявленных случаев заболевания. Методом ранговой корреляции была выявлена сильная отрицательная связь ($r = - 0,78$; $p = 0,001$) между применением фиксированного порогового уровня (ПУ) ИРТ-1, рекомендованного производителем

наборов для НС МВ (PerkinElmer, США), и количеством ложноположительных результатов ИРТ-1.

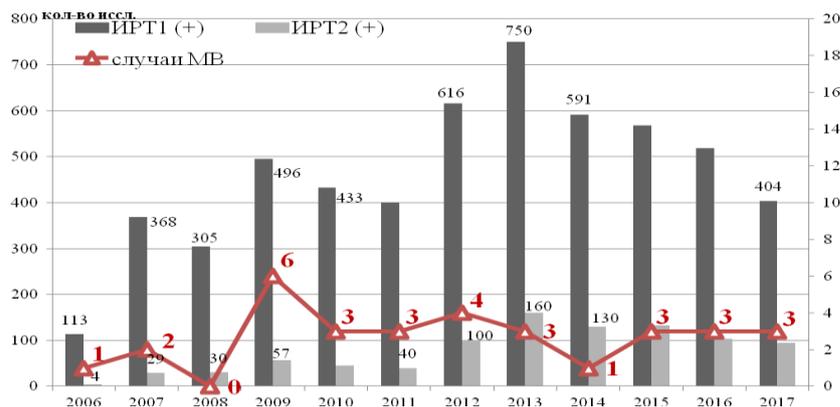


Рис. 2. Результаты биохимического НС на МВ в 2006 – 2017 гг.

В связи с большим количеством ложноположительных результатов НС и выявлением отрицательной динамики (рост числа ложноположительных случаев от года к году) нами было предложено уточнить региональные референсные показатели ИРТ и определить верхнюю точку (пороговое значение) референсного интервала значений, используя методику вычисления «плавающего» порогового уровня (ППУ) ИРТ-1 [B.L. Therrell et al., 2012]. Для расчета плавающего ПУ ИРТ-1 совместно с IT-специалистами СупГУ было разработано специализированное ПО «fIRT» (floating IRT), позволяющее проводить быструю статистическую обработку больших выборок ($n > 500$). Тип распределения выборки – лог-нормальный. Путем последовательного перебора и для удобства расчетов в качестве оптимального порога был выбран 99,5-й процентиль для каждой используемой выборки.

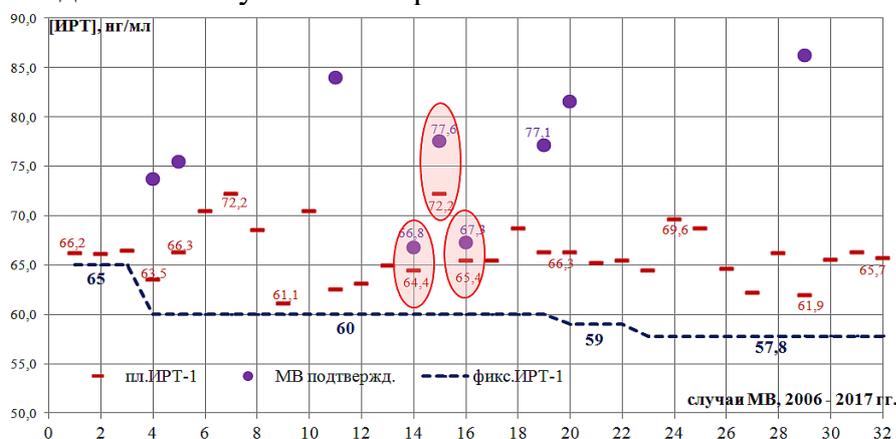


Рис. 3. Сравнение стандартного подхода и подхода с расчетом ППУ ИРТ-1 для случаев МВ в ХМАО за период 2006 – 2017 гг.

Для каждого подтвержденного случая МВ ($n=32$) за период проведения НС в 2006 – 2017 гг. было проведено ретроспективное моделирование расчета ППУ ИРТ-1 по принципу «скользящего окна», при котором для статистической обработки были оцифрованы 32 сгруппированных набора данных (для каждого случая МВ $n=1\ 000$). Использование предложенного алгоритма расчета ППУ ИРТ-1 в трех случаях, при которых наблюдались низкие цифры ИРТ-1 (67,3; 66,8; 77,6 нг/мл) продемонстрировало его применимость (рис. 3). Диапазон ППУ находится в пределах 61,1 – 72,2 нг/мл, а уровни ИРТ-1 достаточно высоки, чтобы исключить ложноотрицательные результаты скрининга.

Перспективные результаты использования ПО *fIRT* в 2018-2019 г.г. продемонстрировали снижение количества ложноположительных результатов в 2018 г. на 74,8%, в 2019 г. – на 78,6% (таблица 7).

Таблица 7

Сравнительная оценка результатов НС на МВ в 2018-19 г.г. при использовании фиксированного ПУ и ППУ ИРТ

Год	Кол-во исследований ИРТ-1 ежегодно	Положительный ИРТ-1 Абс/%		Ложноположительные результаты ИРТ-1 Абс/%		Установлено случаев МВ в 2018-19 г.г.		
		1	2	1	2	Всего	Положительный тест ИРТ-1	
							1	2
2018	22 226	360/1,62	93/0,42	357/1,61	90/0,41	3	3	3
2019	21 320	407/1,91	110/0,52	397/1,86	85/0,40	5	5	5

Примечание: 1 – стандартный подход (ФПУ ИРТ=57,8нг/мл); 2 – метод ППУ (ИРТ >99,5 перцентилья)

Специфичность метода ППУ, по сравнению с использованием фиксированного ПУ, в 2018 г. составила 99,6% и 98,3%, в 2019 г. – 99,6% и 98,1%, соответственно, при сохранении 100% чувствительности в 2018 и 2019 г.г. Это позволило без ущерба качества диагностики МВ сократить число ретестов и снизить необходимость дальнейшего дорогостоящего обследования новорождённых с ложноположительным тестом.

Эффективность генной диагностики МВ на основе последовательного выполнения анализа кривых плавления высокого разрешения (HRMA) и секвенирования по Сэнгеру в региональных условиях. В качестве первого этапа генетической диагностики МВ в клинической практике нами впервые в РФ использован метод анализа кривых плавления высокого разрешения (HRMA) [Т. Langaee et al., 2017], позволяющий выполнять как генотипирование известных мажорных мутаций, так и «сканирование» неизвестных вариантов в пределах экзонов (кодирующих частей гена) и экзон-интронных границ гена *CFTR* [Р. Krenkova et al., 2009]. Валидация метода HRMA с 38 контрольными образцами, ранее охарактеризованными по мутациям в гене *CFTR*, была проведена на базе региональной лаборатории медико-генетической консультации г. Сургута. Количество мутантных аллелей в контрольной выборке составило: $21 \times A + 5 \times B + 12 \times C + 5 \times D = 79$, где $A=2$ – образцы компаунд-гетерозигот с двумя мутациями, $B=2$ – с гомозиготной мутацией, $C=1$ – с одной выявленной мутацией, $D=3$ – с 3 мутациями. HRM-анализ проводился для каждого из 27 экзонов гена *CFTR* в амплификаторе с функцией контролируемого плавления.

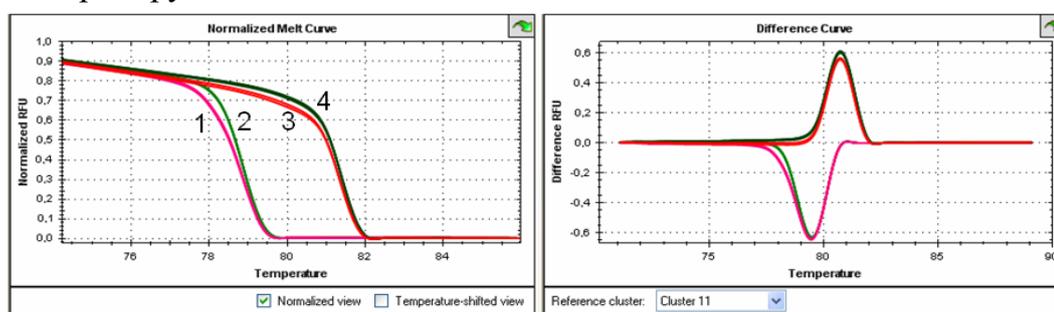


Рис. 4. Детекция двух независимых мутаций в разных экзонах гена *CFTR* для компаунд-гетерозиготного образца $[\Delta]F508/E92K$ (1 – E92K; 3 – $[\Delta]F508$; 3 и 4 – wild-type ДНК)

После выявления экзонов с отклонениями в температуре плавления определение их нуклеотидной последовательности проводилось методом прямого секвенирования по Сэнгеру. Валидирующее исследование подтвердило возможность метода HRM-анализа одновременно выявлять мутации в разных экзонах гена *CFTR* (Рис. 4).

В спектре мутаций контрольной выборки преобладал самый частый патогенный вариант – $[\Delta]F508$ (41,8%), далее в порядке убывания частоты находится т.н. «чувашская» мутация E92K (5,1%), E217G, «кавказская» мутация 1677delTA (по 3,8%). Таким образом, частоты четырех мажорных мутации составили более половины общей частоты изученных мутаций, а суммарная частота 29 редких вариантов составила 45,6%. Были определены также операционные характеристики предложенного комплекса методик HRMA + секвенирование по Сэнгеру. Специфичность метода составила 100%, чувствительность – 97,3% («славянская» мутация в двух образцах не была выявлена), что определяется принципиальной невозможностью и HRMA, и классического секвенирования определять обширные генные перестройки в гетерозиготном состоянии. Для исследования такого типа мутаций традиционно используется метод MLPA (multiplex ligation probe amplification, мультиплексная зависящая от лигирования амплификация зондов) [Н.В. Петрова и др., 2019; I. Schriver et al., 2016], который и был успешно применен для тестирования соответствующих образцов.

Валидированные методы HRMA, секвенирования, MLPA были использованы для расширенного генетического тестирования всех пациентов с диагнозом МВ, включенных в региональный регистр (ведется с 2012 г.). По состоянию на конец 2019 г. было обследовано 54 человека, из них детей – 46, взрослых – 8. Было выявлено 36 вариантов (34 – достоверно патогенные, 2 – с неизвестной клинической значимостью, предположительно непатогенные) во всех экзонах, кроме №№ 5, 9, 12, 15, 17-19, 26, 27.

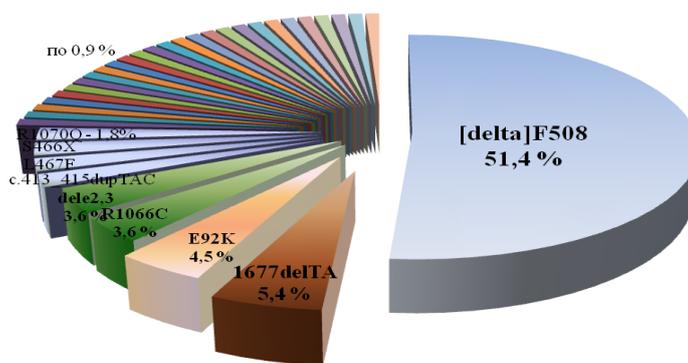


Рис. 5. Спектр мутаций в гене *CFTR* у пациентов из регионального регистра МВ в ХМАО-Югре.

Количество исследованных аллелей составило 111, из них 9 мажорных мутаций с частотой более 1%, и 25 редких мутаций, каждая из которых встречается лишь у одного пациента. У трех пациентов было обнаружено по 3 аллеля, что объясняет нечетное суммарное число всех вариантов ($n=111$ вместо ожидаемого $54 \times 2 = 108$). Так, у двух человек мутации S466X, R1070Q были выявлены в cis-положении (т.е. на одной хромосоме), образуя комплексный аллель [S466X;R1070Q], который по данным [Н.В. Петрова, и др., 2019] встречается только в российской популяции. У

одной пациентки с МВ в дополнение к 2 мутациям был выявлен вариант с неизвестной клинической значимостью L467F.

При обследовании всей когорты пациентов было выявлено разнообразие спектра патогенных вариантов гена *CFTR* (Рис.5). Тяжелые мутации I класса встречались чаще всего (16 из 36), преимущественно типа «нонсенс», II типа – только 3 мутации (однако, самые частые, включая [Δ]F508). Обнаружено 6 «мягких» вариантов классов IV, V с остаточной функцией хлорного канала, у которых частично сохранена экзокринная функция поджелудочной железы. Варианты с неизвестным клиническим значением обнаружены в компаунд-гетерозиготном состоянии с [Δ]F508 у 4 пациентов со средне-тяжелым течением МВ. У 14 пациентов выявлена мутация [Δ]F508 в гомозиготном состоянии, что обусловило тяжелое течение МВ у двух взрослых пациентов с МВ (без НС).

ВЫВОДЫ

1. Среднемноголетний показатель заболеваемости МВ в ХМАО-Югре за период с 2012 по 2018 г.г. составил 1 случай на 9025 живорождённых детей. Самая высокая распространённость МВ в ХМАО-Югре среди 6-ти субъектов УрФО, 3,0 на 100 000 населения, связана с более высокой рождаемостью, большим удельным весом детей 0-14 лет в структуре населения и как следствие – с эффектом «накопления» больных в популяции детей.

2. Клинико-лабораторные и функциональные показатели МВ у детей определяются сочетанным влиянием двух факторов, характеризующих когорту пациентов в процессе массового внедрения НС в динамике – уменьшением возраста постановки диагноза и увеличением среднего возраста больных.

3. Связанный с ранней диагностикой МВ на основе массового внедрения НС и своевременно начатой комплексной терапией клинический патоморфоз заболевания характеризовался более благоприятным течением болезни по данным оценки нутритивного статуса (ИМТ), функциям внешнего дыхания (ОФВ1), частоте интермиттирующей колонизации *Ps. Aeruginosa* с возможностью уменьшения объёма терапии и сокращения длительности пребывания в стационаре.

4. Чувствительность НС на МВ в ХМАО-Югре при применении рекомендованного изготовителем реактивов для определения ИРТ его фиксированного порогового уровня составила 100%, специфичность – 98,1%. Внедрение разработанной авторской программы ЭВМ “floating level of IRT” по определению «плавающего» порогового уровня ИРТ позволило уменьшить число ложноположительных результатов НС на 74,8% в 2018 г., на 78,6% – в 2019 г, и повысить уровень специфичности метода до 99,6% при сохранении 100% его чувствительности.

5. Применение HRMA с последующим прямым секвенированием по Сэнгеру отдельных экзонов, содержащих мутации, позволяет значительно расширить диагностику спектра мутаций на региональном уровне и в 98% случаев установить тип мутации в гене *CFTR*, чувствительность – 97,3%, специфичность – 100%. Ложноотрицательные результаты характерны для протяженных делеций/инсерций и сложных перестроек в гетерозиготном состоянии, что требует проведения MLPA. Полный охват генной диагностикой детей с МВ в ХМАО-Югре с использованием HRMA позволил установить следующую структуру мутаций в гене *CFTR*: 51,4% - F508del; 5,4% - 1677delTA; 4,5% - E92K; по 3,6% - CFTRdele2,3 и R1066C; по 1,8% - L138ins, S466X, R1070Q, L467F; суммарная аллельная частота 27 редких мутаций (частота каждой 0,9%), составила 24,3%.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Департаменту здравоохранения ХМАО-Югры и региональному центру МВ рекомендуется: учитывать установленные эпидемиологические показатели МВ при планировании кадровых и материальных ресурсов для оказания медицинской помощи детям с МВ.

2. Педиатрам, оказывающим медицинскую помощь детям с МВ, рекомендуется учитывать клинические особенности течения заболевания в зависимости от возраста постановки диагноза у пациентов с наличием или отсутствием НС при планировании и осуществлении лечебно-профилактических мероприятий. Медико-генетической консультации БУ ХМАО-Югры Окружной кардиологический диспансер «Центр диагностики и сердечно-сосудистой хирургии» рекомендуется:

- внедрение разработанной программы ЭВМ по определению референсных значений ИРТ с целью сокращения ложноположительных результатов теста и затрат на дальнейших этапах диагностики МВ (ретест, потовый тест, молекулярно-генетическая диагностика);

- внедрение метода HRMA с последующим секвенированием по Сэнгеру для повышения качества молекулярно-генетической диагностики заболевания на региональном уровне и снижения потребности в дорогостоящем обследовании в федеральных центрах.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Список работ, опубликованных в журналах,

рекомендуемых ВАК Министерства образования и науки РФ

1. **Донников, М.Ю.** Неонатальный скрининг и генная диагностика муковисцидоза в Ханты-Мансийском автономном округе-Югре (статья) / М.Ю. Донников, Л.Н. Колбасин, И.А. Урванцева, В.В. Мещеряков // Медицина и образование в Сибири. – 2015. – № 3. – URL: http://ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=1810 (дата обращения : 01.02.2020).

2. **Донников, М.Ю.** Поиск генных мутаций при муковисцидозе у детей методом анализа кривых плавления (статья) / М.Ю. Донников, В.В. Мещеряков // Сибирский научный медицинский журнал. – 2018. – Том 38. – № 2. – С. 13-21.

3. **Донников, М.Ю.** Оптимизация неонатального скрининга муковисцидоза в региональных условиях (статья) / М.Ю. Донников, В.В. Мещеряков // Доктор.Ру. – 2019. – № 9 (164). – С. 6-12.

4. **Донников, М.Ю.** Клинико-эпидемиологические особенности муковисцидоза у детей в условиях внедрения его неонатального скрининга на примере ХМАО-Югры за период 2012-2018 г.г. (статья) / М.Ю. Донников, Н.А. Сацук, В.В. Мещеряков // Вестник СурГУ. Медицина. – 2019. – № 4 (42). – С. 21-28.

Список работ, опубликованных в журналах базы данных Scopus

1. **Донников, М.Ю.** Детекция мутаций при муковисцидозе в гене *CFTR* у новорождённых детей в Ханты-Мансийском автономном округе-Югре (тезисы) / М.Ю. Донников, В.В. Мещеряков, Л.Н. Колбасин // Российский Вестник Перинатологии и Педиатрии. – 2017. – Т.62, №4. – С. 168-169.

2. **Donnikov, M.Y.** Fast detection of *CFTR* mutations in dried blood spots of newborns in Khanty-Mansi region (Russia) (тезисы) / M.Y. Donnikov, V.V. Mescheryakov, L.N. Kolbasin // Journal of Cystic Fibrosis. – 2018. – Vol. 17. – Suppl. 3. – S61.

3. **Донников, М.Ю.** Сравнительная характеристика детей с муковисцидозом в группах с неонатальным скринингом и без него (тезисы) / Донников М.Ю., Сацук Н.А., Мещеряков В.В. // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2019. – Том 64. – № 4. – С. 190.

4. **Донников, М.Ю.** Быстрая генетическая диагностика муковисцидоза у новорожденных в ХМАО-Югре (тезисы) / Донников М.Ю., Мещеряков В.В., Сацук Н.А., Колбасин Л.Н., Коваленко Л.В. // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2019. – Том 64. – № 4. – С. 221-222.

5. **Donnikov, M.** Effective neonatal genetic diagnostics of cystic fibrosis in Khanty-Mansi region (Russia) (тезисы) / M.Yu. Donnikov, V. Mescheryakov, A. Vorobev, A. Popov, N. Satsuk, L. Kolbasin, D. Lozhkin, N. Kuntsevitch, L. Kovalenko, I. Urvantseva // European Journal of Human Genetics. – 2019. – Vol. 27. – Suppl. 2. – P. 1630-1631.

Работы, опубликованные в других изданиях

1. **Донников, М.Ю.** Опыт организации и эффективность неонатального скрининга и молекулярной диагностики муковисцидоза в ХМАО-Югре (тезисы) / М.Ю. Донников, Л.Н. Колбасин, И.А. Урванцева, В.В. Мещеряков, Н.А. Гильнич // Тезисы VII Конгресса педиатров стран СНГ «Ребенок и общество: проблемы здоровья, развития и питания», г. Сочи, 23-24.10.2015. – С. 29.

2. **Донников, М.Ю.** Валидация методики расширенного молекулярно-генетического анализа гена *CFTR* у детей с муковисцидозом в Ханты-Мансийском автономном округе-Югре (тезисы) / М.Ю. Донников, Л.Н. Колбасин, В.В. Мещеряков, Н.А. Сацук, И.А. Урванцева // Тезисы XIII Национального конгресса «Инновационные достижения в диагностике и терапии муковисцидоза», г. Сергиев Посад, 27-28.04.2017. – С. 56-57.

3. **Донников, М.Ю.** Поиск мутаций в гене *CFTR* методом HRMA у детей с муковисцидозом в ХМАО-Югре (тезисы) / М.Ю. Донников, В.В. Мещеряков // «Фундаментальные и прикладные проблемы здоровьесбережения человека на севере»: сборник материалов II Всероссийской научно-практической конференции, Сургут, 21 октября 2017 г. / Сургут, гос. ун-т, Медицинский институт. – Сургут, 21.10.2017. – С.162-167.

4. **Донников, М.Ю.** Метод HRM-анализа в ранней диагностике муковисцидоза в ХМАО-Югре (тезисы) / М.Ю. Донников, В.В. Мещеряков, Л.Н. Колбасин // Сборник тезисов XX конгресса педиатров России с международным участием «Актуальные проблемы педиатрии». г. Москва, 16-18.02.2018. – С. 95.

5. **Donnikov, M.Yu.** Successful usage of combined molecular genetics approach in diagnosing cystic fibrosis (статья) / M.Yu. Donnikov, V.V. Mescheryakov, L.N. Kolbasin // «Фундаментальные и прикладные проблемы здоровьесбережения человека на севере»: сборник материалов III Всероссийской научно-практической конференции, Сургут, 20 – 21.10.2018 г. / Сургут, гос. ун-т, Медицинский институт. – Сургут, 2018. – С. 335-337.

6. **Донников, М.Ю.** Использование динамического порога иммунореактивного трипсиногена в неонатальном скрининге муковисцидоза в ХМАО-Югре (тезисы) / М.Ю. Донников, В.В. Мещеряков // Сборник тезисов XXI Конгресса педиатров России с международным участием «Актуальные проблемы педиатрии», г. Москва, 15-17.02.2019. – С. 74.

7. **Донников, М.Ю.** Алгоритм неонатальной молекулярной диагностики муковисцидоза в ХМАО-Югре (тезисы) / М.Ю. Донников, В.В. Мещеряков, Н.А. Сацук, Л.Н. Колбасин // Тезисы XIV Национального конгресса с международным

участием «Актуальные проблемы муковисцидоза», г. Красноярск, 25-26.04.2019. – С. 17.

8. **Донников, М.Ю.** Разработка панели частых региональных мутаций гена *CFTR* для молекулярной диагностики муковисцидоза в ХМАО-Югре (тезисы) / М.Ю. Донников, В.В. Мещеряков, Н.А. Сацук, Л.Н. Колбасин // Тезисы XIV Национального конгресса с международным участием «Актуальные проблемы муковисцидоза», г. Красноярск, 25-26.04.2019. – С. 18

9. **Донников, М.Ю.** Спектр региональных мутаций в гене *CFTR* у детей с муковисцидозом в ХМАО-Югре (тезисы) / М.Ю. Донников, В.В. Мещеряков, Н.А. Сацук, Н.А. Пономарёва, Л.Н. Колбасин // Тезисы XIV Национального конгресса с международным участием «Актуальные проблемы муковисцидоза», г. Красноярск, 25-26.04.2019. – С. 19.

Свидетельство на программу ЭВМ

1. Свид. 2017663099 Российская Федерация. Свидетельство об официальной регистрации программы ЭВМ. Floating Level of IRT / **Донников М.Ю.**, Мещеряков В.В., Девицын И.Н.; заявитель и правообладатель БУ ВО «Сургутский государственный университет» (RU). – 2017619871; заявл. 03.10.2017; опублик. 24.11.2017, Реестр программ для ЭВМ. – 1 с.

Список терминологических сокращений

- гДНК – геномная ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота)
- ИРТ – иммунореактивный трипсиноген
- МВ – муковисцидоз
- ППУ – плавающий пороговый уровень
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- ФПУ – фиксированный пороговый уровень
- CFTR – cystic fibrosis transmembrane regulator (трансмембранный регулятор кистозного фиброза (муковисцидоза))
- HRMA – high resolution melting analysis (анализ кривых плавления высокого разрешения)
- MLPA – multiplex ligation-dependent probe amplification (амплификация мультиплексных лигируемых зондов)
- NPV – negative predictive value (прогностичность отрицательного результата)
- PPV – positive predictive value (прогностичность положительного результата)
- Se – sensitivity (чувствительность)
- Sp – specificity (специфичность)