
Консенсус по использованию и интерпретации анализа мутаций при муковисцидозе в клинической практике

C. Castellani ^{a,*}, H. Cuppens ^b, M. Macek Jr.^c, J.J. Cassiman ^b, E. Kerem ^d, P. Durie ^e, E. Tullis ^f, B.M. Assael ^a, C. Bombieri ^g, A. Brown ^h, T. Casals ⁱ, M. Claustres ^j, G.R. Cutting ^k, E. Dequeker ^b, J. Dodge ^l, I. Doull ^m, P. Farrell ⁿ, C. Ferec ^o, E. Girodon ^p, M. Johannesson ^q, B. Kerem^r, M. Knowles ^s, A. Munck ^t, P.F. Pignatti ^g, D. Radojkovic ^u, P. Rizzotti ^v, M. Schwarz ^w, M. Stuhmann ^x, M. Tzetis ^y, J. Zielenski ^e, J.S. Elborn ^z

^a Cystic Fibrosis Centre, Ospedale Civile Maggiore, Verona, Italy. ^b Center for Human Genetics, Campus Gasthuisberg, KULeuven, Belgium. ^c Department of Biology and Medical Genetics, Charles University Prague-2nd School of Medicine and University Hospital Motol, Czech Republic. ^d Department of Pediatrics and CF Center, Hadassah University Hospital, Jerusalem, Israel. ^e The Hospital for Sick Children and the University of Toronto, Toronto, Canada. ^f Adult Cystic Fibrosis Program, St Michael's Hospital and the University of Toronto, Canada. ^g Section of Biology and genetics, University of Verona, Italy. ^h UK CF Trust Representative, United Kingdom. ⁱ Centre de Genetica medica i Molecular, Barcelona, Spain. ^j Service de Genetique Moleculaire, CHU and INSERM U827, Montpellier, France. ^k Johns Hopkins University, Baltimore, USA. ^l Department of Child Health, University of Wales Swansea, UK. ^m Respiratory/Cystic Fibrosis Unit, Children's Hospital for Wales, Cardiff, UK. ⁿ UW School of Medicine and Public Health, Madison, USA. ^o Laboratoire de Genetique Moleculaire, Brest, France. ^p Service de Biochimie et de Genetique, Hopital Henri Mondor, Creteil, France. ^q Medical Products Agency, Uppsala, Sweden. ^r Department of Genetics, Life Sciences Institute, Hebrew University, Jerusalem, Israel. ^s Cystic Fibrosis/Pulmonary Research and Treatment Center, University of North Carolina, Chapel Hill, USA. ^t Cystic Fibrosis Centre, Hospital Robert Debre, Paris, France. ^u Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, Belgrade, Serbia. ^v Laboratorio Analisi Chimico Cliniche, Ospedale Civile Maggiore, Verona, Italy. ^w Department of Medical Genetics, St Mary's Hospital, Manchester, UK. ^x Institut für Humangenetik, Medizinische Hochschule Hannover, Germany. ^y Department of Medical Genetics; Athens University, Medical School, Greece. ^z Adult CF Centre, Queen's University, Belfast, UK

Документ получен 29 декабря 2007 г., принят 14 марта 2008 года

Сокращения: ACMG (АКМГ) – Американская Коллегия по Медицинской генетике (<http://www.acmg.net//AM/>); CBAVD – двустороннее врожденное отсутствие семявыносящего протока (Congenital Bilateral Absence Of The Vas Deferens); MB – муковисцидоз; MB-EQA – внешняя оценка качества при диагностике муковисцидоза (External Quality Assessment); CFGAC – Консорциум по генетическому анализу при муковисцидозе (Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium (<http://www.genet.sickkids.on.ca>)); MBTP – муковисцидозный регулятор трансмембранной проводимости; ЭДГГ – электрофорез в денатурирующем градиентном геле; ВЭЖХД – высокоэффективная жидкостная хроматография в денатурирующих условиях; СДИО – синдром дистальной интестинальной обструкции, ЭNaK – эпителиальные натриевые каналы; HGVS – Общество по изучению нарушений генома человека (Human Genome Variation Society (<http://www.hgvs.org/>)); HRMCA – анализ кривой плавления с высокой разрешающей способностью (High-Resolution Melting Curve Analysis); HUGO – Международная организация по изучению генома человека (Human Genome Organization (<http://www.hugo-international.org/>)); IFHGS – Международная федерация сообществ по изучению генетики человека (International Federation of Human Genetics Societies (<http://www.ifhgs.org/>)); МИ – мекониальный илеус; MLPA – метод мультиплексной амплификации проб с помощью лигирования (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification); OECD – Организация по экономической кооперации и развитию (Organization for Economic Co-operation and Development (<http://www.oecd.org/>)).

Резюме

Для клиницистов, занимающихся проблемой муковисцидоза (MB), интерпретация результатов молекулярного генетического анализа и внедрение их в диагностический процесс зачастую вызывают затруднения. Ограниченные возможности технологии генотипирования, выбор тестируемых мутаций, а также клинический контекст, в котором проводится тест – все это может повлиять на интерпретацию генетической информации. В настоящей статье приводятся принятые на Согласительной конференции выводы по использованию и интерпретации анализа мутаций при муковисцидозе в клинических условиях.

Несмотря на то, что диагноз MB обычно не оставляет сомнений, необходимо уделить внимание проведению и интерпретации генетических тестов: на основании информации о генотипе нельзя окончательно судить о клиническом диагнозе MB или нарушений, связанных с муковисцидозным регулятором трансмембранной проводимости (MBTP). Диагноз этих состояний основан, в первую очередь, на клинических проявлениях, и подтверждается оценкой функции MBTP (потовый тест, тест разности назальных потенциалов) и генетическим анализом. Ни один из этих методов сам по себе не является достаточным для установки диагноза MB или связанных с MBTP нарушений.

Обширные связи между генотипом и фенотипом полезны при проведении эпидемиологических исследований, однако по генотипу MBTP невозможно точно прогнозировать исход у конкретного пациента. Использование генотипа MBTP для прогнозирования исхода у пациентов с MB во время установки им диагноза не рекомендуется.

Необходимо подчеркнуть важность взаимодействия между клиницистами и медицинскими генетическими лабораториями. Результаты тестирования и их значение следует представлять клиницистам, занимающимся лечением пациентов с MB, в понятной им форме.

© 2008 Европейское общество муковисцидоза. Материал опубликован Elsevier B.V. Все права защищены.

Ключевые слова: муковисцидоз; MBTP; генетический анализ; диагностика; взаимосвязь между генотипом и фенотипом

* Автор для переписки. Тел.: +39045 8122293.

Адрес электронной почты: carlo.castellani@azosp.vr.it (К. Кастеллани [C. Castellani]).

© 2008 Европейское общество муковисцидоза. Материал опубликован Elsevier B.V.

Содержание

1. Мутации в гене МВТР и их анализ	3
1.1. Распределение мутаций	3
1.2. Методы генетического анализа	6
1.3. Контроль качества	7
2. Роль генетического анализа для установления диагноза МВ.	8
2.1. Мутации, приводящие к развитию МВ	9
2.2. Комплексные аллели	11
2.3. Не имеющие отношение к МВТР гены, приводящие к развитию МВ-подобного клинического синдрома	12
3. Использование генетического анализа для прогнозирования исхода	13
3.1. Генотип МВ и состояние функции поджелудочной железы	14
3.2. Генотип МВ и поражение легких	16
3.3. Мутации при МВ и другие проявления заболевания	16
3.4. Мутации гена МВТР в контексте развития связанных с МВТР нарушений	17
3.5. Гены модификаторы	18
4. Передача результатов анализа	18
4.1. От клинициста в лабораторию молекулярной генетики	18
4.2. Из лаборатории молекулярной генетики клиницисту	20
4.3. Номенклатура мутаций	21
4.4. Обследование и скрининг носителей	22
5. Положение о конфликте интересов	22
6. Участники консенсуса	22
Благодарности	22
Список литературы	22
Словарь терминологии	27

О гене муковисцидозного регулятора трансмембранной проводимости (МВТР) с момента его обнаружения (в 1989 г.) опубликовано огромное количество материалов [1–3]. Значительное усовершенствование методик молекулярного анализа позволило идентифицировать более чем 1500 мутаций гена МВТР [4], и в настоящее время высокочувствительные методы обнаружения мутаций доступны для большинства популяций и этнических групп пациентов. Значительные успехи в области молекулярной генетики необходимо сочетать с таким же прогрессом в клинической интерпретации и взаимодействии с клиницистами. Значение редко встречающихся мутаций для диагностики заболевания, взаимосвязь генотипа и фенотипа у конкретного пациента, а также клиническая значимость сложных аллелей и генов-модификаторов – вот проблемы, в отношении которых вопросов зачастую возникает больше, чем имеется ответов. Для клиницистов, занимающихся проблемой муковисцидоза (МВ), интерпретация результатов молекулярно-генетического анализа и внедрение их в диагностический процесс зачастую вызывают затруднения.

23–24 марта 2007 года в г. Гарда (Италия) прошла Согласительная конференция, организованная Европейским обществом муковисцидоза (www.ecfsoc.org) в сотрудничестве с Европейским обществом по изучению генетики человека (www.eshg.org) и сетью профессионального усовершенствования EuroGentest (EuroGentest Network of Excellence (www.eurogentest.org)). Ее основной целью было предоставить клиницистам, занимающимся проблемой МВ, информацию в отношении использования генетического анализа при МВ с максимальной эффективностью. Тридцать высококвалифицированных специалистов в области муковисцидоза и молекулярной генетики из Европы и Северной Америки приняли участие в консультациях перед проведением конференции и в подготовке предварительных документов, а двадцать три приняли участие в заседании. На конференции было уделено внимание широкому спектру проблем, в том числе техническим стандартам анализа МВТР, распределению мутаций, сложным аллелям, применению генетического анализа для диагностики муковисцидоза, взаимосвязи генотипа с фенотипом (включая возможное влияние генов-модификаторов), а также организации надлежащей передачи результатов генетического анализа. Настоящий документ – это результат работы Согласительной конференции.

1. Мутации в гене *MBTP* и их анализ

1.1. Распределение мутаций

Муковисцидоз вызывается мутациями в гене *MBTP* (*ABCC7*) [1–3]. Чаще всего встречается мутация F508del, ранее обозначавшаяся как ΔF508, которая составляет две трети всех мутаций в гене *MBTP*, при этом отмечается уменьшение преобладания этого вида мутации с севера на юг Европы [5–10]. Оставшаяся треть, это менее 20 мутаций, отличающихся значительной гетерогенностью и встречающихся во всем мире с частотой более 0,1% [4, 11]. В некоторых популяциях ряд мутаций имеют более высокую частоту встречаемости, что обусловлено «эффектом основателя» в религиозных, этнических или географических изолятах [12, 13] (таблицы 1 и 2).

Большинство мутаций в гене *CFTR* наблюдается в европейских популяциях [6]. Мутации *MBTP* существуют и в неевропейских популяциях, например, в африканской или восточноазиатской популяции [14], однако ни одна мутация не встречается со столь высокой частотой, как F508del.

ВОЗ [11] вместе с Vobadilla и соавт. провели анализ распределения мутаций *MBTP*, приводящих к развитию МВ [15]. Примерно в двух третях всех случаев был проведен анализ всей кодирующей области гена *MBTP*, и поэтому в данных отчетах сведения о некоторых мутациях, которые было легче выявить, представлены с избытком по сравнению с теми мутациями, которые было сложнее установить с технической точки зрения. Аналитические материалы не содержат данных о внутргенных перестройках и включают ограниченные сведения о мутациях, встречающихся в неевропейских популяциях. В настоящее время осуществляется проект по обновлению данных предыдущего анализа, выполненного ВОЗ.

К настоящему времени в пределах гена *MBTP* установлено более 1500 изменений последовательности нуклеотидов, и их перечень непрерывно обновляется в базе данных Консорциума по генетическому анализу муковисцидоза (CFGAC) [4]. 42% содержащихся в базе данных мутаций составляют миссенс-мутации, 15% – мутации со сдвигом рамки считывания, 12% – сплайсинг-мутации, около 10% – нонсенс-мутации, 2% – мутации, обусловленные делецией\инсерцией нуклеотидов в пределах рамки генетического кода, 3% – обширные делеции\инсерции нуклеотидов, 0,5% – мутации промотерных участков, и 15% составляют вариации последовательностей нуклеотидов, которые (как предполагается) не приводят к развитию заболевания. Крайне редко встречаются мутации *de novo* и однородительская дисомия хромосомы, несущей мутантный ген *MBTP*.

Вывод: мутации в гене *MBTP* имеют различия по частоте встречаемости и распределению в различных популяциях. Во всем мире лишь очень небольшое количество мутаций встречается с частотой более 0,1%, однако в ряде популяций некоторые из них могут значительно превалировать над другими.

Таблица 1. Географическое распределение наиболее часто встречающихся мутаций

E60X	жители Южной Европы	S549N	индийцы
CFTR	жители славянских стран – стран Восточной Европы	G551D	жители Великобритании, стран Центральной Европы
R75X	жители стран Южной Европы, проживающие в США латиноамериканцы	Q552X	жители стран Южной Европы, итальянцы
394delTT	жители скандинавских стран – регион Балтийского моря	R553X	жители стран Центральной Европы
G85E	жители стран Южной Европы	A559T	афроамериканцы
406 –1G>A	проживающие в США латиноамериканцы	R560T	жители Северной Ирландии
R117H	популяции лиц европейского происхождения	1811+1.6 kbA>G	испанцы, проживающие в США латиноамериканцы
R117C	жители стран Северной Европы	1898+1G>A	жители Великобритании, стран Центральной Европы
621+1G>T	жители стран Южной Европы	1898+5G>T	популяции, населяющие территорию Восточной Азии
711+1G>T	французы, франкоканадцы	2143delT	жители славянских стран — стран Восточной Европы

711+5G>A	проживающие в США латиноамериканцы	2183delAA>G	жители стран Южной Европы, Среднего Востока, иранцы, жители стран Латинской Америки
L206W	испанцы, проживающие в США латиноамериканцы	2184delA	популяции лиц европейского происхождения
V232D	испанцы, проживающие в США латиноамериканцы	2789+5G>A	популяции лиц европейского происхождения
1078delT	жители провинции Бретань (Франция)	Q890X	жители стран Южной Европы
R334W	жители стран Южной Европы, стран Латинской Америки	3120+1G>A	африканцы, арабы, афроамериканцы, жители Южной Европы
1161delC	индийцы	3272–26A>G	популяции лиц европейского происхождения
R347P	популяции лиц европейского происхождения, жители стран Латинской Америки	3659delC	жители Скандинавских стран
R347H	турки	3849+10kbC>T	евреи ашкенази, жители стран Южной Европы, Среднего Востока, иранцы, индийцы
A455E	голландцы	R1066C	жители стран Южной Европы
1609delCA	испанцы, проживающие в США латиноамериканцы	Y1092X(C>A)	жители стран Южной Европы
1506T	жители стран Южной Европы, испанцы	M1101K	жители США – гуттериты
1507del	популяции лиц европейского происхождения	3905insT	швейцарцы
F508del	популяции лиц европейского происхождения	D1152H	популяции лиц европейского происхождения
1677delTA	жители стран Южной Европы, Среднего Востока	R1158X	жители стран Южной Европы
1717-G>A	популяции лиц европейского происхождения	R1162X	итальянцы, американские индейцы, жители стран Латинской Америки
V520F	ирландцы	S1251N	популяции лиц европейского происхождения
G542X	жители стран Южной Европы, Средиземноморья	W1282X	евреи ашкенази, жители стран Среднего Востока
S549R(T>G)	жители стран Среднего Востока	N1303K	жители стран Южной Европы, Среднего Востока

Пояснение: представленные аллели встречаются в указанных популяциях с частотой более 0,1%. Обусловленные небольшим количеством ограничения обсуждаются в другом документе [144]; термин «европейское происхождение» означает присутствие мутации в Европе, а также (вследствие иммиграции) в Америке, Австралии и т. д. Источники: [4, 15, 11, 30, 144–150].

Таблица 2. Мутации в гене MBTP в избранных популяциях

На территории Европы		На территории Среднего Востока	
2184insA	жители стран Центральной Европы	I1234V	жители государства Бахрейн
I336K	жители стран Центральной Европы	Q359K/T360K	грузинские евреи
574delA	жители стран Центральной Европы, французы	3130delA	иранцы
4374+1G>T	жители стран Восточной Европы	H139L	жители Саудовской Аравии

S1196X	эстонцы, финны, русские	1548delG	жители Саудовской Аравии
3732delA	эстонцы, финны, русские	S466X	турки, греки, иранцы, индийцы
W846X1	жители провинции Бретань (Франция)	Y569D	жители Великобритании – выходцы из Пакистана
Q220X	французы, болгары		
S945L	жители стран Центральной Европы, французы	жители стран Восточной Азии	
L1065P	французы, итальянцы	1898+5G>T	китайцы, жители Таиланда
L1077P	французы, итальянцы	3121– 2A>G	японцы
4016insT	французы, итальянцы, швейцарцы	K166E	корейцы
Y122X	французы, жители острова Реюньон		
2711delT	французы, испанцы	латиноамериканцы	
S1235R	французы, испанцы	Q98R	
1525–1G>A	немцы (Тюрингия)	663delT	
L346P	греки-киприоты	H199Y	
E822X	греки, турки	P205S	
R352Q	ирландцы, итальянцы	935delA	
852del22	итальянцы (Апулия)	1288insTA	
T338I	итальянцы (Сардиния)	2055del9>A	
A561E	португальцы	2105del13insAGAAA	
45TAT>G	жители Северных Балкан	3171delC	
P67L	шотландцы	3199del6	
1154insTC	жители стран Южной Европы	3876delA	
4005+1G>A	жители стран Южной Европы		
405+1G>A	жители стран Южной Европы	афроамериканцы – жители США	
D110H	жители стран Южной Европы	405+3A>C	
E585X	жители стран Южной Европы	444delA	
L558S	жители стран Южной Европы	F311del	
Q493X	жители стран Южной Европы	G330X	
R1066H	жители стран Южной Европы	G480C	
G1244E	жители стран Южной Европы	A559T	
G178R	жители стран Южной Европы	2307insA	
E92K	жители стран Южной Европы, турки	3196del54	
R1070Q	жители стран Южной Европы, турки	3791delC	
W1089X(TAG)	жители стран Южной Европы, турки	S1255X	
W1204X	жители стран Южной Европы, проживающие в США	D1270N	
	латиноамериканцы		
		коренные американцы	
1812–1G>A	жители стран Южной Европы, проживающие в США	D648V	
	латиноамериканцы	L1093P	
		R1162X	
S492F	жители стран Южной Европы, проживающие в США		латиноамериканцы
K710X	жители Северной Франции, испанцы		
V232D	испанцы		

712-1G>T	испанцы	
A1006E	испанцы	
Q890X	испанцы, проживающие в США латиноамериканцы	Ссылки
2869insG	испанцы (Каталония)	[11, 15, 30, 144 –150]
2043delG	турки, греки	

В таблицу включены мутации, приводящие к развитию МВ и связанных с МВТР нарушений. Ряд мутаций можно найти в нескольких столбцах.

1.2. Методы генетического анализа.

Методы генетического анализа *МВТР* должны обладать более чем 95%-ной вероятностью обнаружения мутаций, однако высокая гетерогенность *CFTR* мутаций в различных популяциях делает эту задачу крайне сложной. Следует приложить достаточно много усилий, чтобы определить частоту *CFTR* мутаций специфичных для отдельно взятой популяции и разработать метод анализа с достаточно высоким уровнем чувствительности. Для этого, лаборатории, которые предоставляют свои услуги отдельным этническим популяциям, должны рассмотреть вопрос о создании наборов мутаций, специфичных для данной популяции [16]. Для идентификации мутаций в гене *МВТР* у пациентов, которым установлен диагноз МВ, могут применяться различные методы анализа, тогда как родственникам пациентов с МВ в первую очередь следует проводить анализ на «семейную» мутацию. Для определенных целей диагностического тестирования может быть целесообразным проведение расширенного анализа мутаций, однако в настоящее время для стандартного скринингового обследования носителей мутаций этот анализ не рекомендуется [17].

Получены доказательства того, что группа *внутригенных перестроек* (т. е. больших делеций и, в меньшей степени, инсерции нуклеотидов) [18] составляет около 1–3% всех мутаций в гене *МВТР*. Обширные делеции и/или инсерции нуклеотидов, выявленные до настоящего времени, локализируются главным образом вблизи 2–3 и 17 b экзонов гена *МВТР*. Эти делеции являются редкими, за исключением *CFTR*dele2,3 (21 kb), на долю которой приходится 6% всех мутаций в славянской популяции [19]. Эти аллели лучше всего изучать методом мультиплексной амплификации проб с помощью лигирования (MLPA), либо с помощью количественной мультиплексной ПЦР с флуоресцентным детектированием [20, 21].

Методы выявления мутаций (DGGE, DHPLC, HRMCA) были разработаны для последовательного изучения гена (от экзона к экзону) в отношении отклонений, и чаще всего применяются в качестве анализа «второго этапа» после проведения скринингового анализа на частые мутации. Измененные образцы отправляют на сиквенс для определения нуклеотидной последовательности. Сканирующие методики все еще широко распространены, хотя уже появилась возможность определять последовательность нуклеотидов во всем гене *МВТР* в рамках одного диагностического метода [22]. Тем не менее, сканирующие методики поиска мутаций несут в себе значительный риск необнаружения мутаций, особенно гомозиготных аллелей, и даже при полном секвенировании гена небольшой риск все же остается. Секвенирование также применяется в тех случаях, когда искомую мутацию невозможно определить альтернативным прямым методом анализа – например, когда исчерпан себя специфичный для данной популяции метод анализа, и/или были исключены мутации, которые встречаются с частотой не менее 0,5%. Если будет определена редкая миссенс-мутация, следует обратить внимание на то, чтобы не допустить чрезмерной интерпретации ее значимости в отношении причинной связи с заболеванием.

Совместное использование всех этих методов не может гарантировать определение обеих мутировавших аллелей у всех пациентов с МВ [18, 23–25], 1–5% из аллелей МВ остаются не идентифицированными. С помощью используемых в настоящее время протоколов анализа мутаций гена *МВТР* невозможно определить регуляторные мутации гена *МВТР*, расположенные на отдаленных от гена участках или внедренные в области гена, не отвечающие за кодирование [26]. В данное время проводится исследование по определению возможных мутаций в потенциальных регуляторных элементах, в том числе в промоторе гена [27], высококонсервативных сегментах ДНК, на участках с повышенной чувствительностью к ДНКазе, и/или в отдаленных регуляторных элементах [28]. Предполагается, что мутации этого типа приводят к прекращению или снижению продукции функционально активного *МВТР* [29], и могут быть связаны с целым спектром клинических проявлений – от классической формы МВ до связанных с *МВТР* нарушений.

В небольшом количестве семей с МВ, в которых была найдена всего одна мутация гена *МВТР* (или вообще не было найдено мутаций), сегрегационный анализ полиморфизмов может способствовать идентификации изменений в гене *CFTR*, приводящих к развитию заболевания. Множество информативных маркеров имеется как в самом гене *МВТР*, так и в прилегающих к нему участках. Рекомендуется включать в анализ несколько маркеров, и тогда диагноз МВ в указанном случае будет точно установлен. В идеале, следует использовать интрагенные и экстрагенные маркеры, поскольку риск неидентифицируемой ре-

комбинации между маркером и участком мутации ниже в том случае, если имеет место конкордантность фланкирующих маркерных последовательностей. Кроме того, при попытке установить диагноз в пренатальном периоде следует проводить анализ различных маркеров в локусах различных хромосом, что является дополнительной защитой в отношении контаминирования ребенка от организма матери.

Вывод: имеющийся в настоящее время спектр аналитических методов для определения мутаций в гене *MBTP* охватывает диапазон от тестов, позволяющих обнаружить чаще всего встречающиеся аллели, приводящие к развитию заболевания, до расширенных протоколов сканирующих/секвенирующих методик, которые позволяют обнаружить новые мутации, и методов выявления обширных перестроек гена. Тем не менее, даже самые расширенные скрининговые тесты для обнаружения мутаций в гене *MBTP* не способны определить все аллели *MB* в большинстве популяций пациентов с *MB*.

1.3. Контроль качества

Основанные на изучении ДНК анализы проводятся в различных условиях, включая научно-исследовательские лаборатории, клинические лаборатории по изучению молекулярной генетики, а также частные лаборатории. Поскольку доступные на рынке наборы предназначены для определения лишь ограниченного количества мутаций и являются дорогостоящими, многие лаборатории, особенно в менее развитых странах, применяют свои собственные внутренние методики проведения анализа, которые обычно не поддаются автоматизации и не подвергаются строгой стандартизации. Для этих методик характерен более высокий риск получения неправильных результатов.

В проживающих на территории Южной Европы популяциях, в которых наблюдается высокая молекулярная гетерогенность, доступные на рынке наборы для анализа мутаций охватывают всего 50–75% аллелей, и для генетического анализа, проводимого с целью диагностики *MB*, могут применяться сканирующие/секвенирующие методики [8,30].

Диагностическая работа должна быть организована в виде двух этапов: 1-й этап (т. е. «местный анализ»), на котором проводится исследование только на часто встречающиеся мутации, в идеале – с достижением 75–85%-ной вероятности обнаружения приводящих к развитию *MB* аллелей у пациентов с точно установленным фенотипом, и 2-й этап, представленный ограниченным количеством государственных и/или региональных экспертных лабораторий, в которых проводится анализ менее часто встречающихся мутаций с использованием более сложных методик, с целью достижения максимально возможной вероятности обнаружения мутаций [31–33]. Каждая лаборатория обязана доказать, что с помощью проводимых в ней анализов можно неизменно устанавливать правильный генотип в условиях нормального режима работы. Для оценки качества генетического анализа при муковисцидозе создана программа внешней оценки качества (EQA) при диагностике муковисцидоза [34]. Программа EQA направлена на обучение ее участников, чтобы они могли достигнуть стандартов высокого качества, а регулярное участие в программе EQA является неотъемлемой частью процесса контроля качества и требованием для аккредитации лабораторий. Источники ошибок отличаются разнообразием и включают административные ошибки, методические ошибки, или неправильную интерпретацию методически правильных результатов. Использование только доступных в продаже наборов не может гарантировать высокую точность анализа на мутации, что подчеркивает значимость проверки достоверности результатов всех генетических исследований в лаборатории и необходимость создания сети лабораторий на региональном или государственном уровне.

Клиницистам следует знать о том, что качество анализа сопряжено с диагностическими процедурами проверки достоверности результатов и непрерывным улучшением качества работы лаборатории благодаря использованию самых последних норм Международной организации по стандартизации (ISO) или Национального Соглашения в области молекулярной генетики. Минимальным стандартом для стран, не имеющих системы национальных соглашений, является «сертификация» (т. е. стандарт ISO 9001), тогда как лаборатории в наилучшем случае должны быть аккредитованы в соответствии со стандартом ISO 17025 или 15189, что обеспечивает устойчивое и продолжительное улучшение стандартов лабораторных анализов. Сеть профессионального усовершенствования EuroGentest (EuroGentest FP6 Network of Excellence, www.eurogentest.org) вместе с порталом Orphanet (www.orpha.net) создали базу данных контроля качества, в которой клиницисты, желающие получить информацию, смогут выбрать аккредитованную или сертифицированную лабораторию.

Рекомендации: клиницисты, желающие получить информацию, должны использовать диагностические услуги в области молекулярной генетики, предоставляемые сертифицированными и/или аккредитованными лабораториями.

2. Роль генетического анализа для установления диагноза МВ.

Диагноз МВ основывается на наличии соответствующего фенотипа и доказательств нарушения функции канала *МВТР* (не соответствующая норме концентрация хлоридов в поте, или отклонения в результатах теста разности назальных потенциалов), или обнаружении двух приводящих к развитию МВ мутаций, находящихся в *транс-положении* [35]. Потовый тест с определением концентрации хлоридов до сих пор является золотым стандартом при подтверждении диагноза МВ [35,36]. В большинстве случаев диагноз МВ ясен и установить его не представляет трудности: клинические проявления имеют типичный характер, а несоответствие норме концентрации хлоридов в поте подтверждает клинический диагноз. В подобных ситуациях проведение генетического анализа не является строго обязательным, хотя он может оказаться полезным для подтверждения диагноза и выявления носительства мутации среди членов семьи, а также для проведения пренатальной диагностики. У менее значительной доли пациентов, в частности, у пациентов, являющихся носителями одной или нескольких мутаций, при которых не страдает экзокринная функция поджелудочной железы, концентрация хлоридов в поте может находиться в пределах нормальных значений, регистрируемых у пациентов контрольной группы. У некоторых из этих пациентов (при условии, что у них имеют место соответствующие клинические проявления) генетический анализ может подтвердить диагноз МВ [35–37].

С точки зрения генетики термин «мутация» определяется как молекулярная перестройка в последовательности нуклеотидов ДНК гена. Поэтому данное определение не позволяет сделать никаких предположений относительно потенциального влияния мутации на экспрессию или функцию производного белка. Таким образом, с точки зрения клинических последствий мутации могут быть нейтральными, вредными или даже «полезными». Другой часто употребляемый термин – полиморфизм – определяется как изменение нуклеотидной последовательности ДНК, частота которого в общей популяции составляет не менее 1% случаев. Принимая во внимание высокую частоту встречаемости, ранее считалось, что полиморфизм не имеет клинических последствий. Очевидно, что это предположение неверно. Известно, что в ряде случаев полиморфизм в гене *МВТР* оказывает влияние на степень тяжести заболевания у субъектов с МВ [38, 39]. Более того, полиморфизм в других генах (так называемых генах-модификаторах) явно оказывает влияние на степень тяжести МВ.

Мутации гена *МВТР* могут быть объединены в четыре группы, в соответствии с прогнозируемыми клиническими последствиями этих мутаций:

- А. Мутации, которые приводят к развитию МВ.
- Б. Мутации, которые приводят к развитию связанных с *МВТР* нарушений.
- В. Мутации без установленных клинических последствий.
- Г. Мутации, имеющие недоказанную или неопределенную клиническую значимость.

Таблица 3. Примеры мутаций гена *МВТР*, классифицированные по их клиническим последствиям

Группа мутаций	Примеры
А. Приводящие к развитию МВ	F508del, R553X, R1162X, R1158X, 2184delA, 2184insA, 3120+ 1G>A, I507del, 1677delTA, G542X, G551D, W1282X, N1303K, 621 + 1G>T, 1717–1G>A, A455E, R560T, G85E, R334W, R347P, 711+1G>T, 711+3A>G(*), 1898+1G>A, S549N, 3849+10kbc>T, E822X, 1078delT, 2789+5G>A, 3659delC, R117H-T5(*), R117H-T7(*), D1152H(*), L206W(*), TG13-T5(*)
Б. Приводящие к развитию связанных с <i>МВТР</i> нарушений	R117H-T7(*), TG12-T5(*), R117H-T5(*), D1152H(*), TG13-T5(*), S997F, R297Q(*), L997F, M952I, D565G(*), G576A(*), TG11-T5(**), R668C-G576A-D443Y, R74W-D1270N
В. Не имеющие клинических проявлений	I148T, R75Q, 875+40A/G, M470V, E528E, T854T, P1290P, 2752–15G/C, I807M, I521F, F508C, I506V, TG11-T5(**)
Г. Имеющие неизвестную или неопределенную клиническую значимость	В основном это миссенс-мутации (***)

(*) мутации, которые могут принадлежать и к группе А, и к группе Б.

(**) мутации, которые могут принадлежать и к группе Б, и к группе В.

(***) определенные часто встречающиеся варианты последовательности нуклеотидов (миссенс-мутации) с бессимптомными последствиями на молекулярном уровне (например, M470 V) могут cosegregировать в пределах одной хромосомы и оказывать более мощное, кумулятивное фенотипическое действие. Подобные поливариантные гаплотипы потенциально могут приводить к развитию заболевания [56].

Детальная характеристика была получена лишь для части мутаций и пациентов и (за исключением часто встречающихся мутаций) для изучения большинства мутаций в наличии имелось лишь ограниченное количество образцов. Представленные здесь данные следует интерпретировать с осторожностью.

Группы А и Б частично перекрывают друг друга, поскольку ряд мутаций в одних случаях могут обнаруживаться при МВ с нормальной функцией поджелудочной железы, а в других случаях – при *МВТП-обусловленных моносимптомных* нарушениях. У носителей мутации D1152H в сочетании с F508del может наблюдаться спектр клинических проявлений от синдрома СВАВД до МВ с нормальной функцией поджелудочной железы и клиникой поражения легких. Такие факторы, как связанное с возрастом прогрессирование болезни, условия окружающей среды, а также гены-модификаторы, оказывают влияние на разнообразие клинических проявлений у пациентов, являющихся носителями этих «пограничных» мутаций.

В таблице 3 перечисляется ряд мутаций гена *МВТП*, классифицированных по их клиническим последствиям.

Вывод: мутационный анализ может применяться для установления диагноза МВ у пациентов с соответствующими клиническими проявлениями. Мутации в гене *МВТП* могут: а) приводить к развитию МВ; б) иметь отношение к развитию связанных с *МВТП* нарушений; в) не иметь клинических последствий; г) иметь недоказанную или неопределенную клиническую значимость.

2.1. Мутации, приводящие к развитию МВ

Изучение функциональной активности белка *МВТП* *ex vivo* может помочь выявить нарушения последовательности нуклеотидов, которые приводят к развитию заболевания. *In vivo* оценка CFTR-опосредованного транспорта хлоридов может быть осуществлена косвенным путем с помощью измерения концентрации хлоридов пота, разности назальных потенциалов или определения транспорта хлоридов в биоптате слизистой оболочки прямой кишки.

Эмпирические доказательства, полученные в отношении наиболее часто встречающихся мутаций и/или очевидный патогенный молекулярный механизм, присущий *инсерциям, делециям и нонсенс-мутациям*, прямо указывает на то, что они принадлежат к группе мутаций, приводящих к развитию МВ.

При *сплайсинг-мутациях*, которые приводят к полному прекращению распознавания экзона (таких как 621+1G>T, 711+1G>T и 1525–1G>A), наблюдается полное отсутствие правильно соединенных транскриптов и поэтому они относятся к группе мутаций, приводящих к развитию МВ [40, 41]. Сплайсинг-мутации, при которых хотя бы часть транскриптов соединяется правильно наряду с неправильным соединением транскриптов, могут принадлежать к группе мутаций, приводящих к развитию МВ, или группе мутаций, имеющих отношение к развитию *МВТП-обусловленных* нарушений (например, 3849+10kbC>T, 2789+5G>A, 3272–26A>G, IVS8-T5) [42–44]. У пациентов-носителей этих мутаций часто отмечаются относительно легкие фенотипические признаки, однако с различной степенью выраженности расстройств – от минимальных нарушений со стороны легких на фоне нормальной функции поджелудочной железы и мужской фертильности до относительно тяжелых нарушений во всех пораженных органах [45, 46]. Такая различная степень выраженности нарушений связана обратной пропорциональной зависимостью с количеством правильно соединенных транскриптов, т.е. при их небольшом количестве наблюдаются тяжелые нарушения, тогда как при большем их количестве отмечаются более легкие фенотипические проявления (таблица 4).

Таблица 4. Сплайсинг-мутации, приводящие к появлению правильно и неправильно соединенных транскриптов у пациентов с МВ.

Мутация	Затронутый экзон/интрон	Правильно соединенные транскрипты (%)	Источник
3849+10kbC->T	Интрон 19	1–50	[43], [151]
IVS8-T5	Интрон 8	6–37	[50], [61]
2789+5G>A	Интрон 14 b	4	[152]
3272–26A>G	Интрон 17 a	5	[47]
1811+1.6kbA>G	Интрон 11	1–3	[153]
621+3A>G	Интрон 4	~50% (полуколичественный метод)	[154]
711+3A>G	Интрон 5	~70% (полуколичественный метод)	[154]
2751+2T>A	Интрон 14 a	30–50% (полуколичественный метод)	[154]

296+1G>A	Инtron 2	~30% (полуколичественный метод)	[154]
D565G	Экзон 12	15–30%	[28]
G576A	Экзон 12	22%	[28]
D579Y	Экзон 12	>75%? (полуколичественный метод)	Al-Baba, личн. комм. 2007

Кроме того, в различных органах у одного и того же пациента количество правильно соединенных транскриптов может различаться, что вносит свой вклад в разнообразие степени тяжести нарушений в органах [28,47–52]. В нескольких группах пациентов проведено исследование аллеля IVS8-T5, найденного в клетках эпителия дыхательных путей и придатке яичка [49,50], которое показало, что у страдающих синдромом СВАВД мужчин количество правильно соединенных транскриптов в клетках придатка яичка оказалось меньшим, чем в клетках эпителия дыхательных путей (10–24% против 26–37%), тогда как у страдающих бесплодием мужчин с МВ и тяжелой легочной патологией уровень правильно соединенных транскриптов был низким в клетках обеих тканей. Аналогичная корреляция наблюдалась и для мутации 3849+10kbC>T [51].

Обычными диагностическими тестами определить степень неправильного сплайсинга у пациента не представляется возможным, поскольку получить в достаточном количестве вырабатывающие *МВТР* клетки является затруднительным, а их анализ очень трудоемким. Кроме того, доля правильно соединенных транскриптов у пациентов с легким течением болезни варьирует в широком диапазоне значений от 4% до 50%, тогда как тяжелое заболевание вызывается более низким содержанием правильно соединенных транскриптов.

Клиническое значение *миссенс-мутаций* оценить крайне трудно. Идентификация миссенс-мутации у одной семьи/одного пациента делает невозможным достоверное определение наличия у нее какого-либо последствия. Ряд миссенс-мутаций распространены в общей популяции пациентов, однако более часто они наблюдаются у пациентов, имеющих связанные с *МВТР* нарушения. Для небольшой части мутаций функциональные последствия были определены в ходе научно-исследовательских проектов и эти данные могут быть использованы для прогнозирования наиболее вероятных последствий подобных мутаций.

Эти трудности объясняют отсутствие достоверных, или подкрепленных доказательствами, знаний о патогенном потенциале большинства известных мутаций в гене *МВТР*. Тем не менее, было достигнуто всеобщее признание [36] факта, что вариация последовательности нуклеотидов может быть прогностическим фактором развития МВ:

- если она вызывает изменение аминокислотной последовательности, которое серьезно нарушает синтез и/или функциональную активность *МВТР*;
- приводит к образованию стоп-кодона и преждевременной терминации трансляции (инсерция, делеция или нонсенс-мутация);
- если однонуклеотидные замены возникают в сайтах сплайсинга на границе экзонов и интронов и приводит к нарушению процессинга первичного РНК-продукта.

Для оценки патогенного потенциала могут использоваться другие критерии, однако они дают меньшую степень достоверности. К некоторым из них относятся:

- вариация последовательности, приводящая к появлению новой аминокислотной последовательности, которая не встречается в нормальном гене *МВТР*, по крайней мере у 100 носителей МВ мутаций в данной этнической группе;
- вариация последовательности выявленная у определенного количества не имеющих родственных связей пациентов с МВ;
- вариация последовательности, приводящая к изменению аминокислотного остатка, который в процессе эволюции приобрел высокую устойчивость к изменениям;
- вариация последовательности, образующая новый/критический сайт сплайсинга;
- аналогичные вариации последовательности обнаруживаются в других генах *ABC*.

Косвенным доказательством того, что вариации последовательности гена *МВТР* не приводят к развитию МВ, является:

- обнаружение другого аллеля, несущего хорошо известную, приводящую к развитию МВ, мутацию у пациента с очевидным отсутствием клинических проявлений;
- латентная экзонная вариация последовательности при отсутствии постсплайсинговой модификации *априори*;
- интронная вариация последовательности, которая выходит за пределы консенсусной последовательности нуклеотидов и которая не образует сайта сплайсинга;
- частота встречаемости в общей популяции больше или равна 0,4% [53].

Вывод: мутационный анализ не дает ответа на каждую диагностическую дилемму; клиницисты, которые будут заниматься интерпретацией его результатов и использовать его в клиническом контексте, должны понимать его недостатки и значение. Значительному числу мутаций гена MBTP еще не дана функциональная характеристика, и для большинства мутаций пока точно не установлен патогенный потенциал.

2.2. Комплексные аллели

В результате генетического анализа можно обнаружить часто встречающуюся мутацию, приводящую к развитию MB, а также редкую мутацию гена MBTP, либо две мутации гена MBTP. При таких обстоятельствах у членов семьи пациента следует проводить сегрегационный анализ. Если две мутации обнаруживаются в одном и том же «родительском» гене MBTP, то говорят, что они в *цис-положении*; если каждая мутация находится на различных «родительских» генах MBTP, то говорят, что они в *транс-положении*. В том случае, когда две мутации находятся в *цис-положении*, диагноз MB не может быть подтвержден, и следует продолжить поиск другой аллельной мутации, находящейся в *транс-положении* относительно двух других мутаций. Гены MBTP, которые несут на себе не менее двух функциональных повреждений ДНК в *цис-положении*, называются «комплексными аллелями». Наиболее известные комплексные аллели гена MBTP – это ассоциации модификаций интрона 8 (IVS-8) TG13-T5, TG12-T5 и TG11-T5, R117H-T5 и R117H-T7, и мутаций I148 T и 3199del6.

А. Модификации TG13-T5, TG12-T5 и TG11-T5

Перед экзоном 9 обнаружены два полиморфных участка – участок T(n) и участок TG(n). В локусе Tn можно обнаружить три чаще всего встречающихся аллеля: T5, T7 и T9, а также (значительно реже) аллель T3 [54] (длина которых составляет 5, 7, 9 и 3 тиминовых основания, соответственно). Аллель T5 гена MBTP может ассоциироваться с парами азотистых оснований TG11, TG12, TG13, а также (как исключение) с TG15 (11, 12, 13 и 15 повторов TG (тимин-гуанин), соответственно) [55]. Количество T-оснований и/или повторов TG в пределах этих полиморфных участков влияет на размер участка корректного сплайсинга в экзоне 9: небольшое количество T-оснований и высокая численность повторов TG приводит к менее эффективному сплайсингу [42,56,57]. Транскрипты, которые лишены нуклеотидных последовательностей экзона 9, не созревают [58,59].

Около 5% генов MBTP в общей популяции представителей белой расы содержат аллель T5 [60]. В большинстве содержащих аллель T5 генов MBTP количество повторов TG, найденных в *цис-положении*, определяет, уменьшится ли количество функционально активных белков MBTP, которые подлежат трансляции, ниже критического уровня для нормальной функциональной активности MBTP (или до близких к нему значений) [56,38]. Ассоциации TG12-T5 или TG13-T5, обнаруживаемые в компаунд – гетерозиготном состоянии с мутациями, приводящими к развитию MB, или даже в гомозиготном состоянии в большинстве случаев вызывают развитие MBTP- опосредованных состояний, таких как синдром CBAVD (двустороннее врожденное отсутствие семявыносящего протока) или хронический идиопатический панкреатит. У некоторых пациентов с синдромом CBAVD может наблюдаться развитие умеренных клинических проявлений со стороны легких. В исключительных случаях ассоциации TG12-T5 и TG13-T5 могут приводить к развитию легкой формы MB [61]. Вероятность того, что ассоциация TG11-T5 в гене MBTP приведет к развитию заболевания, очень мала. Примерно 90% всех содержащих аллель T5 генов MBTP, обнаруживаемых у пациентов с синдромом CBAVD, ассоциировано с парами азотистых оснований TG12 или TG13, тогда как около 10% ассоциировано с TG11 [56,38,62].

Б. Комплексные аллели R117H-T5 и R117H-T7

R117H является относительно часто встречающейся мутацией у страдающих MB пациентов во всем мире [11], и эта мутация может находиться в *цис-положении* с аллелями T5 или T7 [63]. При наличии ассоциации R117H-T5 функциональная активность MBTP страдает больше, чем при ассоциации R117H-T7 [42]. В компаунд-гетерозиготном состоянии с мутациями, вызывающими развитие MB, или в гомозиготном состоянии, ассоциация R117H-T5 в большинстве случаев приводит к развитию MB с нормальной функцией поджелудочной железы, тогда как ассоциация R117H-T7 может приводить к развитию легкой формы MB, обструктивной азооспермии или вообще не вызывать нарушений.

При проведении массового скрининга новорожденных, более чем 7% новорожденных с повышенными показателями иммунореактивного трипсина и известными обеими мутациями были компаунд – гетерозиготами по ассоциации R117H-T7 и мутации, приводящей к развитию MB [64]. В первые годы жизни у этих детей не было выявлено существенных признаков MB, хотя нельзя исключить, что проявления MB у них могут развиваться во взрослом возрасте. [65]

В. Комплексные аллели I148T-3199del6

В период вскоре после идентификации гена MBTP определение мутаций было трудоемким и дорогостоящим. Если у пациента с MB выявлялась миссенс-мутация, затрагивающая аминокислоту, которая

в процессе эволюции приобрела высокую устойчивость к изменениям, и не обнаруживаемая в контрольной группе пациентов, она полагалась мутацией, приводящей к развитию МВ. В большинстве случаев последующее изучение подобного аллеля гена *MBTP* не производилось, так как считалось, что лежащая в основе заболевания мутация уже установлена. Помимо этого, существовало общепринятое мнение о том, что у пациентов с МВ можно обнаружить лишь ограниченное количество мутаций.

На этих основаниях вариация последовательности нуклеотидов I148T [66] первоначально была отнесена к группе часто встречающихся мутаций гена *MBTP*, приводящих к развитию МВ. По этой причине Американская коллегия по медицинской генетике (АКМГ) включила мутацию I148T в свой диагностический набор для анализа 25 мутаций, в отношении которых было рекомендовано проводить скрининг при обследовании носителей МВ [67]. Однако впоследствии было обнаружено, что мутация I148T представляет собой нейтральный полиморфизм [68–70]. Вторая мутация 3199del6 является базовой мутацией, находящейся в *цис-положении* в большинстве случаев с мутацией I148T в гене *MBTP* у пациентов с МВ. Поскольку лишь 1% представителей европейской популяции, наряду с I148T в гене *MBTP* содержат мутацию 3199del6, стандартное скрининговое обследование на мутацию I148T не является целесообразным. В 2004 году АКМГ рекомендовала исключить мутацию I148T из диагностического набора для анализа мутаций [17].

Вывод: Ассоциации TG12-T5 или TG13-T5, обнаруживаемые в гетерозиготном состоянии с мутациями, приводящими к развитию МВ, или в гомозиготном состоянии, вызывают развитие МВTP – опосредованных состояний или возникновение легкой формы МВ. Вероятность того, что ассоциация TG11-T5 в гене *MBTP* приведет к развитию заболевания, очень мала.

При обнаружении мутации R117H следует также определить статус аллелей T5 или T7. В компаунд – гетерозиготном состоянии с мутациями, вызывающими развитие МВ, или в гомозиготном состоянии, ассоциация R117H-T5 в большинстве случаев приводит к развитию МВ с нормальной функцией поджелудочной железы, тогда как ассоциация R117H-T7 может приводить к развитию легкой формы МВ, синдрома CBAVD или вообще не вызывать нарушений.

Мутация I148T сама по себе является нейтральным полиморфизмом и не приводит к развитию МВ.

*2.3. Не имеющие отношение к *MBTP* гены, приводящие к развитию МВ-подобного клинического синдрома*

Не у каждого пациента с МВ мутация может быть обнаружена в обоих генах *MBTP*. Это имеет место в 1–1,5% аллелей гена *MBTP* у пациентов с полностью развившейся клинической картиной заболевания, проживающих на территории Северной Европы, а также (причем даже в более высоком проценте аллелей гена *MBTP*) у жителей стран Южной Европы [11]. Как было сказано выше, невозможность обнаружить эти мутации частично может объясняться тем фактом, что в настоящее время большинство передовых генетических тестов *MBTP* позволяют изучить лишь кодирующую область гена и смежные экзонные/интронные соединения. Скрининговый анализ на мутации, расположенные в интронной и промотерной области гена, а также анализ на отдаленные регуляторные последовательности обычно не проводится и поэтому они могут остаться необнаруженными.

Тем не менее, появилось новое доказательство того, что помимо гена *MBTP*, к развитию клинически идентичного муковисцидозу заболевания могут приводить и другие гены. Так, в немецкой семье не удалось обнаружить мутаций ни в одном из генов *MBTP* страдающего МВ пациента, а его сестра, которая унаследовала такие же гены *MBTP* от своих родителей, не была больной [71]. В двух семьях американцев, в каждой из которых присутствовали, два, имеющих заболевание, сибса, не удалось обнаружить мутаций ни в одном из генов *MBTP*, в то время как оба сибса не унаследовали такие же гены *MBTP* от родителей [25].

МВ характеризуется не только нарушением секреции хлоридов, но и повышенной абсорбцией натрия в дыхательных путях. Транспорт натрия происходит через чувствительные к амилориду натриевые каналы клеток эпителия (ЭNaК), которые состоят из 3 субъединиц – SCNN1A, SCNN1B и SCNN1G. Избыточная экспрессия SCNN1B приводит к повышенной абсорбции натрия эпителиальными клетками дыхательных путей и развитию МВ-подобного заболевания легких у мышей [72]. Существует доказательство того, что мутации в SCNN1B могут приводить к развитию МВ-подобного заболевания у небольшой (около 10%) части пациентов с МВ, у которых мутацию гена *MBTP* не удается обнаружить ни в одном из генов *MBTP* [73]. Генетические факторы, приводящие к развитию МВ-подобного заболевания у других пациентов, остаются неизвестными.

Вывод: существует ряд доказательств того, что у небольшой части пациентов развитие МВ-подобного заболевания могут вызывать другие гены. Эти данные пока не могут быть использованы в клиническом контексте, поскольку они еще слишком «сырые».

3. Использование генетического анализа для прогнозирования исхода

МВ характеризуется широким разнообразием клинических проявлений. Если диагноз заболевания не был установлен при скрининговом обследовании в неонатальном периоде, он устанавливается пациентам в различном возрасте – от новорожденности до зрелого возраста – на основании разных вариантов его проявления, включающих разнообразие пораженных МВ органов. Кроме того, обусловленные заболеванием нарушения в пораженных органах характеризуются существенным разнообразием по степени тяжести и скорости прогрессирования. Несмотря на то, что большинству пациентов с МВ диагноз устанавливается в первый год жизни на основании признаков и симптомов нарушения питания, функциональной недостаточности поджелудочной железы (ФНПЖ) или характерного нарушения со стороны легких, все возрастающему количеству пациентов диагноз устанавливается в юности или в зрелом возрасте.

Широкое разнообразие фенотипов может объясняться различными факторами, такими как генотип *MBTP*, гены-модификаторы, а также факторами внешнего воздействия, включая положительные и неблагоприятные эффекты лекарственных препаратов [74]. Положительный вклад в лечение подтверждается прогрессирующим улучшением выживаемости пациентов с МВ в течение последних 5 десятилетий, что полностью может объясняться изменениями в подходе к лечению пациентов, включая назначение ферментов поджелудочной железы, интенсивной питательной поддержки и антибиотиков для лечения легочных инфекций, проведение активной физиотерапии и оказание мультидисциплинарной помощи [75]. Несмотря на то, что эти модифицирующие внешние факторы обладают выраженным влиянием на выживаемость пациентов с МВ в целом, среди отдельных пациентов продолжают наблюдаться существенные различия по исходам, и они наблюдаются даже среди тех пациентов, которые обладают одинаковым генотипом *MBTP* и получают помощь в одинаковом объеме.

Влияние генотипа *MBTP* на фенотип вызывает усиленный интерес. Соответствующее влияние генотипа *MBTP* на клинический фенотип является органоспецифичным, при этом наиболее чувствительными к небольшому снижению функциональной активности *MBTP* являются семьяносящие протоки, а легкие поражаются в меньшей степени [76]. Первоначальные исследования взаимосвязи генотипа и фенотипа были сосредоточены на пациентах-носителях мутации F508del. У гомозиготных по F508del пациентов обычно наблюдались более выраженные клинические проявления по сравнению с компаунд-гетерозиготами и пациентами без мутации F508del [77–80], хотя эти различия крайне непостоянны [77,81,82]. Для пациентов гомозиготных по мутации F508del характерна более ранняя постановка диагноза, более высокие уровни хлоридов в поте, более молодой возраст и большая вероятность развития недостаточности функции поджелудочной железы.

Таблица 5. Классы мутаций гена *MBTP*

Класс мутаций	Молекулярный дефект белка <i>MBTP</i>	Тип мутации	Функциональные последствия
I	Нарушение синтеза	Нонсенс-мутация сдвига рамки точки сплайсинга	Прекращение функциональной активности <i>MBTP</i>
II	Нарушение процессинга и созревания	Миссенс-мутация	Прекращение функциональной активности <i>MBTP</i>
III	Нарушение регуляции	Миссенс-мутация	Прекращение функциональной активности <i>MBTP</i>
IV	Нарушение проводимости	Миссенс-мутация	Остаточная экспрессия и функция
V	Снижение функциональной активности/синтеза	Нарушения сплайсинга Миссенс-мутации (например, A455E)	Остаточная экспрессия и функция

Примеры мутаций, относящихся к классам I, II или III:

G542X, R553X, W1282X, R1162X, E822X, 621+1G>T, 1717-1G>A, 1078delT, 711+1G>T, 1525-1G>A, 2751+2T>A, 296+1G>C, 1717-9T>C, 3659delC, F508del, I507del, N1303K, S549N, G551D, R560T, S549I, S549R, S945L, H1054D, G1061R, L1065P, R1066C, R1066M, L1077P, H1085R, V520F, R560S, Y569D.

Примеры мутаций, относящихся к классам IV или V:

R117H, R334W, R347P, 3849+10kbC>T, 2789+5G>A, A455E, R117C, R117P, R117L, D1152H, L88S, G91R, E92K, Q98R, P205S, 3272-26A>G, IVS8-T5, D565G, G576A, 4006-1G>A, 621+3A>G, 711+3A>G.

Для того, чтобы собрать необходимое количество пациентов для осуществления сравнительного анализа, была сделана попытка систематизировать взаимоотношения генотипа-фенотипа с использованием классификации предусматривающей 5 классов мутаций гена *MBTP*, которая представлена в таблице 5 [83–85]. В целом, у пациентов гомозиготных по I-III классам мутаций, наблюдался фенотип, сопрово-

ждающийся недостаточностью функции поджелудочной железы, более высокой частотой встречаемости мекониального илеуса, преждевременными летальными исходами, более ранним и более тяжелым нарушением функции легких, более частой встречаемостью нарушения питания и тяжелого заболевания печени. Мутации IV-V класса обычно сопровождаются более легкой формой заболевания легких, при этом функция поджелудочной железы остается достаточной, и больные погибают в более позднем возрасте [77,86,44]. При сочетании мутаций IV-V класса с мутациями I-III класса доминирующее влияние на фенотип оказывают мутации IV-V класса. В соответствии с приведенной ниже более подробной информацией, эти различия полностью не объясняются клинической оценкой функции легких, питательного статуса и нарушения функции поджелудочной железы, что позволяет предположить независимость генотипа *MBTP* как прогностического фактора выживаемости.

Это широкое разнообразие отношений генотипа и фенотипа может пригодиться при проведении эпидемиологических исследований, в которых устанавливается связь между тяжестью МВ и классом мутаций. Несмотря на то, что представленная классификация мутаций гена *MBTP* широко применяется в научной литературе для определения статистических ассоциаций, она не получила развитие в качестве клинического инструмента для прогностических выводов у конкретных пациентов. Вследствие существования значительного разнообразия фенотипических проявлений (даже у пациентов – носителей одинаковых генов), использование генотипа для осуществления прогностических заключений не рекомендуется. Во-первых, количество обнаруженных на сегодняшний день мутаций в гене *MBTP* является чрезвычайно высоким, и большинство из них встречаются слишком редко для того, чтобы сделать статистические заключения относительно фенотипа. Во-вторых, только для части из них была дана характеристика применительно к их функциональным последствиям. В-третьих, целый ряд мутаций гена *MBTP* имеют несколько функциональных последствий, и не могут быть отнесены к одному определенному классу. Наконец, у гомозиготных по мутациям (например, по мутации F508del) пациентов с клиникой тяжелой и полноценной формы МВ наблюдается крайне широкое разнообразие по степени тяжести нарушений со стороны легких. Возможно, что подобное разнообразие клинических проявлений будет даже более выраженным при объединении различных мутаций, принадлежащих к одному и тому же классу.

Вывод: на фенотипические проявления МВ оказывает влияние генотип *MBTP*, а также другие генетические и внешние факторы. Если пациентов, являющихся гомозиготами или компаунд-гетерозиготами по мутациям гена *MBTP* класса I-III, сравнить с пациентами-носителями по меньшей мере одной мутации гена *MBTP* класса IV-V, то у последней группы наблюдается тенденция к менее тяжелым формам заболевания. Распределение мутаций гена *MBTP* по пяти классам является исследовательским инструментом, и не служит средством прогнозирования клинического исхода у конкретных пациентов. Таким образом, сведения о взаимоотношении генотипа и фенотипа *MBTP* могут пригодиться на популяционном уровне для определения ассоциаций, однако они не должны использоваться для прогнозирования у конкретных пациентов.

3.1. Генотип МВ и состояние функции поджелудочной железы

Недостаточность функции поджелудочной железы (НФПЖ) и нормальная функция поджелудочной железы являются клиническими терминами, описывающими состояние функции поджелудочной железы, и определяются путем оценки абсорбции жира. Недостаточность функции поджелудочной железы наступает в том случае, когда функционально активными остаются менее 2% экзокринных клеток поджелудочной железы, что обуславливает нарушение всасывания жиров, тем самым приводя к необходимости проведения заместительной терапии экзогенными панкреатическими ферментами. Термин «нормальная функция поджелудочной железы» означает, что функциональная активность оставшихся экзокринных клеток поджелудочной железы достаточно сохранена, чтобы обеспечить нормальную абсорбцию жиров, и поэтому проведение заместительной терапии панкреатическими ферментами не требуется. Оценка состояния функции поджелудочной железы производится на основании анализа содержания жира и эластазы в каловых массах, трипсиногена в сыворотке крови, или путем количественных исследований поджелудочной железы. По наличию клинических симптомов, позволяющих предположить нарушение всасывания жиров, достоверно оценить состояние функции поджелудочной железы нельзя [87].

Между генотипом МВ и состоянием функции поджелудочной железы существует сильная зависимость. Мутации I-III класса (также называемые «тяжелыми» мутациями) сопровождаются недостаточной функцией поджелудочной железы, тогда как при мутациях IV и V класса (также называемых «легкими» мутациями) функция поджелудочной железы остается достаточной. Если аллель I-III класса спарен с другим аллелем I-III класса, то это сопровождается недостаточностью функции поджелудочной железы, однако наличие одного аллеля IV или V класса обычно является достаточным для сохранения функции поджелудочной железы на компенсированном уровне [88].

Таблица 6. Основные мутации гена *MBTP*, классифицированные по их влиянию на состояние функции поджелудочной железы

Часто встречающиеся мутации, приводящие к недостаточности функции поджелудочной железы	Часто встречающиеся мутации, при которых функция поджелудочной железы остается достаточной
F508del	R117H
G542X	R347P**
G551D	3849+10kbC>T
N1303K	A455E
W1282X	R334W**
R553X	G178R
621+1G>T	R352Q
1717-1G>A	R117C
R1162X	3272-26A>G
I507del	711+3A>G
394delTT	D110H
G85E*	D565G
R560T	G576A
1078delT	D1152H
3659delC	L206W
1898+1G>T	V232D
711+1G>T	D1270N
2183AA>G	
3905insT	
S549N	
2184delA	
Y122X	
1898+5G>T	
3120+1G>A	
E822X	
2751+2T>A	
296+1G>C	
R1070Q-S466X*	
R1158X	
W496X	
2789+5G>A*	
2184insA	
1811+1.6kbA>G	
1898+1G>A	
2143delT	
1811+1,6kbA>G	
R1066C	
Q890X	
2869insG	
K710X	
1609delCA	

Данная классификация основана на бесспорных общепризнанных сведениях, полученных из литературы или неопубликованных отчетов.

** при данной мутации функция поджелудочной железы может оставаться сохранной.*

*** при данной мутации может наблюдаться недостаточность функции поджелудочной железы.*

Эти корреляционные связи не являются абсолютными, и некоторые мутации могут сопровождаться как недостаточностью функции поджелудочной железы, так и сохранением ее функции на достаточном уровне. Пациенты, выявленные при скрининговом обследовании в течение неонатального периода и являющиеся носителями мутаций I-III класса на обоих аллелях, при установлении диагноза могут иметь сохранную функцию поджелудочной железы, но в течение первых 1–2 лет жизни у них развивается НФПЖ [89]. Хотя у большинства пациентов функция поджелудочной железы сохраняется на достаточном уровне на протяжении многих десятилетий, позже в течение жизни у небольшого процента пациентов с сохраненной функцией поджелудочной железы по мере их взросления развивается недостаточность функции пищеварения. Рецидивирующий острый или хронический панкреатит наблюдается у 20% пациентов с сохраненной функцией поджелудочной железы, а недостаточность функции поджелудочной железы может являться следствием повторных воспалительных повреждений паренхимы [90].

В таблице 6 приводятся данные о состоянии функции поджелудочной железы в соответствии с чаще всего встречающимися мутациями гена *MBTP*.

Вывод: у пациентов, которые являются носителями мутаций I-III класса на обоих аллелях, более вероятна недостаточность функции поджелудочной железы, тогда как у пациентов – носителей по меньшей мере одной мутации гена *MBTP* IV-V класса вероятность сохранения функции поджелудочной железы на достаточном уровне высока. У пациентов с сохраненной функцией поджелудочной железы наблюдается тенденция к более благоприятному нутритивному статусу, однако у них также имеется значительный риск развития панкреатита.

3.2. Генотип *MB* и поражение легких

Легкие отличаются самым большим разнообразием по тяжести нарушений среди всех органов, поражаемых при *MB*. Гены-модификаторы, внешние факторы и проводимое лечение – все это имеет важное значение [78,80,82,88,79,81,91–94]. Посвященные *MB* исследования с участием близнецов и сибсов показали, что доля вариантов *MB*, которая может объясняться генетическими факторами, составляет от 0,6 до 0,8 [95,96]. Этот факт указывает на то, что именно гены-модификаторы в первую очередь отвечают за разнообразие тяжести нарушений со стороны легких у пациентов из одной семьи.

Легочный фенотип *MB* может быть установлен с помощью исследований функции легких (например, объем форсированного выдоха за 1 секунду – $ОФВ_1$), изучения бактериологических маркеров (например, возраст при первом обнаружении *Pseudomonas aeruginosa*, обострениях инфекционного заболевания легких, требующих применения антибиотиков IV поколения), оценки структурных изменений (например, данные компьютерной томографии высокого разрешения), а также с помощью оценки выживаемости. Поскольку поражение легких при *MB* является прогрессирующим, необходимо учитывать изменения в динамике. В ходе крупных исследований было доказано, что у пациентов с мутациями I, II и III классов скорость снижения $ОФВ_1$ больше, чем у пациентов – носителей одной мутации IV или V класса [97]. Тем не менее, результаты оценки $ОФВ_1$ у пациентов этих двух групп характеризуются значительным разнообразием, и по этой причине прогнозировать прогрессирование поражения легких у конкретных пациентов не представляется возможным [82]. У пациентов гомозигот или компаунд-гетерозигот по мутациям гена *MBTP* I-III класса может наблюдаться легкая форма поражения легких. С другой стороны, у пациентов – носителей по меньшей мере одной мутации IV–V класса в более поздний период жизни может наблюдаться тяжелая форма заболевания. Таким образом, основываясь только на генотипе *MBTP*, у конкретных пациентов невозможно достоверно прогнозировать степень тяжести поражения легких.

Вывод: поскольку генотип *MBTP* не является ценным прогностическим фактором степени тяжести поражения легких у конкретного пациента, его не следует использовать в качестве прогностического показателя.

3.3. Мутации при *MB* и другие проявления заболевания

Другие клинические проявления *MB* включают осложнения со стороны желудочно-кишечного тракта, связанный с *MB* диабет, а также мужское бесплодие.

а. Осложнения со стороны желудочно-кишечного тракта при *MB*.

Они представлены главным образом мекониевыми илеусом (МИ), синдромом дистальной кишечной обструкции (СДИО), а также муковисцидозным поражением печени. Изучение этих осложнений *MB* в ходе исследований связи генотипа с фенотипом затруднено ввиду небольшого размера выборки, поскольку эти осложнения наблюдаются у 5–20% страдающих *MB* пациентов, а также вследствие сложностей при определении общей формулировки. Это особенно актуально для муковисцидозного поражения печени, которое начинается без явных симптомов и не имеет общепринятых диагностических критериев. Несмотря на это, поражение печени, МИ и СДИО встречаются практически только у пациентов – носителей «тяжелых» мутаций I–III класса на обоих аллелях. Тем не менее, доказательств связи фенотипа

с конкретными мутациями гена не существует [98,99]. По-видимому, гены-модификаторы играют значительную роль в развитии МИ [100] и связанного с МВ поражения печени [101].

б. Диабет

Частота случаев развития, связанного с МВ, сахарного диабета (СДМВ), увеличивается с возрастом пациента, и в целом составляет примерно 5%. Около 15–20% взрослых с МВ страдают СДМВ; практически у всех этих пациентов наблюдается недостаточность функции поджелудочной железы, следовательно, развитие диабета в значительной степени связано с мутациями I, II и III класса [98, 102].

в. Мужское бесплодие

Обструктивная азооспермия наблюдается у подавляющего большинства страдающих МВ пациентов мужского пола [103,104] и главной ее причиной является врожденное двустороннее отсутствие семявыносящих протоков (синдром СВАВД), однако она также может наблюдаться и на фоне других обструктивных анатомических аномалий [105]. *MBTP* играет очень важную роль в нормальном развитии семявыносящих протоков, поэтому малейшее нарушение функции *MBTP* приводит к развитию синдрома СВАВД. Фертильные мужчины с МВ обычно являются носителями мутации 3849+10kbC>T. Эта взаимосвязь является очень прочной и позволяет прогнозировать бесплодие у мужчин с МВ, которые являются носителями других мутаций, кроме мутации 3849+10kbC>T.

Вывод: взаимосвязи между какой-либо конкретной мутацией *MBTP* и развитием мекониального илеуса, СДИО, поражения печени и связанного с МВ сахарного диабета на существует. Эти клинические проявления практически никогда не встречаются при наличии мутации, при которой функция поджелудочной железы сохранена на достаточном уровне.

3.4. Мутации гена *MBTP* в контексте развития связанных с *MBTP* нарушений

Лучше всего изученными нарушениями, связанными с *MBTP*, являются синдром СВАВД и другие формы обструктивной азооспермии, рецидивирующий острый или хронический панкреатит, а также диффузные бронхоэктазы [106–108]. Кроме того, частота встречаемости мутаций гена *MBTP*, превышающая ожидаемую в общей популяции частоту, наблюдалась при риносинуситах, аллергическом бронхолегочном аспергиллезе и склерозирующем холангите [44,109–112].

Оценить взаимосвязь между мутациями гена *MBTP* и этими заболеваниями зачастую очень трудно. Частота встречаемости мутаций гена *MBTP* зависит от количества исследуемых мутаций (например, ограниченный мутационный анализ или полное секвенирование гена) и от критериев отбора пациентов. Помимо этого, эти клинические проявления могут иметь другую, отличную от *MBTP*, этиологию.

а. Врожденное двустороннее отсутствие семявыносящих протоков.

Обструктивная азооспермия, при которой синдром СВАВД является наиболее частым фенотипическим проявлением, представляет собой важную причину бесплодия, и обуславливает 1–5% всех случаев мужского бесплодия. Молекулярная основа этого состояния была изучена различными группами исследователей во всем мире, причем результаты этих исследований оказались одинаковыми [39,106,107,113–115,116,117]. Вскоре после открытия гена *MBTP* Dumur и соавт. доказал, что значительная часть бесплодных мужчин с синдромом СВАВД являются носителями мутации F508del [106]. В более поздних исследованиях было установлено, что 80–90% мужчин с синдромом СВАВД являются носителями, по меньшей мере, одной (а 50–60% – двух) мутации гена *MBTP* (включая вариант T5). У мужчин с 2 мутациями *MBTP* одна, как правило, приводит к развитию МВ, а вторая мутация вызывает связанные с *MBTP* нарушения. Мутация F508del обнаруживается у 40% пациентов с синдромом СВАВД, после которой по частоте встречаемости идет вариант T5 (примерно у 35% пациентов) [39,62,107,115,116,118,119]. Кроме того, у этих пациентов часто обнаруживался аллель R117H (примерно в 30% случаев) [107], в большинстве случаев, ассоциированный с вариантом T7 [63].

б. Панкреатит

Наличие данных о связи мутаций гена *MBTP* с синдромом СВАВД побудили исследователей Sharer и Sonn дать оценку возможной роли гена *MBTP* в развитии хронического панкреатита и доказать, что частота встречаемости одинарной мутации в 11 раз превышает расчетную частоту в контрольной популяции [113,114]. Эти данные были подтверждены позже в различных группах пациентов; в соответствии с ними, примерно 30% пациентов с хроническим панкреатитом являются носителями одной мутации гена *MBTP*, а 10–15% являются компаунд-гетерозиготами [120–124]. Мутация F508del оказалась самой распространенной «тяжелой» мутацией, однако наблюдались и другие мутации – вариант T5, R117H-T7, L206W, D1152H, R1070Q, R347H, R334W и 2789+5G>A.

в. Бронхоэктазия

Мутации *MBTP* обнаруживались у 10–50% пациентов с идиопатической бронхоэктазией [108,125–130]. Такая вариабельность может быть обусловлена более разнообразной природой бронхоэктазии, и может

зависеть от того, насколько исчерпывающим был поиск другой этиологии. Несмотря на то, что отдельные мутации гена *MBTP* были аналогичны мутациям, наблюдавшимся у мужчин с синдромом СБАВД, компаунд-гетерозиготность была обнаружена у меньшего количества пациентов, при этом лишь одна из них является мутацией, приводящей к развитию МВ.

Вывод: у пациентов с клиническими проявлениями, которые не соответствуют диагностическим критериям МВ (и поэтому называются связанными с *MBTP* нарушениями) обнаружена более высокая, по сравнению с общепопуляционной, частота встречаемости мутаций *MBTP*. Возможно, удастся обнаружить приводящую к развитию МВ мутацию, однако она не будет присутствовать в обоих генах *MBTP*.

3.5. Гены-модификаторы

Ожидается, что идентификация генов-модификаторов и определение их клинического эффекта в отношении течения МВ станет неотъемлемой частью оценки прогноза заболевания, и в ряде случаев может привести к появлению альтернативных подходов к терапии. С 1998 года опубликованы результаты более 30 исследований, посвященных изучению генов-модификаторов. Большинство этих исследований охватывали очень небольшие популяции и больше не повторялись. По этой причине наблюдался целый ряд разнообразных и противоречивых заключений. Современная стратегия, направленная на прояснение этой проблемы, заключается в проведении исследований по изучению генов-модификаторов в крупных когортах страдающих МВ пациентов или семей и имеет целью увеличить статистическую мощность ассоциативного анализа в отношении различных клинических проявлений МВ и отдельных ковариат.

Несмотря на определенные разногласия в результатах наиболее показательных исследований [131–135], лишь в отношении небольшого количества генов получены убедительные доказательства того, что они являются генами-модификаторами (*TGFβ1*, *MBL2*). Для изучения этих и других предполагаемых генов-модификаторов МВ необходимо проводить дальнейшую научно-исследовательскую работу, и поэтому следует уделить внимание интерпретации этих результатов. Нам до сих пор неизвестно, обусловлено ли наследование вариации, приводящей к развитию муковисцидозного поражения легких, небольшим количеством генов, имеющих сильное влияние, или же множеством генов с незначительным влиянием, либо сочетанием этих двух вариантов. Существующий на сегодняшний день уровень знаний не позволяет нам использовать полученные к настоящему времени результаты в клиническом контексте. Тем не менее, предполагается, что в недалеком будущем успехи в этой области изучения МВ предоставят основу для прогнозирования и терапевтических подходов к лечению МВ.

Вывод: исследования по изучению кандидатных генов-модификаторов к настоящему времени позволили установить аллели, обладающие фактическим, хотя и явно незначительным, влиянием. По состоянию на сегодняшний день стандартизированное проведение анализа на модулирующие мутации/гены не представляется целесообразным, поскольку ни очевидной клинической значимости, ни терапевтических предпосылок для этого нет.

4. Передача результатов анализа

Анализ мутаций гена *MBTP* относится к группе тестов, чаще всего выполняемых в лабораториях молекулярной генетики. Несмотря на распространенность теста, существуют значительные различия в количестве анализируемых мутаций. Способ, посредством которого клиницист осуществляет интерпретацию отчета, оказывает серьезное влияние на тактику последующего клинического ведения изучаемого пациента и членов его семьи. Именно поэтому представление результатов в понятной и недвусмысленной форме имеет решающее значение. Различные организации, в том числе Международная организация по стандартизации [136], Организация по экономической кооперации и развитию (OECD) [137], а также ряд научных сообществ [138, 139] разработали проект руководства, характеризующего информацию, которую необходимо включать в отчет лаборатории молекулярной генетики для обеспечения того, чтобы клиницисты и пациенты получали адекватные и понятные сведения.

Важно, чтобы происходило движение этой информации от лаборатории к клиницисту, и от клинициста в лабораторию молекулярной генетики. Очевидно, что в зависимости от показаний для тестирования, анализ и отчет должны быть адаптированы в отношении включения сведений о конкретных причинах необходимости проведения теста, а также его потенциальной клинической пользы.

4.1. От клинициста в лабораторию молекулярной генетики

Рекомендации по наилучшей практике представления отчетов о результатах молекулярного анализа, включенные в Руководство по проведению молекулярного анализа OECD [137] констатируют, что «поскольку практичность отчета о результатах генетического анализа часто зависит от точности и достоверности представленных в лабораторию сведений, запрос о проведении генетического анализа должен

включать все необходимые сведения для осуществления лабораторией соответствующего анализа и интерпретации результатов».

Эти общие рекомендации также распространяются и на генетический анализ при МВ. Для лаборатории молекулярной генетики очень важно до проведения анализа получить информацию об этнической принадлежности пациента, которому проводится анализ, а также четкие показания для проведения анализа. Эта информация поможет лаборатории молекулярной генетики применить самый лучший возможный «целевой» диагностический протокол. Мутации, которые обнаруживаются при связанных с *МВТР* нарушениях (например, при синдроме *СВАВД* или хроническом идиопатическом панкреатите) могут отличаться от мутаций, выявляемых у страдающих МВ пациентов с НФПЖ. Аналогично, некоторые мутации могут редко встречаться в местной популяции, однако иметь достаточно высокую частоту встречаемости в других этнических группах.

Показания для проведения анализа могут быть сведены к подтверждению клинически доказанного МВ, обследованию в случае подозрения на МВ или связанное с *МВТР* нарушение, а также установлению диагноза в пренатальном периоде. Если проведение анализа необходимо в рамках обследования в случае подозрения на возможное наличие МВ, может быть полезным сообщить лаборатории, насколько веско уже собранные доказательства свидетельствуют в пользу МВ. В большинстве случаев, чем меньше значение средней концентрации хлоридов в поте, тем меньше шансов обнаружить какую-либо мутацию в гене *МВТР*. Тем не менее, выявление одной приводящей к развитию МВ мутации при выполнении стандартного анализа наряду с клиническими проявлениями МВ высоко коррелирует с наличием второй вредоносной мутации, определяемой более подробным анализом [140].

Вывод: интеграция клинических данных и результатов молекулярного анализа имеет огромное значение. Лаборатории должны запрашивать сведения о расе/этнической принадлежности, семейном анамнезе, а также о причинах проведения анализа.

Таблица 7. Контрольный перечень пунктов для стандартного отчета

✓ Реквизиты лаборатории; (аккредитационный/сертификационный номер ISO, если таковой имеется и допустим)

✓ Название, дата

✓ Имя и фамилия пациента (как минимум два идентификационных признака; номер больницы, номер образца и т. д.)

✓ Дата рождения, пол

✓ Место рождения/этническое происхождение

✓ Характер образца и дата прибытия

Если уже производилось выделение ДНК – указать название и адрес лаборатории, производившей выделение ДНК

✓ Имя, фамилия и адрес врача, желающего получить информацию

✓ Показание для проведения анализа или вопрос, на который необходимо получить ответ

✓ Проведенный анализ, перечень анализируемых мутаций, чувствительность (вероятность обнаружения мутации), используемые методы (кратко)

✓ Результат

Формальный генотип

Интерпретация результата анализа в простой формулировке, включая сведения о том:

— был ли подтвержден диагноз;

— необходимы ли консультация и/или дальнейшие анализы;

— последствия для членов семьи.

Необходимость дальнейшего анализа для обнаружения дополнительных мутаций, исходя из клинических или генетических побуждений

Ссылки на научные публикации

✓ Подпись руководителя лаборатории, резолюция/подпись второго лица (может быть электронной)

✓ Стандартная формулировка лаборатории в отношении воспроизведения отчета и объема результатов.

✓ Нумерация страниц (1 из 1 ...)

Извлечено из рекомендаций Швейцарского сообщества по медицинской генетике (руководство по наи-

лучшей практике представления отчетов в лабораториях молекулярной генетики Швейцарии, 2003 г.) и критериев качества представления отчетов Европейской сети по МВ [31].

4.2. Из лаборатории молекулярной генетики клиницисту

Анализ всегда должен завершаться составлением полного письменного отчета [137]. Пациент, которому проводится анализ, должен получить оригинальный экземпляр отчета о лабораторном исследовании, либо отчет должен быть включен в более обстоятельный отчет о проведенной генетической консультации или о госпитализации.

Результаты теста в отчете следует описывать с использованием указанной выше терминологии: мутации, приводящие к развитию заболевания, мутации, имеющие неопределенную клиническую значимость, и мутации, имеющие неизвестную клиническую значимость. Полиморфизм или мутации, не имеющие клинического значения, могут неправильно интерпретироваться врачом или пациентом, поэтому упоминать их в отчете не следует. Каждый отчет должен содержать сообщение об этом эффекте.

Пациенту и членам его/ее семьи следует разъяснить *клиническую значимость и последствия* результатов молекулярного анализа. Предоставляемые сведения должны быть понятными и лаконичными, поскольку слишком большой объем информации может затруднить точное понимание результатов. Для получения дополнительной информации и дальнейшего диагностического обследования целесообразно направить пациента к врачу, работающему в центре исследования МВ или имеющему опыт в лечении МВ, и/или к консультанту по генетике.

Лаборатории обязаны указать в отчете расчетную клиническую чувствительность и специфичность анализа. *Клиническая чувствительность* определяется как доля пациентов, у которых имеется МВ и положительный результат МВ-анализа с наличием двух идентифицируемых мутаций, приводящих к развитию МВ. В настоящее время большинство лабораторий попросту опираются на данные опубликованных отчетов. Например, диагностический набор для определения 23 мутаций, предлагаемый АКМГ, позволяет идентифицировать около 88% носителей мутаций среди представителей европеоидной расы. Таким образом, примерно 77% (88% x 88%) представителей европеоидной расы с МВ (или такая же доля пар носителей) будут иметь положительный результат анализа (у них будут обнаружены две мутации). Если у страдающего МВ пациента будет выявлена одна мутация (или вовсе не будет обнаружено мутаций), то лаборатории обязаны предоставить комментарии относительно целесообразности дальнейшего анализа. Кроме того, лаборатории должны быть способны предоставить расчетные значения клинической чувствительности для других определенных расовых/этнических групп, которые могут подвергаться анализу. *Клиническая специфичность* может быть определена как доля отрицательных результатов среди пациентов, которые не страдают МВ. Погрешность анализа или переменная экспрессивность определенных мутаций может привести к снижению клинической специфичности анализа. Несмотря на то, что клинические проявления большинства чаще всего анализируемых мутаций, как известно, в высокой степени согласуются с классическим фенотипом МВ, могут быть некоторые исключения. Например, мутация R117H может приводить к появлению весьма разнообразного клинического фенотипа.

Таблица 8. Пример отчета о результатах молекулярного анализа МВ (модифицирован из сетевой формы МВ-EQA <http://www.cnetwork.be/>)

XX-0 X-200 X	
Доктор X Улица X Город, страна X	
Молекулярный генетический анализ на наличие муковисцидоза	
Имя, фамилия:	Гэри БРАУН
Дата рождения:	20-06-2006
Пол	Мужской
Место рождения:	Гамбург, Германия
Этническое происхождение:	европеоид: мать из Бретани, отец из Германии
Причина обращения за помощью:	Плохое прибавление в весе, хроническая диарея, два эпизода бронхиолита и положительный результат потового теста
Дата получения образца:	3-06-2007
Тип образца:	ДНК
Номер образца	MUCO-412
Результат	Компаунд-гетерозигота по G551D/R553X

Интерпретация

Представленные результаты демонстрируют, что Гэри Браун является компаунд-гетерозиготой по двум различным мутациям, приводящим к развитию муковисцидоза. Эти результаты подтверждают диагноз муковисцидоза.

Комментарии

Муковисцидоз представляет собой заболевание с аутосомно-рецессивным типом наследования, поэтому оба родителя заболевшего ребенка должны являться носителями заболевания. По этой причине рекомендуется провести анализ ДНК родителей для того, чтобы определить статус носительства гена заболевания и происхождение каждой мутации. Если носительство гена заболевания будет подтверждено, то у данной семейной пары существует 25%-ная вероятность рождения больного ребенка в результате каждой беременности. Таким образом, диагностика заболевания в пренатальном периоде целесообразна в ходе данной беременности, а также в течение каждой последующей беременности. Поскольку муковисцидоз является наследственным заболеванием, можно предложить скрининговое обследование на статус носительства гена заболевания и другим членам их семей.

Родители пациента и члены их семей должны проконсультироваться с направившим их врачом и генетиком-консультантом.

Заведующий отделом молекулярной биологии

Классификация мутаций должна осуществляться в соответствии с регистрационным номером Генетического банка NM-000492. Нуклеотид 1 учитывался как первый нуклеотид транскрипции, ведущий к нуклеотиду 133, который является первым нуклеотидом иницирующего кодона трансляции.

Используемые методы: INNO-LiPA CFTR19 и 17+Tn, модернизированный тест (обратный дот-блоттинг)

Перечень анализируемых мутаций: F508del, I507del, G542X, 1717-1G>A, G551D, R553X, R560T, Q552X, W1282X, S1251N, 3905insT, N1303K, CFTRdele2,3, 711+1G>T, 3272-26A>G, 1898+1G>A, I148T*, 3199del6, 3120+1G>A, 394delTT, G85E, E60X, 621+1G>T, R117H, 1078delT, R347P, R334W, 2143delT, 2183AA>G, 2184delA, 711+5G>A, R1162X, 3659delC, 3849+10kbC>A, A455E, T5, T7, T9 (* мутация I148 T является нейтральным полиморфизмом и не приводит к развитию МВ)

Вероятность обнаружения мутации составляет примерно 90% для популяций «белых» жителей стран Северной Европы и ≤ 70% для популяций «белых» жителей стран Южной Европы.

Страница 1/1

Обширные делеции и доброкачественные модификации в пределах гена *MBTP* могут привести к ошибочному определению гомозиготности в тех случаях, когда мутация имеется в аналогичном месте второго аллеля.

Для подтверждения гомозиготности всегда следует рекомендовать провести анализ у родителей.

Отчет о результатах скринингового обследования в неонатальном периоде следует представлять в соответствии с процедурами по скрининговому обследованию в неонатальном периоде, принятыми в данном регионе или государстве.

Вывод: стандартный отчет лаборатории молекулярного анализа следует предоставлять по всем результатам диагностических анализов при МВ. Контрольный перечень пунктов для стандартного отчета лаборатории молекулярного анализа и пример типового отчета представлены в таблицах 7 и 8.

4.3. Номенклатура мутаций

Обозначение мутаций должно быть точным и недвусмысленным. Тем не менее, попытки создать заслуживающую доверия номенклатуру мутаций привели в последние годы к появлению значительных расхождений в обозначении вариантов последовательности нуклеотидов в ДНК. В настоящее время в подавляющем большинстве научных публикаций и в базе данных мутаций CFGAC используется традиционная номенклатура мутаций. Совсем недавно Обществом по изучению нарушений генома человека (Human Genome Variation Society, HGVS) была предложена абсолютно другая номенклатура (номенклатура HGVS для описания вариаций последовательностей) [141]. Общество по изучению нарушений генома человека представляет собой международную организацию по определению номенклатуры генных изменений, работающая под эгидой Международной организации по изучению генома человека (HUGO) и Международной Федерации Сообществ по изучению генетики человека (IFHGS). Номенклатура HGVS пока еще находится в стадии доработки. Одновременное использование «традиционной» номенклатуры и номенклатуры «HGVS» является потенциальным источником путаницы, как в лаборатории, так и в клинических условиях. В отношении этого Европейская сеть по муковисцидозу выпустила следующее заявление: «Рекомендуется, чтобы вместо символа Δ использовались обозначения F508del и I507del. В настоящее время

мы рекомендуем использовать обозначения мутаций, приведенные в широко используемой в повседневной практике базе данных мутаций гена *MBTP* [4]. Если используется номенклатура HGVS, то следует сделать ссылку на обозначение мутаций в «традиционной» номенклатуре во избежание путаницы у клинициста, направившего пациента на исследование. Обозначения по номенклатуре HGVS можно включать в сноску, если лаборатория посчитает это необходимым.» [34]. В настоящее время аналогичная номенклатура HGVS будет внедряться в базу данных мутаций CFGAC.

Вывод: обозначения многих часто встречающихся мутаций имеют историческое значение, и не соответствуют рекомендациям HGVS. В настоящее время большинство клиницистов хорошо знакомо именно с традиционной номенклатурой мутаций. Поэтому сейчас принятие стандартизированной системы неизбежно приведет к возникновению путаницы. Рекомендуется, чтобы отчеты о лабораторных исследованиях, помимо традиционных обозначений мутаций, включали и номенклатуру HGVS.

4.4. Обследование и скрининг носителей

Обследование на предмет носительства MB рекомендуется проводить у родственников страдающего MB пациента или у партнера носителя MB, который планирует иметь детей [142]. У детей обследование на предмет носительства следует отложить до тех пор, пока ребенок не подрастет достаточно для того, чтобы принять обоснованное решение в отношении проведения генетического анализа [143]. В ряде стран популяционное обследование на предмет носительства также предлагается пациентам или семейным парам, не имеющим MB в семейном анамнезе. Для проведения анализа без направления или по личной просьбе пациента, которому (ой) планируется проведение анализа, до проведения анализа следует информировать его/ее о процедуре, а также предоставить возможность генетической консультации для оценки точного значения результатов анализа. При этом широкой общественности следует предоставить большее количество сведений в отношении анализа при MB, чтобы подготовить ее к лучшему пониманию значимости и последствий анализа. Определенные полезные сведения могут предоставить компьютерные программы, направленные на предоставление населению информации о возможной ценности и ограничениях обследования на предмет носительства MB. Популяционное обследование на предмет носительства MB должно соответствовать таким же основополагающим принципам обеспечения качества, какие распространяются на проведение исследований у человека.

5. Положение о конфликте интересов

Ни у одного автора нет никаких финансовых или личных отношений, которые могут оказать неуместное влияние на содержание данной рукописи.

6. Участники консенсуса

Benny Assael, Italy; Cristina Bombieri, Italy; Aaron Brown, UK; Teresa Casals, Spain; Jean-Jacques Cassiman, Belgium; Carlo Castellani, Italy; Mireille Claustres, France; Harry Cuppens, Belgium; Garry R. Cutting, USA; John Dodge, UK; Iolo Doull, UK; Peter Durie, Canada; Stuart Elborn, UK; Philip Farrell, USA; Claude Ferec, France; Emmanuelle Girodon, France; Marie Johannesson, Sweden; Batsheva Kerem, Israel; Eitan Kerem, Israel; Mike Knowles, USA; Milan Macek Jr, Czech Rep.; Anne Munck, France; Pier Franco Pignatti, Italy; Dragica Radojkovic, Serbia; Paolo Rizzotti, Italy; Martin Schwarz, UK; Manfred Stuhmann, Germany; Elizabeth Tullis, Canada; Maria Tzetis, Greece; Julian Zielenski, Canada.

Благодарности

Организаторы Согласительной конференции хотели бы выразить благодарность всем занимающимся проблемой муковисцидоза организациям и коммерческим компаниям, оказавшим поддержку проведения встречи: Британскому фонду MB (UK CF Trust), Американскому фонду MB (US CF Foundation), Канадскому фонду MB (Canadian CF Foundation), компаниям Chiesi Farmaceutici, Abbott Diagnostics, Solvay, Nuclear Laser Medicine, Innogenetics, Pheno, AOP Orphan, а также организации Genome Canada through OGI. Мультимедиа-поддержка оказана VZNFM 00064203.

Список литературы

- [1] Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 1989; 245:1059–65.
- [2] Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989; 245:1066–73.
- [3] Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989; 245:1073–80.
- [4] Cystic Fibrosis Mutation Database, www.genet.sickkids.on.ca/cftr.
- [5] Serre JL, Simon-Bouy B, Mornet E, Jaume-Roig B, Balassopoulou A, Schwartz M, et al. Studies of RFLP closely linked to the cystic fibrosis locus throughout Europe lead to new considerations in population genetics. *Hum Genet* 1990; 84:449–54.

-
- [6] Morral N, Bertranpetit J, Estivill X, Nunes V, Casals T, Gimenez J, et al. The origin of the major cystic fibrosis mutation (delta F508) in European populations. *Nat Genet* 1994; 7:169–75.
- [7] Estivill X, Bancells C, Ramos C. For the BIOMED CF mutation analysis consortium. Geographic distribution and regional origin of 272 cystic fibrosis mutations in European populations. *Hum Mutat* 1997; 10: 135–54.
- [8] Kanavakis E, Efthymiadou A, Strofalis S, Doudounakis S, Traeger-Synodinos J, Tzetzis M. Cystic fibrosis in Greece: Molecular diagnosis, haplotypes, prenatal diagnosis and carrier identification amongst high-risk individuals. *Clin Genet* 2003; 63:400–9.
- [9] Yalourous PK, Neocleous V, Zeniou M, Adamidou T, Costi C, Christophi C, et al. Cystic fibrosis mutational spectrum and genotypic/phenotypic features in Greek-Cypriots, with emphasis on dehydration as presenting symptom. *Clin Genet* 2007; 71:290–2.
- [10] Radivojevic D, Djuricic M, Lalic T, Guc-Skecic M, Savic J, Minic P, et al. Spectrum of cystic fibrosis mutations in Serbia and Montenegro and strategy for prenatal diagnosis. *Genet Test* 2004; 8:276–80.
- [11] The molecular genetic epidemiology of cystic fibrosis. Report of a joint meeting of WHO/ECFTN/ICF (M)A/ECFS [http://www.who.int/genomics/publications/en/and/WHO Geneva, Human Genetics Programme WHO/HGN/CF/WG/04.02](http://www.who.int/genomics/publications/en/and/WHO%20Geneva,%20Human%20Genetics%20Programme%20WHO/HGN/CF/WG/04.02).
- [12] Lao O, Andres AM, Mateu E, Bertranpetit J, Calafell F. Spatial patterns of cystic fibrosis mutation spectra in European populations. *Eur J Hum Genet* 2003; 11:385–94.
- [13] Mateu E, Calafell F, Ramos MD, Casals T, Bertranpetit J. Can a place of origin of the main cystic fibrosis mutations be identified? *Am J Hum Genet* 2002; 70:257–64.
- [14] Macek Jr M, Mackova A, Hamosh A, Hilman BC, Selden RF, Lucotte G, et al. Identification of common cystic fibrosis mutations in African-Americans with cystic fibrosis increases the detection rate to 75%. *Am J Hum Genet* 1997; 60:1122–7.
- [15] Bobadilla JL, Macek Jr M, Fine JP, Farrell PM. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of *CFTR* mutations – correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat* Jun 2002; 19 (6):575–606.
- [16] Malone G, Haworth A, Schwarz MJ, Cuppens H, Super M. Detection of five novel mutations of the cystic fibrosis transmembrane regulator (*CFTR*) gene in Pakistani patients with cystic fibrosis: Y569 D, Q98 X, 296+12 (T>C), 1161delC and 621+2 (T>C). *Hum Mutat* 1998; 11:152–7 1998.
- [17] Watson MS, Cutting GR, Desnick RJ, Driscoll DA, Klinger K, Mennuti M, et al. Cystic fibrosis population carrier screening: 2004 revision of American College of Medical Genetics mutation panel. *Genet Med* 2004; 6:387–91.
- [18] Ferec C, Casals T, Chuzhanova N, Macek Jr M, Bienvenu T, Holubova A, et al. Gross genomic rearrangements involving deletions in the *CFTR* gene: characterization of six new events from a large cohort of hitherto unidentified cystic fibrosis chromosomes and meta-analysis of the underlying mechanisms. *Eur J Hum Genet* 2006; 14:567–76.
- [19] Dork T, Macek Jr M, Mekus F, Tummeler B, Tzountzouris J, Casals T, et al. Characterization of a novel 21-kb deletion, *CFTR*dele2,3 (21 kb), in the *CFTR* gene: a cystic fibrosis mutation of Slavic origin common in Central and East Europe. *Hum Genet* 2000; 106:259–68.
- [20] Audrezet MP, Chen JM, Ragueneas O, Chuzhanova N, Giteau K, Le Marechal C, et al. Genomic rearrangements in the *CFTR* gene: extensive allelic heterogeneity and diverse mutational mechanisms. *Hum Mutat* 2004; 23:343–57.
- [21] Niel F, Martin J, Dastot-Le Moal F, Costes B, Boissier B, Delattre V, et al. Rapid detection of *CFTR* gene rearrangements impacts on genetic counselling in cystic fibrosis. *J Med Genet* 2004; 41: e118.
- [22] Lucarelli M, Narzi L, Piergentili R, Ferraguti G, Grandoni F, Quattrucci S, et al. A 96-well formatted method for exon and exon/intron boundary full sequencing of the *CFTR* gene. *Anal Biochem* 2006; 353:226–35.
- [23] McGinniss MJ, Chen C, Redman JB, Buller A, Quan F, Peng M, et al. Extensive sequencing of the *CFTR* gene: lessons learned from the first 157 patient samples. *Hum Genet* 2005; 118:331–8.
- [24] Zielenski J, Aznarez I, Onay T, Tzounzouris J, Markiewicz D, Tsui LC. *CFTR* mutation detection by multiplex heteroduplex (mHET) analysis on MDE gel. *Methods Mol Med* 2002; 70:3–19.
- [25] Groman JD, Meyer ME, Wilmott RW, Zeitlin PL, Cutting GR. Variant cystic fibrosis phenotypes in the absence of *CFTR* mutations. *N Engl J Med* 2002; 347:401–7.
- [26] Rowntree R, Harris A. DNA polymorphisms in potential regulatory elements of the *CFTR* gene alter transcription factor binding. *Hum Genet* 2002; 111:66–74.
- [27] Romey MC, Guittard C, Carles S, Demaille J, Claustres M, Ramsay M. First putative sequence alterations in the minimal *CFTR* promoter region. *J Med Genet* 1999; 36:263–4.
- [28] Pagani F, Stuani C, Tzetzis M, Kanavakis E, Efthymiadou A, Doudounakis S, et al. New type of disease causing mutations: the example of the composite exonic regulatory elements of splicing in *CFTR* exon 12. *Hum Mol Genet* 2003;12: 1111–20.
- [29] Taulan M, Lopez E, Guittard C, Rene C, Baux D, Altieri JP, et al. First functional polymorphism in *CFTR* promoter that results in decreased transcriptional activity and Spl/USF binding. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 361:775–81.
- [30] Alonso MJ, Heine-Sunyer D, Calvo M, Rosell J, Gimenez J, Ramos MD, et al. Spectrum of mutations in the *CFTR* gene in Cystic fibrosis patients of Spanish ancestry. *Ann Hum Genet* 2007; 71:194–201.
- [31] Dequeker E, Cuppens H, Dodge J, Estivill X, Goossens M, Pignatti PF, et al. Recommendations for quality improvement in genetic testing for cystic fibrosis. *Eur J Hum Genet* 2000; 8: S2-S24.
- [32] Dequeker E, Cassiman JJ. Genetic testing and quality control in diagnostic laboratories. *Nat Genet* 2000; 25:259–60.
- [33] Dequeker E, Ramsden S, Grody WW, Stenzel TT, Barton DE. Quality control in molecular genetic testing. *Nat Rev Genet* 2001; 2:717–23.
- [34] CF Network, <http://www.cfnetwork.be/>.
- [35] Rosenstein BJ, Cutting GR. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. *J Pediatr* 1998; 132: 589–95.
- [36] De Boeck K, Wilschanski M, Castellani C, Taylor C, Cuppens H, Dodge J, et al. Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms. *Thorax* 2006; 61:627–35.
- [37] Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, et al. Guidelines for Diagnosis of Cystic Fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Report. Submitted for publication to *J Pediatr*.
- [38] Groman JD, Hefferon TW, Casals T, Bassas L, Estivill X, Des Georges M, et al. Variation in a repeat sequence determines whether a common variant of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene is pathogenic or benign. *Am J Hum Genet* 2004; 74:176–9.
- [39] Chilton M, Casals T, Mercier B, Bassas L, Lissens W, Silber S, et al. Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. *N Engl J Med* 1995; 332:1475–80.
- [40] Ramalho AS, Beck S, Penque D, Gonska T, Seydewitz HH, Mall M, et al. Transcript analysis of the cystic fibrosis splicing mutation 1525–1 G > A shows
-

- use of multiple alternative splicing sites and suggests a putative role of exonic splicing enhancers. *J Med Genet* 2003; 40: e88.
- [41] Zielenski J, Bozon D, Markiewicz D, Aubin G, Simard F, Rommens JM, et al. Analysis of *CFTR* transcripts in nasal epithelial cells and lymphoblasts of a cystic fibrosis patient with 621 + 1 G->T and 711 + 1 G->T mutations. *Hum Mol Genet* 1993; 2:683-7.
- [42] Chu CS, Trapnell BC, Curristin S, Cutting GR, Crystal RG. Genetic basis of variable exon 9 skipping in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA. *Nat Genet* 1993; 3:151-6.
- [43] Highsmith WE, Burch LH, Zhou Z, Olsen JC, Boat TE, Spock A, et al. A novel mutation in the cystic fibrosis gene in patients with pulmonary disease but normal sweat chloride concentrations. *N Engl J Med* 1994; 331:974-80.
- [44] Amaral MD, Pacheco P, Beck S, Farinha CM, Penque D, Nogueira P, et al. Cystic fibrosis patients with the 3272-26 A > G splicing mutation have milder disease than F508del homozygotes: a large European study. *J Med Genet* 2001; 38:777-83.
- [45] Augarten A, Kerem BS, Yahav Y, Noiman S, Rivlin Y, Tal A, et al. Mild cystic fibrosis and normal or borderline sweat test in patients with the 3849+10 kbC->T mutation. *Lancet* 1993; 342:25-6.
- [46] Kerem E, Rave-Harel N, Augarten A, Madgar I, Nissim-Rafmia M, Yahav Y, et al. A cystic fibrosis transmembrane conductance regulator splice variant with partial penetrance associated with variable cystic fibrosis presentations. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155:1914-20.
- [47] Ramalho AS, Beck S, Meyer M, Penque D, Cutting GR, Amaral MD. Five percent of normal cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA ameliorates the severity of pulmonary disease in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 27:619-27.
- [48] Nissim-Rafinia M, Kerem B. Splicing regulation as a potential genetic modifier. *Trends Genet* 2002; 18:123-7.
- [49] Mak V, Jarvi KA, Zielenski J, Durie P, Tsui LC. Higher proportion of intact exon 9 *CFTR* mRNA in nasal epithelium compared with vas deferens. *Hum Mol Genet* 1997; 6:2099-107.
- [50] Rave-Harel N, Kerem E, Nissim-Rafinia M, Madjar I, Goshen R, Augarten A, et al. The molecular basis of partial penetrance of splicing mutations in cystic fibrosis. *Am J Hum Genet* 1997; 60:87-94.
- [51] Chiba-Falek O, Parad RB, Kerem E, Kerem B. Variable levels of normal RNA in different fetal organs carrying a cystic fibrosis transmembrane conductance regulator splicing mutation. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159:1998-2002.
- [52] Teng H, Jorissen M, Van Poppel H, Legius E, Cassiman JJ, Cuppens H. Increased proportion of exon 9 alternatively spliced *CFTR* transcripts in vas deferens compared with nasal epithelial cells. *Hum Mol Genet* 1997; 6:85-90.
- [53] Bombieri C, Giorgi S, Carles S, de Cid R, Belpinati F, Tandoi C, et al. A new approach for identifying non-pathogenic mutations. An analysis of the cystic fibrosis transmembrane regulator gene in normal individuals. *Hum Genet* 2000; 106:172-8.
- [54] Disset A, Michot C, Harris A, Buratti E, Claustres M, Tuffery-Giraud S. AT3 allele in the *CFTR* gene exacerbates exon 9 skipping in vas deferens and epididymal cell lines and is associated with Congenital Bilateral Absence of Vas Deferens (CBAVD). *Hum Mutat* 2005; 25:72-81.
- [55] Picci L, Cameran M, Scarpa M, Pradal U, Melotti P, Assael BM, et al. TGI5 T5 allele in clinically discordant monozygotic twins with cystic fibrosis. *Am J Med Genet A* 2007; 143:1936-7.
- [56] Cuppens H, Lin W, Jaspers M, Costes B, Teng H, Vankeerberghen A, et al. Polyvariant mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator genes the polymorphic (TG)_m locus explains the partial penetrance of the T5 polymorphism as a disease mutation. *J Clin Invest* 1998; 101:487-96.
- [57] Niksic M, Romano M, Buratti E, Pagani F, Baralle FE. Functional analysis of ra-acting elements regulating the alternative splicing of human *CFTR* exon 9. *Hum Mol Genet* 1999; 8:2339-49.
- [58] Delaney SJ, Rich DP, Thomson SA, Hargrave MR, Lovelock PK, Welsh MJ, et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator splice variants are not conserved and fail to produce chloride channels. *Natf Genet* 1993; 4:426-31.
- [59] Strong TV, Wilkinson DJ, Mansoura MK, Devor DC, Henze K, Yang Y, et al. Expression of an abundant alternatively spliced form of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene is not associated with a cAMP-activated chloride conductance. *Hum Mol Genet* 1993; 2:225-30.
- [60] Cuppens H, Teng H, Raeymaekers P, De Boeck C, Cassiman JJ. *CFTR* haplotype backgrounds on normal and mutant *CFTR* genes. *Hum Mol Genet* 1994; 3:607-14.
- [61] Noone PG, Pue CA, Zhou Z, Friedman KJ, Wakeling EL, Ganeshanthan M, et al. Lung disease associated with the IVS8 5 T allele of the *CFTR* gene. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:1919-24.
- [62] Ratbi L Legendre M, Niel F, Martin J, Soufir JC, Izard V, et al. Detection of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene rearrangements enriches the mutation spectrum in congenital bilateral absence of the vas deferens and impacts on genetic counselling. *Hum Reprod* 2007; 22:1285-91.
- [63] Kiesewetter S, Macek Jr M, Davis C, Curristin SM, Chu CS, Graham C, et al. A mutation in *CFTR* produces different phenotypes depending on chromosomal background. *Nat Genet* 1993; 5:274-8.
- [64] Scotet V, Audrezet MP, Roussey M, Rault G, Dirou-Prigent A, Journal HJB et al. Immunoreactive Trypsin/DNA newborn screening for cystic fibrosis: should the R117 H variant be included in *CFTR* mutation panels? *Pediatrics* 2006; 118:1523-9.
- [65] Peckham D, Conway SP, Morton A, Jones A, Webb K. Delayed diagnosis of cystic fibrosis associated with R117 H on a background of 7 T polythymidine tract at intron 8. *J Cyst Fibros* 2006; 5:63-5.
- [66] Bozon D, Zielenski J, Rininsland F, Tsui LC. Identification of four new mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene: I148 T, L1077 P, Y1092 X, 2183 AA->G. *Hum Mutat* 1994; 3:330-2
- [67] Grody WW, Cutting GR, Klinger KW, Richards CS, Watson MS, Desnick RJ. Laboratory standards and guidelines for population-based cystion fibrosis carrier screening. *Genet Med* 2001; 3:149-54.
- [68] Claustres M, Altieri JP, Guittard C, Templin C, Chevalier-Porst F, Des Georges M. Are p.I148 T, p.R74 Wand p.D1270 N cystic fibrosis causing mutations? *BMC Med Genet* 2004; 5:19.
- [69] Rohlf s EM, Zhou Z, Sugarman EA, Heim RA, Pace RG, Knowles MR, et al. The I148 T *CFTR* allele occurs on multiple haplotypes: a complex allele is associated with cystic fibrosis. *Genet Med* 2002; 4:319-23.
- [70] Buller A, Olson S, Redman JB, Hantash F, Chen R, Strom CM| Frequency of the cystic fibrosis 3199del6 mutation in individual heterozygous for I148 T. *Genet Med* 2004; 6:108-9.
- [71] Mekus F, Ballmann M, Bronsveld I, Dork T, Bijman J, Turnmmler B, et al. Cystic-fibrosis-like disease unrelated to the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Hum Genet* 1998; 102:582-6.
- [72] Mall M, Grubb BR, Harkema JR, O'Neal WK, Boucher RC. Increased airway epithelial Na (+) absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice. *Nat Med* 2004; 10:487-93.
- [73] Sheridan MB, Fong P, Groman JD, Conrad C, Flume P, Diaz R, et al. Mutations in the beta subunit of the epithelial Na⁺ channel in patient with a cystic fibrosis-like syndrome. *Hum Mol Genet* 2005; 14:3493-8. |

-
- [74] Kerem E, Kerem B. Genotype-phenotype correlations in cystic fibrosis *Pediatr Pulmonol* 1996; 22:387–95.
- [75] Davis PB. Cystic fibrosis since 1938. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173:475–82.
- [76] Zielenski J. Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiratol* 2000; 67:117–33.
- [77] McKone EF, Emerson SS, Edwards KL, Aitken ML. Effect of genotype on phenotype and mortality in cystic fibrosis: a retrospective cohort study *Lancet* 2003; 361:1671–6.
- [78] Kerem E, Corey M, Kerem B, Rommens J, Markiewicz D, Levison H, et al. The relationship between genotype and phenotype in cystic fibrosis – analysis of the most common mutation (AF508). *N Engl J Med* 1990; 323:1517–22
- [79] Santis G, Osborne L, Knight RA, Hodson ME. Independent genetic determinants of pancreatic and pulmonary status in cystic fibrosis. *Lancet* 1990; 336:1081–4.
- [80] Johansen HK, Nir M, Hoiby N, Koch C, Schwartz M. Severity of cystic fibrosis in patients homozygous and heterozygous for delta F508 mutation. *Lancet* 1991; 337:631–4.
- [81] Burke W, Aitken ML, Chen SH, Scott CR. Variable severity of pulmonary disease in adults with identical cystic fibrosis mutations. *Chest* 1992; 102:506–9.
- [82] Lai HJ, Cheng Y, Cho H, Kosorok MR, Farrell PM. Association between initial disease presentation, lung disease outcomes, and survival in patients with cystic fibrosis. *Am J Epidemiol* 2004; 159:537–46.
- [83] Tsui LC. The spectrum of cystic fibrosis mutations. *Trends Genet* 1992; 8:392–8.
- [84] Welsh MJ, Smith AE. Molecular mechanisms of *CFTR* chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* 1993; 73:1251–4.
- [85] Wilschanski M, Zielenski J, Markiewicz D, Tsui LC, Corey M, Levison H, et al. Correlation of sweat chloride concentration with classes of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations. *J Pediatr* 1995; 127:705–10.
- [86] McKone EF, Goss CH, Aitken ML. *CFTR* Genotype as a predictor of prognosis in cystic fibrosis. *Chest* 2006; 130:1441–7.
- [87] Sinaasappel M, Stem M, Littlewood J, Wolfe S, Steinkamp G, Heijerman HG, et al. Nutrition in patients with cystic fibrosis: a European Consensus. *J Cyst Fibros* 2002; 1:51–75.
- [88] Kristidis P, Bozon D, Corey M, Markiewicz D, Rommens J, Tsui LC, et al. Genetic determination of exocrine pancreatic function in cystic fibrosis. *Am J Hum Genet* 1992; 50:1178–84.
- [89] Cipolli M, Castellani C, Wilcken B, Massie J, McKay K, Gruca M, et al. Pancreatic phenotype in infants with cystic fibrosis identified by mutation screening. *Arch Dis Child* 2007; 92:842–6.
- [90] Dumo C, Corey M, Zielenski J, Tullis E, Tsui LC, Durie P. Genotype and phenotype correlations in patients with cystic fibrosis and pancreatitis. *Gastroenterology* 2002; 123:1857–64.
- [91] CF Genotype-phenotype Consortium. Correlation between genotype and phenotype in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1993; 329:1308–13.
- [92] Campbell III PW, Phillips 111 JA, Krishnamani MR, Maness KJ, Hazinski TA. Cystic fibrosis: relationship between clinical status and F508deletion. *J Pediatr* 1991; 118:239–41.
- [93] Lester LA, Kraut J, Lloyd-Still J, Karrison T, Mott C, Billstrand C, et al. Delta F508 genotype does not predict disease severity in an ethnically diverse cystic fibrosis population. *Pediatr* 1994; 93:114–8.
- [94] Borgo G, Gasparini P, Bonizzato A, Cabrini G, Mastella G, Pignatti PR The AF508 mutation does not lead to an exceptionally severe phenotype: a cohort study. *Eur J Pediatr* 1993; 152:1006–11.
- [95] Vanscoy LL, Blackman SM, Collaco JM, Bowers A, Lai T, Naughton K, et al. Heritability of lung disease severity in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175:1036–43.
- [96] Mekus F, Ballmann M, Bronsveld I, Bijman J, Veeze H, Tummler B. Categories of deltaF508 homozygous cystic fibrosis twin and sibling pairs with distinct phenotypic characteristics. *Twin Res* 2000; 3:277–93.
- [97] Corey M, Edwards L, Levison H, Knowles M. Longitudinal analysis of pulmonary function decline in patients with CF. *J Pediatr* 1997; 131:809–14.
- [98] Koch C, Cuppens H, Rainisio M, Madessani U, Harms H, Hodson M, et al. European Epidemiologic Registry of Cystic Fibrosis (ERCF): comparison of major disease manifestations between patients with different classes of mutations. *Pediatr Pulmonol* 2001; 31:1–12.
- [99] Wilschanski M, Rivlin J, Cohen S, Augarten A, Blau H, Aviram M, et al. Clinical and genetic risk factors for CF-related liver disease. *Pediatr* 1999; 103:52–7.
- [100] Blackman SM, Deering-Brose R, McWilliams R, Naughton K, Coleman B, Lai T, et al. Relative contribution of genetic and nongenetic modifiers to intestinal obstruction in cystic fibrosis. *Gastroenterology* 2006; 131:1030–9.
- [101] Stonebraker JR, Friedman KJ, Ling SC, Cipolli M, Debray D, Fernandez A, et al. Genetic modifiers of severe liver disease in cystic fibrosis: a replication study. *Pediatr Pulmonol* 2007; suppl 30:381.
- [102] Rosenecker J, Eichler I, Kuhn L, Harms H, von der Hardt H. Genetic determination of diabetes in patients with CF. *J Pediatr* 1995; 127:441–3.
- [103] Kaplan E, Shwachman H, Perlmutter AD, Rule A, Khaw KT, Holsclaw DS. Reproductive failure in males with CF. *N Engl J Med* 1968; 279:65–9.
- [104] Taussig LM, Lobeck CC, di Sant Agnese PA, Ackerman DR, Kattwinkel J. Fertility in males with CF. *N Engl J Med* 1972; 287:586–9.
- [105] Wilschanski M, Tullis E, Bain J, Tullis E, Bain J, Asch M, et al. The diversity of reproductive tract abnormalities in males with cystic fibrosis. *JAMA* 1996; 276:607–8.
- [106] Dumur V, Gervais R, Rigot JM, Lafitte JJ, Manouvrier S, Biserte J, et al. Abnormal distribution of CF delta F508 allele in azoospermic men with congenital aplasia of epididymis and vas deferens. *Lancet* 1990; 336:512.
- [107] Anguiano A, Oates RD, Amos JA, Dean M, Gerrard B, Stewart C, et al. Congenital bilateral absence of the vas deferens. A primarily genital form of cystic fibrosis. *JAMA* 1992; 267:1794–7.
- [108] Bombieri C, Benetazzo M, Saccomani A, Belpinati F, Gile LS, Luisetti M, et al. Complete mutational screening of the *CFTR* gene in 120 patients with pulmonary disease. *Hum Genet* 1998; 103:718–22.
- [109] Girodon E, Sternberg D, Chazouilleres O, Cazeneuve C, Huot D, Calmus Y, et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene defects in patients with primary sclerosing cholangitis. *J Hepatol* 2002; 37:192–7.
- [110] Miller PW, Hamosh A, Macek Jr M, Greenberger PA, MacLean J, Walden SM, et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene mutations in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Am J Hum Genet* 1996; 59:45–51.
- [111] Raman V, Clary R, Siegrist KL, Zehnbauser B, Chatila TA. Increased prevalence of mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in children with chronic rhinosinusitis. *Pediatrics* 2002; 109: E13.
- [112] Wang X, Moylan B, Leopold DA, Kim J, Rubenstein RC, Togiias A, et al. Mutation in the gene responsible for cystic fibrosis and predisposition to
-

-
- chronic rhinosinusitis in the general population. *JAMA* 2000; 284:1814–9.
- [113] Sharer N, Schwartz M, Malone G, Howarth A, Painter J, Super M, et al. Mutations in the CF gene in patients with chronic pancreatitis. *N Engl J Med* 1998; 339:645–52.
- [114] Cohn JA, Friedman KJ, Noone PG, Knowles MR, Silverman LM, Jowell PS. Relation between mutations of the cystic fibrosis gene and idiopathic pancreatitis. *N Engl J Med* 1998; 339:653–68.
- [115] Mercier B, Verlingue C, Lissens W, Silber SJ, Novelli G, Bonduelle M, et al. Is congenital bilateral absence of vas deferens a primary form of cystic fibrosis? Analyses of the *CFTR* gene in 67 patients. *Am J Hum Genet* 1995; 56:272–7.
- [116] Costes B, Girodon E, Ghanem N, Flori E, Jardin A, Soufir JC, et al. Frequent occurrence of the *CFTR* intron (TG)_n 5 T allele in men with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Eur J Hum Genet* 1995; 3:285–93.
- [117] Jarvi K, Zielenski J, Wilschanski M, Durie P, Buckspan M, Tullis E, et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and obstructive azoospermia. *Lancet* 1995; 345:1578.
- [118] de Braekeleer M, Ferec C. Mutations in the cystic fibrosis gene in men with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Mol Hum Reprod* 1996; 2:669–77.
- [119] Wilschanski M, Dupuis A, Ellis L, Jarvi K, Zielenski J, Tullis E, et al. Mutations in the cystic fibrosis transmembrane regulator gene and in vivo transepithelial potentials. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174:787–94.
- [120] Bishop MD, Reedman SD, Zielenski J, Ahmed N, Dupuis A, Martin S, et al. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene and ion channel function in patients with idiopathic pancreatitis. *Hum Genet* 2005; 118:372–81.
- [121] Cohn JA, Noone PG, Jowell PS. Idiopathic pancreatitis related to *CFTR*: complex inheritance and identification of a modifier gene. *J Investig Med* 2002; 50:247 S-55 S Review.
- [122] Castellani C, Lira MG, Frulloni L, Delmarco A, Marzari M, Bonizzato A, et al. Analysis of the entire coding region of the cystic fibrosis transmembrane regulator gene in idiopathic pancreatitis. *Hum Mutat* 2001; 18:166.
- [123] Ockenga J, Struhrmann M, Ballmann M, Teich N, Keim V, Dork T, et al. Mutations of the CF gene but not cationic trypsinogen gene are associated with recurrent or chronic idiopathic pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 2000; 95:2061–7.
- [124] Casals T, Bassas L, Egozcue S, Ramos MD, Gimenez J, Segura A, et al. Heterogeneity for mutations in the *CFTR* gene and clinical correlations in patients with congenital absence of the vas deferens. *Hum Reprod* 2000; 15: 1476–83.
- [125] Ziedalski T, Kao P, Henig NR, Jacobs SS, Ruoss SJ. Prospective analysis of cystic fibrosis transmembrane regulator mutations in adults with bronchiectasis or pulmonary nontuberculous mycobacterial infection. *Chest* 2006; 130: 995-10-02.
- [126] Hubert D, Fajac I, Bienvenu T, Desmazes-Dufeu N, Ellaffi M, Dall'Ava-Santucci J, et al. Diagnosis of CF in adults with diffuse bronchiectasis. *J Cyst Fibros* 2004; 3:203.
- [127] Girodon E, Cazeneuve C, Lebargy F, Chinnet T, Costes B, Ghanem N, et al. *CFTR* gene mutations in adults with disseminated bronchiectasis. *Eur J Hum Genet* 1997; 5:149–55.
- [128] Pignatti PF, Bombieri C, Marigo C, Benetazzo M, Luisetti M. Increased incidence of cystic fibrosis gene mutations in adults with disseminated bronchiectasis. *Hum Mol Genet* 1995; 4:635–9.
- [129] Tzetis M, Efthymiadou A, Strofalis S, Psychou P, Dimakou A, Pouliou E, et al. *CFTR* gene mutations-including three novel nucleotide substitutions-and haplotype background in patients with asthma, disseminated bronchiectasis and chronic obstructive pulmonary disease. *Hum Genet* 2001; 108:216–21.
- [130] Casals T, De-Gracia J, Gallego M, Dorca J, Rodriguez-Sanchdn B, Ramos MD, et al. Bronchiectasis in adult patients: an expression of heterozygosity for *CFTR* gene mutations? *Clin Genet* 2004; 65:490–5.
- [131] Garred P, Pressler T, Madsen HO, Frederiksen B, Svejgaard A, Hoiby N, et al. Association of mannose-binding lectin gene heterogeneity with severity of lung disease and survival in cystic fibrosis. *J Clin Invest* 1999; 104:431–7.
- [132] Davies JC, Turner MW, Klein N. London MBL CF Study Group. Impaired pulmonary status in cystic fibrosis adults with two mutated MBL-2 alleles. *Eur Respir J* 2004; 24:798–804.
- [133] Yarden J, Radojkovic D, De Boeck K, Macek Jr M, Zemkova D, Va\Tova V, et al. Polymorphisms in the mannose binding lectin gene affect the cystic fibrosis pulmonary phenotype. *J Med Genet* 2004; 41:629–33.
- [134] Drumm ML, Konstan MW, Schluchter MD, Handler A, Pace R, Zou F, et al. Genetic modifiers of lung disease in cystic fibrosis. *N Engl J Med* 2005; 353:1443–53.
- [135] Dorfman R, Zielenski J. Genotype/phenotype correlations. In: Bush A, Alton E, Davies J, Griesenbach U, editors. *Cystic fibrosis in the 21 st century*. Progress in Respiratory Research/Basel: S. Karger AG; 2006. p. 61–8.
- [136] <http://www.isol5189.com/>.
- [137] Guidelines for quality assurance in molecular genetic testing. OECD; 2007. <http://www.oecd.org/dataoecd/43/6/38839788.pdf>.
- [138] Best practice guidelines on reporting in molecular genetic diagnostic laboratories in Switzerland; 2003.
- [139] <http://www.ssgm.ch/sections/pdf/current/publications/SSGM%20reporting%20guidelines%20dna%20v1.pdf>.
- [140] American College of Medical genetics, edition: Technical standards and guidelines for *CFTR* mutation testing. http://www.acmg.net/Pages/ACMG_Activities/stds-2002/cf.htm. 2006.
- [141] Groman JD, Karczeski B, Sheridan M, Robinson TE, Fallin MD, Cutting GR. Phenotypic and genetic characterization of patients with features of “nonclassic” forms of cystic fibrosis. *J Pediatr* 2005; 146:675–80.
- [142] <http://www.hgvs.org>.
- [143] Lebo RV, Grody WW. Testing and reporting ACMG cystic fibrosis mutation panel results. *Genet Test* 2007; 11:11–31.
- [144] Fryer A. The genetic testing of children. *J R Soc Med* 1997;90:419–21.
- [145] Grody WW, Cutting GR, Watson MS. The cystic fibrosis mutation “arms race”: when less is more. *Genet Med* 2007; 9:739–44.
- [146] Perez MM, Luna MC, Pivetta OH, Keyeux G. *CFTR* gene analysis in Latin American CF patients: heterogeneous origin and distribution of mutations across the continent. *J Cyst Fibros* 2007; 6:194–208.
- [147] Alibakhshi R, Kianishirazi R, Cassiman JJ, Zamani M, Cuppens H. Analysis of the *CFTR* gene in Iranian cystic fibrosis patients: identification of eight novel mutations. *J Cyst Fibros* 2008; 7:102–9.
- [148] Shastri SS, Kabra M, Kabra SK, Pandey RM, Menon PS. Characterisation of mutations and genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis: experience from India. *J Cyst Fibros* 2008; 7:110–5.
-

- [149] Wei S, Feldman GL, Monaghan KG. Cystic fibrosis testing among Arab-Americans. *Genet Med* 2006; 8:255–8.
- [150] Schrijver I, Ramalingam S, Sankaran R, Swanson S, Dunlop CL, Keiles S, et al. Diagnostic testing by *CFTR* gene mutation analysis in a large group of Hispanics: novel mutations and assessment of a population-specific mutation spectrum. *J Mol Diagn* 2005; 7:289–99.
- [151] Sugarman EA, Rohlfes EM, Silverman LM, Allitto BA. *CFTR* mutation distribution among U.S. Hispanic and African American individuals: evaluation in cystic fibrosis patient and carrier screening populations. *Genet Med* 2004; 6:392–9.
- [152] Chiba-Falek O, Kerem E, Shoshani T, Aviram M, Augarten A, Bentur L, et al. The molecular basis of disease variability among cystic fibrosis patients carrying the 3849 + 10 kbC->T mutation. *Genomics* 1998; 53:276–83.
- [153] Highsmith Jr WE, Burch LH, Zhou Z, Olsen JC, Strong TV, Smith T, et al. Identification of a splice site mutation (2789 + 5 G > A) associated with small amounts of normal *CFTR* mRNA and mild cystic fibrosis. *Hum Mutat* 1997; 9:332–8.
- [154] Chillon M, Dork T, Casals T, J, Gimenez J, Fonknechten N, Will K, et al. A novel donor splice site in intron 11 of the *CFTR* gene, created by mutation 1811 + 1.6 kbA->G, produces a new exon: high frequency in Spanish cystic fibrosis chromosomes and association with severe phenotype. *Am J Hum Genet* 1995; 56:623–9.

Словарь терминологии

Аллель:	альтернативные варианты структуры гена в определенном локусе.
Мутация, приводящая к развитию МВ:	Изменение последовательности нуклеотидов ДНК, приводящее к развитию МВ, находящееся в транс-положении с: другой мутацией, приводящей к развитию МВ
Связанные с МВТР нарушения:	клинические проявления, связанные с мутацией гена МВТР, при наличии которых диагноз МВ не может быть установлен на основании действующих стандартных диагностических критериев.
Сложный аллель:	более двух функциональных изменений ДНК в пределах одного аллеля.
Экзон:	участок ДНК в пределах гена, который подвергается транскрипции в готовую мРНК и обычно содержит кодирующую информацию.
Мутация со сдвигом рамки:	сопровождающаяся делецией или инсерцией мутация, охватывающая такое количество пар оснований, которое не является точно кратным трем, и приводящая к изменению рамки считывания гена.
Генетическое сканирование:	анализ ДНК с помощью непрямых методик, в отличие от прямой идентификации посредством секвенирования, нацеленный на идентификацию нарушений последовательности нуклеотидов.
Секвенирование гена:	процесс регистрации точной последовательности нуклеотидов в определенном участке гена.
В цис-положении:	две мутации, находящиеся в пределах одного и того же «родительского» гена МВТР.
В транс-положении:	две мутации, находящиеся на различных «родительских» генах МВТР.
Гаплотип:	серия аллелей, находящихся в близлежащих локусах одной и той же хромосомы.
Интрон:	некодирующая последовательность нуклеотидов ДНК, которая сначала копируется в РНК, однако вырезается из окончательного транскрипта РНК.
Миссенс-мутация:	одинарная замена входящего в состав ДНК азотистого основания, приводящая к образованию кодона, кодирующего другую аминокислоту.
Ген-модификатор:	ген, оказывающий влияние на фенотипическое проявление другого гена.
Мутация:	изменение последовательности нуклеотидов ДНК, молекулярные и клинические последствия которого не установлены (они могут быть вредоносными, благоприятными, или их вовсе может не быть).
Нонсенс-мутация:	одинарная замена входящего в состав ДНК азотистого основания, приводящая к образованию кодона терминации (стоп-кодона).

Полиморфизм:	В популяционной генетике – изменение нуклеотидной последовательности ДНК, частота которого в общей популяции составляет не менее 1% случаев. В медицинской генетике термин «полиморфизм» зачастую неправильно используют в качестве синонима для вариации, не приводящей к развитию заболевания.
Промотор:	последовательность нуклеотидов ДНК, расположенная выше кодирующей последовательности гена, которая содержит информацию для временной и пространственной активации гена.
Сегрегационный анализ:	процедура для изучения характера наследования признака в семье.
Сплайсинг:	удаление интронов при создании зрелой РНК.
Однородительская дисомия:	ситуация, при которой обе копии пары хромосом возникли из хромосом одного родителя.