

Н.Б. Кузьменко, Т.В. Варламова, А.А. Мухина, В.В. Бриллиантова, Е.В. Райкина,  
Г.А. Новичкова, А.Ю. Щербина

## ОПЫТ ПРЕНАТАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ПЕРВИЧНЫХ ИММУНОДЕФИЦИТНЫХ СОСТОЯНИЙ

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» МЗ РФ, Москва, РФ



Первичные иммунодефицитные состояния (ПИДС) – генетически обусловленные, тяжелые, часто жизнеугрожающие заболевания, с поражением различных компонентов иммунной системы. Пренатальная диагностика (ПНД) является важной частью профилактики рождения детей с ПИДС. Цель исследования – анализ результатов ПНД при 33 беременностях в 30 семьях, где отмечался хотя бы один случай ПИДС, подтвержденный молекулярно-генетически. Материалы и методы исследования: ДНК плода выделяли из материала, полученного путем забора ворсин хориона, амниотической жидкости или кордоцентеза. Образцы ДНК плодов были исследованы на предмет наличия конкретных патогенных мутаций, ранее зафиксированных в семьях, методом прямого секвенирования по Сенгеру. Результаты: в 5 случаях у плода были выявлены мутации, подтверждающие соответствующий вид ПИДС, беременности были прерваны по желанию родителей. В 4 случаях плоды являлись потенциально здоровыми носителями мутаций в гетерозиготном состоянии, в остальных случаях соответствующие мутации выявлены не были. Заключение: генетическое консультирование и ПНД играют важную роль при планировании рождения здоровых детей в семьях, где встречались мутации в генах, ответственных за ПИДС.

**Ключевые слова:** первичные иммунодефицитные состояния, пренатальная диагностика, семейное консультирование, молекулярно-генетическое исследование, здоровый носитель.

**Цит.:** Н.Б. Кузьменко, Т.В. Варламова, А.А. Мухина, В.В. Бриллиантова, Е.В. Райкина, Г.А. Новичкова, А.Ю. Щербина. Опыт пренатальной диагностики первичных иммунодефицитных состояний. Педиатрия. 2019; 98 (3): 44–48.

N.B. Kuzmenko, T.V. Varlamova, A.A. Mukhina, V.V. Brilliantanova, E.V. Raykina,  
G.A. Novichkova, A.Yu. Shcherbina

## EXPERIENCE OF PRENATAL DIAGNOSIS OF PRIMARY IMMUNODEFICIENCY STATES

National Scientific-Practical Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology n.a. D. Rogachev, Moscow, Russia

Primary immunodeficiency states (PIDS) are genetically determined, severe, often life-threatening diseases, with lesion of various components of the immune system. Prenatal diagnosis (PND) is an important part of preventing the birth of children with PIDS. Objective of the research: to analyze results of PND in 33 pregnancies in 30 families, having at least one case of PIDS, confirmed molecularly and genetically. Materials and methods: Fetal DNA was extracted from material obtained by taking chorionic villi, amniotic fluid or cordocentesis. Fetal DNA samples were examined by Sanger direct sequencing for the presence of specific pathogenic mutations, previously

### Контактная информация:

Кузьменко Наталья Борисовна – к.м.н., зав. отделом эпидемиологии и мониторинга иммунодефицитов Национального медицинского исследовательского центра детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева МЗ РФ  
Адрес: Россия, 117997, ГСП-7, Москва, ул. Саморы Машела, 1  
Тел.: (495) 287-65-70, доб. 5541, E-mail: plunge@list.ru  
Статья поступила 27.04.19, принята к печати 20.05.19.

### Contact Information:

Kuzmenko Natalya Borisovna – Ph.D., head of Department of Epidemiology and Monitoring of Immunodeficiencies, National Scientific-Practical Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology n.a. D. Rogachev  
Address: Russia, 117997, Moscow, SPS-7, Samory Mashela str., 1  
Tel.: (495) 287-65-70, ext. 5541, E-mail: plunge@list.ru  
Received on Apr. 27, 2019, submitted for publication on May 20, 2019.

diagnosed in families. Results: in 5 cases, fetus had mutations confirming the corresponding PIDS type, pregnancy was terminated on parents' request. In 4 cases fetuses were potentially healthy carriers of mutations in the heterozygous state, in other cases, the corresponding mutations were not identified. Conclusion: genetic counseling and PND play an important role in planning the birth of healthy children in families with mutations in genes responsible for PIDS.

**Keywords:** primary immunodeficiency states, prenatal diagnostics, family counseling, molecular genetic research, healthy carrier.

**Quote:** N.B. Kuzmenko, T.V. Varlamova, A.A. Mukhina, V.V. Brilliantanova, E.V. Raykina, G.A. Novichkova, A.Yu. Shcherbina. Experience of prenatal diagnosis of primary immunodeficiency states. *Pediatrics*. 2019; 98 (3): 44–48.

Первичные иммунодефицитные состояния (ПИДС) – генетически обусловленные, жизнеугрожающие заболевания, которые имеют ауто-сомно-доминантный (АД), ауто-сомно-рецессивный (АР) и Х-сцепленный (Х-сц) варианты наследования [1–3]. Большая часть клинических проявлений ПИДС связана с тяжелыми инфекциями, аутоиммунными и онкологическими осложнениями [1, 2, 4]. Лечение таких пациентов – сложный, дорогостоящий и часто пожизненный процесс [4, 5]. Даже при использовании современных методов лечения некоторые группы заболеваний по-прежнему неизлечимы. Семьи, в которых рождается ребенок с ПИДС, испытывают серьезный психологический стресс в течение многих лет [6].

Многообразие фенотипических проявлений ПИДС, похожая клиническая картина у пациентов с различными генетическими дефектами в разных генах часто затрудняют и усложняют диагностический путь до окончательного молекулярно-генетического диагноза [7, 8]. Верификация генетического дефекта у пациентов с ПИДС важна не только для выбора оптимального подхода к ведению пациента, но и для консультирования семьи – генетического обследования родственников и возможности проведения пренатальной, а также преимплантационной диагностики.

Пренатальная диагностика (ПНД) является важной частью профилактики рождения детей с ПИДС, однако может быть предложена семьям только в том случае, если известна генетическая причина заболевания пробанда в семье. Крайне важной задачей в такой ситуации является информирование родителей о возможности иметь здоровых детей.

Для оперативного проведения молекулярно-генетического обследования плода необходимы четкая организация процесса и скоординированные действия всех участников – от родителей будущего ребенка до врачей молекулярно-генетической лаборатории.

Цель исследования – анализ результатов ПНД при 33 беременностях в 30 семьях, где отмечался хотя бы один случай ПИДС, подтвержденный молекулярно-генетически.

#### Материалы и методы исследования

В исследование включены 30 семей пациентов с ПИДС, подтвержденными молекулярно-генетически (см. таблицу), обратившихся на

ранних сроках беременности, с целью проведения ПНД в период с декабря 2013 по март 2019 гг.

Диагноз ПИДС у пробандов в семьях был ранее поставлен на основании диагностических критериев Международного союза иммунологических обществ (IUIS) и Европейского общества иммунодефицитов (ESID) [1, 7].

Во всех семьях предварительно было проведено семейное консультирование (генетическое обследование членов семьи, составление родословной семьи, оценка генетических рисков, оценка возможности проведения ПНД), женщины были предупреждены о необходимости обратиться на раннем сроке беременности для организации ПНД. В процессе семейного консультирования родители пациентов с ПИДС получали информацию о сроках проведения ПНД и основных технических и логистических моментах, а также возможных осложнениях. При наступлении беременности обсуждали процедуру получения биологического материала в зависимости от срока беременности. Оптимальным являлся забор ворсин хориона на сроке от 10-й до 12-й недели беременности. При невозможности получения материала в этот период проводили амниоцентез до 20-й недели беременности или кордоцентез на более поздних сроках. После забора материала осуществляли молекулярно-генетическое исследование на базе лаборатории молекулярной биологии с целью определения причинных мутаций. При проведении ПНД было получено информированное согласие всех женщин.

Всего было проведено 33 молекулярно-генетических исследования ДНК плодов при 30 беременностях. В семье 1 проведено 3 исследования, в семье 8 – 2 исследования (см. таблицу).

У 27 пациенток в I триместре беременности (на сроке до 12 недель) было выполнено 30 биопсий ворсин хориона. В двух случаях (семьи 21 и 30) получение биоматериала проводили при помощи амниоцентеза на сроке беременности 14 недель, еще в одном случае проводили кордоцентез на 22-й неделе (семья 20). Забор материала для молекулярно-генетического (МГ) анализа проводили в перинатальных центрах по месту жительства. Определение пола по ДНК плода в крови матери проводили по месту жительства.

Геномную ДНК экстрагировали из ворсин хориона, амниотической жидкости или крови плода, соответственно используя набор для выделения ДНК-сорб-В (Амплипрайм), в соответствии с протоколом производителя.

Контаминацию образца плода материнской ДНК исключали с помощью определения STR локусов в образцах матери, отца и плода (набор реагентов для мультиплексного анализа 19 STR-маркеров и локуса

Выявленные мутации в семьях с ПИДС и результаты ПНД

Семья	Диагноз	ТН	Мутация в семье	Белок	Обра- зец	Плод	ИБ
1	СВО	X-сц	WAS: c.1047dupT	p.A350fs	BX	поражен	прервана
1	СВО	X-сц	WAS: c.1047dupT	p.A350fs	BX	здоров	оставлена
1	СВО	X-сц	WAS: c.1047dupT	p.A350fs	BX	поражен	прервана
2	СВО	WAS:	WAS: c.143C>T	p.T48I	BX	здоров	оставлена
3	СВО	X-сц	WAS: c.294delA	p.E98fs	BX	здоров	прервана
4	СВО	X-сц	WAS: c.397G>A	p.E133K	BX	здоров	оставлена
5	СВО	X-сц	WAS: c.560-1G>A	–	BX	здоров	оставлена
6	СВО	X-сц	WAS: c.929_931+ 9delAGGgtgagacc	–	BX	здоров	оставлена
7	СВО	X-сц	WAS: c.1271dupG	p.L425fs	BX	здоров	оставлена
8	ТКИН	X-сц	IL2RG: c.202G>A	p.E68K	BX	здоров	оставлена
8	ТКИН	X-сц	IL2RG: c.202G>A	p.E68K	BX	здоров	оставлена
9	ТКИН	X-сц	IL2RG: c.391C>T	p.Q131*	BX	здоров	оставлена
10	ТКИН	X-сц	IL2RG: c.421C>T	p.Q141*	BX	носитель	оставлена
11	ТКИН	X-сц	IL2RG: c.758-1G>A	–	BX	здоров	оставлена
12	ТКИН	X-сц	IL2RG: c.865C>T	p.R289*	BX	носитель	оставлена
13	ТКИН	X-сц	IL2RG: c.982C>T	p.R328*	BX	здоров	оставлена
14	ТКИН	X-сц	IL2RG: c.546_549delTTTG	p.C182fs	BX	здоров	оставлена
15	ХАГ	X-сц	BTK: c.37C>T	p.R13*	BX	здоров	оставлена
16	ХАГ	X-сц	BTK: c.1167 1171delCCTGG	p.L390fs	BX	здоров	оставлена
17	ХАГ	X-сц	BTK: c.1573C>T	p.R525*	BX	здоров	оставлена
18	ГиперIgM-синдром	X-сц	CD40LG: c.135T>A	p.Y45*	BX	здоров	оставлена
19	ГиперIgM-синдром	X-сц	CD40LG: c.661C>T	p.Q221*	BX	поражен	прервана
20	Синдром Ниймеген	AP	NBN: c.657_661delACAAA	p.K219fs	КЦ	носитель	оставлена
21	Синдром Ниймеген	AP	NBN: c.657_661delACAAA	p.K219fs	АЦ	поражен	прервана
22	Синдром Оменн	AP	RAG1: c.1681C>T	p.R561C	BX	здоров	оставлена
23	ИРЕХ-синдром	X-сц	FOXP3: c.1190G>T	p.R397L	BX	носитель	оставлена
24	Дефицит PI3K	АД	PIK3CD: c.3061G>A	p.E1021K	BX	здоров	оставлена
25	FMF	AP	MEFV: c.2080A>G	p.M694V	BX	здоров	оставлена
26	ГиперIgD-синдром	AP	MVK: c.613A> G/c.1129G>A	p.N205D/p.V377I	BX	поражен	прервана
27	TRAPS-синдром	АД	TNFRSF1A: c.236C>T	p.T79M	BX	здоров	оставлена
28	ХГБ	X-сц	CYBB: c.1165G>C	p.G389R	BX	здоров	оставлена
29	XLP 2-го типа	X-сц	BIRC4: делеция 4 и 5 экз	–	BX	здоров	оставлена
30	ТВН	АД	ELANE: c.452G>C	p.C151S	АЦ	здоров	оставлена

ТН – тип наследования, ИБ – исход беременности, СВО – Синдром Вискотта–Олдрича, ТКИН – тяжелая комбинированная иммунная недостаточность, ХАГ – X-сцепленная агаммаглобулинемия, FMF – семейная средиземноморская лихорадка, ХГБ – хроническая гранулематозная болезнь, XLP 2-го типа – X-сцепленный лимфопролиферативный синдром 2-го типа, ТВН – тяжелая врожденная нейтропения, X-сц – X-сцепленный тип наследования, АД – аутосомно-доминантный тип наследования, AP – аутосомно-рецессивный тип наследования, BX – ворсины хориона, АЦ – амниоцентез, КЦ – кордоцентез.

амелогенина человека, COrDIS Plus, ООО «ГОРДИЗ») методом фрагментного анализа. Набор реагентов включает локусы X и Y хромосом, что использовали для определения пола плода.

ДНК была амплифицирована с использованием ДНК-полимеразы T+SynTaq (Синтол) и специфических праймеров (последовательности праймеров доступны при требовании). Ампликоны определяли методом прямого бидирекционного секвенирования, используя Big Dye Terminator version 1.1 cycle sequencing kit на автоматическом анализаторе ABI 3500xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Анализ проводили с использованием программного обеспечения Variant Reporter и

Sequencing Analysis (Applied Biosystems). Все образцы ДНК плодов были исследованы лишь на предмет наличия конкретных патогенных мутаций, ранее зафиксированных в семьях (см. таблицу).

### Результаты

Генетическое консультирование и последующая ПНД были проведены во всех 30 семьях, где встречались один или несколько детей с диагнозом ПИДС. Соответствующие результаты и обнаруженные мутации суммированы в таблице.

Заборы материала (ворсины хориона, амниоцентез, кордоцентез) не повлияли на течение

беременности у всех женщин, осложнений в ближайшие сроки после забора материала не отмечалось. При анализе 33 образцов ДНК плодов было обнаружено 5 патогенных мутаций в различных генах ПИДС (семьи 1, 19, 21, 26). В 2 из 5 случаях патогенные мутации зафиксированы в гомозиготном состоянии при заболеваниях, передающихся АР-путем (семьи 21, 26). Еще 3 патогенные мутации выявлены у плодов мужского пола при X-сцепленных заболеваниях (семья 1 – две беременности в разные годы и семья 19). 4 мутации в гетерозиготном состоянии были зафиксированы в различных семьях у плодов женского пола при заболеваниях, передающихся X-сц-путем (семьи 10, 12, 20, 23). Во всех 4 случаях беременности были сохранены по решению родителей. Также во всех случаях обнаружения носительства патогенной мутации у плодов женского пола семьи были предупреждены о необходимости проведения ПНД при будущих беременностях родившихся девочек.

У большей части плодов (24 – 72,7%) не были обнаружены мутации, ранее встречавшиеся у больных сиблингов.

Наибольшее количество исследований было проведено в семьях, где диагностированы пациенты с синдромом Вискотта–Олдрича (9 исследований в 6 семьях). В 3 случаях из 9 были обнаружены патогенные мутации, в т.ч. две из них в одной семье (семья 1). У 6 плодов не обнаружено мутаций в гене *WAS*, ранее зафиксированных в семьях у сиблингов, в т.ч. и носителей женского пола. Интересно, что в одной из семей (семья 2) по решению родителей проводили определение пола по анализу свободной ДНК плода, выделенной из крови матери на 5-й неделе беременности. Дальнейшее определение мутации плода проводили в силу зафиксированного в этом исследовании мужского пола будущего ребенка, по результатам которого плод не имел патогенной мутации.

У 8 плодов из 7 семей проводили поиск мутаций в гене *IL2RG* для исключения X-сцепленного варианта тяжелой комбинированной иммунной недостаточности (ТКИН). В 2 случаях было определено носительство патогенной мутации у плодов женского пола (семьи 10 и 12). 6 плодов не имели патогенной мутации. В семье, где ПНД проводили дважды, рождены двое здоровых детей разных полов (семья 8).

В 3 семьях, где встречались пациенты с X-сцепленной агаммаглобулинемией, не обнаружено мутаций у плодов (семьи 15, 16, 17).

Из 2 семей с детьми, страдающими гипер IgM-синдромом, в одном случае патогенная мутация не была обнаружена (семья 18). В другой семье (семья 19) мутация обнаружена у плода мужского пола.

Из 2 семей с детьми с аутосомно-рецессивным ПИДС, синдромом Ниймеген, в одном случае определена мутация плода в гетерозиготном состоянии (семья 20). В другом случае мутация обнаружена в гомозиготном состоянии (семья 21).

Был проведен поиск еще 9 патогенных мутаций плодов в 9 различных генах, приводящих к синдрому Оменн (аутосомно-рецессивный ТКИН), IPЕХ-синдрому, дефициту PI3K, семейной средиземноморской лихорадке (FMF), гипер IgD-синдрому, TRAPS-синдрому, хронической гранулематозной болезни (ХГБ), X-сцепленному лимфопролиферативному синдрому 2-го типа (XLP 2-го типа), тяжелой врожденной нейтропенией (ТВН). Патогенные мутации обнаружены в семье, где уже есть двое больных детей с аутосомно-рецессивным гипер IgD-синдромом (семья 26). Также патогенная мутация в гетерозиготном состоянии найдена в гене *FOXP3* у плода женского пола (семья 23). Во всех случаях, в которых были обнаружены патогенные мутации, беременности были прерваны по решению родителей (семьи 1, 19, 21, 26); одна беременность, при которой у плода не было обнаружено мутации, была прервана по другим причинам (семья 3). Беременности, при которых было выявлено носительство патогенной мутации, были сохранены (семьи 10, 12, 20, 23).

### Обсуждение

Представлены результаты анализа данных ПНД в семьях пациентов с ПИДС. В наблюдаемых нами 30 семьях с детьми с ПИДС результаты проведения ПНД при наступлении очередной беременности позволили прогнозировать рождение 20 здоровых детей, 3 женщины находятся на этапе вынашивания в настоящее время. В 4 случаях знание о носительстве патогенной мутации у плодов женского пола в перспективе может служить профилактикой рождения детей с ПИДС в следующем поколении.

При ПИДС с АР- и X-сц-типами наследования (которые составили большинство в исследуемой группе) ожидаемая частота рождения больного ребенка составляет 25%. В данном исследовании частота выявления патогенных мутаций у плодов оказалась несколько меньше (5 из 33 – 15%), что, возможно, связано с небольшой численностью выборки. Однако нельзя исключить и тот факт, что наличие патогенных мутаций приводит к самопроизвольному прерыванию беременности на очень ранних сроках.

Для X-сцепленных заболеваний возможен вариант определения пола плода на раннем сроке беременности (5–6 недель) по его ДНК, выделенной из крови матери, что позволяет избежать инвазивных методов забора ДНК в случае обнаружения плода женского пола при обязательном информировании родителей о возможном носительстве мутантного гена у ребенка [9]. Определение носительства патогенной мутации в этом случае возможно уже после рождения девочки.

С развитием современных технологий и валидации новых методов становится возможным определение патогенной мутации в ДНК плода, выделенной из крови матери на ранних

сроках беременности (5–6 недель) [9]. В настоящее время стало реальностью проведение преимплантационной диагностики в семьях, в которых встречались генетические заболевания, включая моногенные, к которым относятся ПИДС [10]. В этом случае женщина не подвергается инвазивным процедурам забора биоматериала для выделения ДНК плода и отсутствует необходимость такой инвазивной процедуры, как аборт по медицинским показаниям.

### Заключение

Учитывая трагические судьбы семей, в которых дети с ПИДС прошли тяжелейший путь лечения, иногда с летальным исходом или инвалидизацией, информирование семей о возможности появления гарантированно здорового потомства по результатам проведения ПНД является крайне важным психологическим и социальным фактором. В настоящее время проведение ПНД

возможно лишь в тех семьях, в которых диагноз ПИДС подтвержден молекулярно-генетически. Развитие методов генетической диагностики дает шанс семьям с недифференцированными на настоящий момент первичными иммунодефицитами планировать рождение здоровых детей.

**Благодарность:** авторы статьи выражают благодарность за сотрудничество коллегам из НМИЦ АГП им. Кулакова за содействие в проведении забора материала плода.

**Финансирование и конфликт интересов:** авторы статьи подтвердили отсутствие финансовой поддержки исследования, о которой необходимо сообщить.

Kuzmenko N.B.  0000-0002-1669-8621

Mukhina A.A.  0000-0002-3305-1694

Brilliantanova V.V.  0000-0003-0079-7761

Raykina E.V.  0000-0002-7634-2053

Novichkova G.A.  0000-0002-2322-5734

Shcherbina A.Yu.  0000-0002-3113-4939

### Литература

1. Picard C, Bobby Gaspar H, Al-Herz W, Aziz Bousfiha A, Casanova J-L, Chatila T, Crow YJ, Cunningham-Rundles S, Etzioni A, Franco JL, Holland SM, Klein C, Morio T, Ochs HD, Oksenhendler E, Puck J, Tang MLK, Tangye SG, Torgerson TR, Sullivan KE. International Union of Immunological Societies: 2017 Primary Immunodeficiency Diseases Committee Report on Inborn Errors of Immunity. *J. Clin. Immunol.* 2017; 38 (1): 96–128.
2. Bousfiha A, Jeddane L, Picard C, Ailal F, Bobby Gaspar H, Al-Herz W, Chatila T, Crow YJ, Cunningham-Rundles S, Etzioni A, Franco JL, Holland SM, Klein C, Morio T, Ochs HD, Oksenhendler E, Puck J, Tang MLK, Tangye SG, Torgerson TR, Casanova J-L, Sullivan KE. The 2017 IUIS Phenotypic Classification for Primary Immunodeficiencies. *J. Clin. Immunol.* 2017; 38 (1): 129–143.
3. Кузьменко Н.Б., Варламова Т.В., Мерсиянова И.В., Райкина Е.В., Бобрынина В.О., Щербина А.Ю. Молекулярно-генетическая диагностика первичных иммунодефицитных состояний. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии.* 2016; 15 (1): 10–16.
4. Primary immunodeficiency diseases: a molecular and genetic approach. Ochs HD, Smith CIE, Puck JM, eds. 2<sup>nd</sup> ed. Oxford University Press, 2007; Pt 2.
5. Кузьменко Н.Б., Щербина А.Ю. Классификация первичных иммунодефицитов как отражение современных представлений об их патогенезе и терапевтических подходах. *Российский журнал детской гематологии и онкологии.* 2017; 4 (3): 51–57.
6. El Hawary RE, Meshal SS, Abd Elaziz DS, Elsharkawy MA, Alkady RS, Lotfy S, El-Sheikhah A, Hassan A, Galal NM, Boutros JA, Elmarsafy AM. Genetic Counseling in Primary Immunodeficiency Disorders: An Emerging Experience in Egypt. *Mol. Diagn. Ther.* 2017 Dec; 21 (6): 677–684.
7. ESID Registry – Working Definitions for Clinical Diagnosis of PID. Available at: <http://esid.org/Working-Parties/Registry/DiagnosisCriteria>.
8. Ochs HD, Hitzig WH. History of primary immunodeficiency diseases. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2012; 12 (6): 577–587.
9. Skrzypek H, Hui L. Noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidy and single gene disorders. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology.* 2017; 42: 26–38.
10. Lu L, Lv B, Huang K, Xue Z, Zhu X, Fan G. Recent advances in preimplantation genetic diagnosis and screening. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2016; 33 (9): 1129–1134.