

DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-177-184

# Использование технологий секвенирования следующего поколения в диагностике врожденных ошибок иммунной системы

Е.А. Полякова, И.Е. Гурьянова, В.Р. Вертелко, А.В. Любушкин, Е.Я. Скопонец, С.Н. Алешкевич, Ю.С. Жаранкова, С.О. Шарапова, М.В. Белевцев

ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», Республика Беларусь, Минский район, д. Боровляны

Первичные иммунодефициты – врожденные генетически опосредованные нарушения иммунитета. Достижения в области молекулярно-генетических технологий позволяют проводить одновременное исследование большого количества генов у одного и того же пациента. Цель – провести оценку структуры мутационного профиля в образцах ДНК пациентов с различными вариантами первичных иммунодефицитов. В данном исследовании авторами продемонстрировано использование технологии секвенирования следующего поколения с применением панели, разработанной в ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» (Республика Беларусь), состоящей из 290 генов, в литературе ассоциированных с первичными иммунодефицитами. Исследование выполнено у 96 пациентов с клиническим анамнезом, указывающим на первичный иммунологический дефект. В результате выполненного исследования в 37,5% случаев (36/96 пациентов) выявлены дефекты в генах, приводящие к нарушениям иммунной системы.

**Ключевые слова:** первичный иммунодефицит, секвенирование, генные дефекты, панель генов, секвенирование следующего поколения

Полякова Е.А. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2023; 22 (3): 177–84. DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-177-184

## The use of next generation sequencing technologies for the diagnosis of inborn errors of immunity

E.A. Polyakova, I.E. Guryanova, V.R. Vertelko, A.V. Liubushkin, K.Ya. Skapavets, S.N. Aleshkevich, Yu.S. Zharankova, S.O. Sharapova, M.V. Belevtsev

The Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, the Republic of Belarus, Minsk Region, Borovlyany

Primary immunodeficiencies are congenital genetically determined immune disorders. Recent advances in molecular genetic technologies have enabled a simultaneous analysis of a large number of genes in a patient. The purpose of this study was to analyze the mutational spectrum in DNA samples collected from patients with various types of primary immunodeficiencies. In this study, we applied next-generation sequencing technology using a panel developed at the Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology and consisting of 290 genes that are associated with primary immunodeficiencies according to the existing literature. The testing was carried out in 96 patients with a clinical history suggesting a primary immunological defect. As a result, 37.5% of cases (36/96 patients) were found to harbor genetic defects that lead to disorders of the immune system.

**Key words:** primary immunodeficiency, sequencing, gene defects, gene panel, next generation sequencing

Polyakova E.A., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2023; 22 (3): 177–84. DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-177-184

Первичные иммунодефициты (ПИД) – это генетические заболевания, которые влияют на развитие и/или функцию иммунной системы, тем самым повышая восприимчивость к инфекционным патогенам, аутовоспалению и злокачественным новообразованиям [1].

В настоящее время, по данным экспертного комитета Международного союза иммунологических обществ (IUIS), насчитывается более 485 генетических дефектов, затрагивающих различные компоненты иммунной системы [2]. Если ранее ПИД

считались моногенными заболеваниями, то благодаря молекулярно-генетическим достижениям последних лет установлено, что ПИД могут возникать и из-за полигенных дефектов [3]. Вариации генотипа и фенотипа ПИД с нетипичными проявлениями делают диагностику еще более сложной по причине того, что генетические дефекты в одном и том же гене могут приводить к различным клиническим проявлениям [4, 5]. Клинико-лабораторные признаки часто недостаточно специфичны, что не всегда позволяет с уверенностью поставить диагноз. Выявление молеку-

© 2023 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России  
Поступила 06.10.2022  
Принята к печати 28.06.2023

### Контактная информация:

Полякова Екатерина Александровна, канд. биол. наук, заведующая лабораторией генетических биотехнологий ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» (Республика Беларусь)  
Адрес: Республика Беларусь, 223053, Минский район, д. Боровляны, ул. Фрунзенская, 43  
E-mail: polyakovakat86@gmail.com

© 2023 by «D. Rogachev NMRCPHO»

Received 06.10.2022  
Accepted 28.06.2023

### Correspondence:

Ekaterina A. Polyakova, Cand. Biol. Sci., Head of the Laboratory of Genetic Biotechnology at the Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology  
Address: 43 Frunzenskaya St., Borovlyany 223053, Minsk District, Belarus  
E-mail: polyakovakat86@gmail.com

лярно-генетической причины ПИД является важным для назначения своевременного таргетного индивидуального лечения либо куративного лечения – излечения пациента путем трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

Секвенирование по Сэнгеру является традиционным подходом к исследованию генов, ассоциированных с ПИД, однако оно в основном направлено на секвенирование ДНК одного или очень небольшого числа генов, что требует много времени и часто приводит к запоздалой диагностике. Ввиду клинической и генетической гетерогенности ПИД применение данного метода в диагностике не всегда эффективно [5]. Достижения в технологиях секвенирования ДНК облегчили идентификацию мультигенных причин ПИД и выявили широкую фенотипическую изменчивость данных заболеваний [6].

Появление технологии секвенирования следующего поколения (next generation sequencing, NGS) явилось прорывом в области молекулярной биологии. Возможность генерирования огромного массива данных изменила научный подход к фундаментальным, прикладным и клиническим исследованиям [7, 8].

Технология NGS стала ценным диагностическим инструментом для своевременного определения генетических нарушений, в частности при сложных клинических проявлениях ПИД. Она позволила исследовать десятки, сотни и даже миллионы фрагментов генов одновременно путем их параллельного прочтения [8]. Использование NGS при диагностике ПИД может верифицировать заболевание на молекулярно-генетическом уровне у пациента с подозреваемым или классическим фенотипом, а также выявить новые генетические причины дефектов иммунной системы, расширить фенотипы генных заболеваний, прояснить механизм заболевания, тип наследования или выявить новые типы ПИД.

Полезность и эффективность применения технологии NGS в диагностике ПИД продемонстрирована в ряде исследований [9–13]. Ранняя диагностика ПИД имеет решающее значение для назначения своевременного лечения и улучшения качества жизни пациентов.

**Цель исследования** – провести оценку структуры мутационного профиля в образцах ДНК пациентов с различными вариантами ПИД.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование включены 96 пациентов, прошедших обследование на базе ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» (Республика Беларусь) с клиническими и/или лабораторными признаками

нарушений иммунной системы. У 3/96 пациентов, включенных в исследование, был четкий клинический и иммунологический фенотип, соответствующий атаксии-телеангиэктазии. В 93/96 случаях четко очерченного фенотипа конкретного иммунодефицита не было по причине того, что ПИД – обширная группа наследственных заболеваний, которая включает множество нозологий, и предположить диагноз каждого пациента не всегда представлялось возможным.

В исследование не были включены пациенты с синдромом Диджорджи, поскольку диагностика данного типа ПИД проводится методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH), а также пациенты с подозрением на синдром Ниймеген, у которых поиск «славянской мутации» гена *NBN* осуществляли методом капиллярного секвенирования по Сэнгеру.

Для исследования использовали геномную ДНК пациентов, выделенную из лейкоцитов периферической крови методом фенол-хлороформной экстракции. Минимальная пороговая концентрация выделенной ДНК составляла  $\geq 10$  нг/мкл с соотношением оптической плотности 260 нм/280 нм и 230 нм/260 нм  $\geq 1,8$ .

Для осуществления таргетного секвенирования сотрудниками ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» (Республика Беларусь) был сформирован генетический профиль, состоящий из 290 генов, мутации в которых могут приводить к первичной иммунной недостаточности, к ним относятся: *ACP5, ACTB, ADA, ADAR, AGA, AICDA, AIRE, AK2, ALG13, AP3B1, APOL1, ATM, B2M, BCL10, BLM, BLNK, BLOC1S6, BTK, CA2, CARD11, CARD14, CARD9, CASP10, CASP8, CCBE1, CD19, CD247, CD27, CD3D, CD3E, CD3G, CD4, CD40, CD40LG, CD79A, CD79B, CD8A, CEBPE, CECR1, CFHR1, CFHR3, CHD7, CIITA, CLCN7, CNBP, COLEC11, COPA, c, CREBBP, CSF2RA, CSF3R, CTLA4, CTPS1, CTSC, CXCR4, CYBA, CYBB, DCLRE1B, DCLRE1C, DKC1, DNMT3B, DOCK2, DOCK8, ELF4, EPG5, FADD, FAS, FASLG, FCGR1A, FCGR2A, FCGR2B, FCGR3A, FCGR3B, FCGR3C, FERMT3, FOXP1, FOXP3, G6PC, G6PC3, G6PD, GATA1, GATA2, GF11, GJC2, GTF2H5, HAX1, ICOS, IFIH1, IFNGR1, IFNGR2, IGLL1, IKBKB, IKBKG, IKZF1, IL10, IL10RA, IL10RB, IL12B, IL12RB1, IL12RB2, IL17F, IL17RA, IL17RC, IL18, IL1RN, IL21, IL21R, IL2RA, IL2RG, IL36RN, IL7R, INSR, IRAK4, IRF7, IRF8, ISG15, ITCH, ITGB2, ITK, JAGN1, JAK2, JAK3, KRAS, LAMTOR2, LCK, LIG1, LIG4, LPIN2, LRBA, LRRRC8A, LYST, MAGT1, MAL, MALT1, MAN2B1, MANBA, MAP3K14, MBD5, MBL2, MC2R, MCM4, MEFV, MKL1, MLPH, MOGS, MPO, MS4A1, MSH6, MTHFD1, MVK, MYD88, MYO5A, NBN, NCF1, NCF2, NCF4, NCSTN, NDNL2, NFAT5, NFKB1, NFKB2, NFKBIA, NHEJ1, NHP2, NKX2-5, NLRC4, NLRP12, NLRP3, NOD2, NOP10, NRAS,*

*ORAI1, OSTM1, PARN, PCCA, PCCB, PEPD, PIGA, PIK3CD, PIK3R1, PLAG2, PMM2, PMS2, PNP, POLE, PRF1, PRKDC, PRPS1, PSENE1, PSMB8, PSTPIP1, PTPN11, PTPRC, PTRF, RAB27A, RAC2, RAG1, RAG2, RASGRP2, RBCK1, RECQL4, RFX5, RFXANK, RFXAP, RHOH, RMRP, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C, RNF168, RNF31, RORC, RPSA, RTEL1, SAMD9L, SAMHD1, SBDS, SEMA3E, SERAC1, SH2D1A, SH3BP2, SKIV2L, SLC11A1, SLC29A3, SLC35C1, SLC37A4, SLC39A4, SLC46A1, SMARCA1, SP110, SPINK5, STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5B, STIM1, STK4, STX11, STXBP2, TAP1, TAP2, TAPBP, TAZ, TBK1, TBX1, TCF3, TCIRG1, TCN2, TERC, TERT, THBD, TICAM1, TIN2, TIRAP, TLR3, TMC6, TMC8, TMEM173, TNFRSF11A, TNFRSF13B, TNFRSF13C, TNFRSF1A, TNFRSF4, TNFRSF6B, TNFSF12, TNFSF4, TRAF3, TRAF3IP2, TREX1, TRNT1, TTC37, TTC7A, TYK2, UNC119, UNC13D, UNC93B1, UNG, USB1, VIPAS39, VPS13B, VPS33B, VPS45, WAS, WIPF1, WRAP53, XIAP.* Дизайн олигонуклеотидных зондов осуществляли с помощью DesignStudio Custom Assay Design Tool (Illumina, США) [14]. Олигонуклеотидные зонды подбирали таким образом, чтобы обеспечить возможность детектирования всех экзонов, сплайс-сайт-регионов, регуляторных и UTR-областей интересующих генов (UCSC hg19). В результате были определены 4923 таргетных региона общей протяженностью 1 247 195 пар оснований с 99% покрытием. На основании разработанного дизайна пробы олигонуклеотидных зондов синтезировали в компании Illumina (США).

Образцы ДНК пациентов секвенировали путем парно-концевого прочтения с использованием реагентов для пробоподготовки библиотеки DNA Prep with Enrichment Reference Guide (Illumina, США) и проб зондов, обеспечивающих амплификацию целевых регионов, согласно протоколу производителя [15, 16]. Секвенирование осуществляли при помощи прибора для NGS – MiSeq (Illumina, США).

Предобработку данных NGS (оценка качества, тримминг и фильтрация) проводили с использованием программных решений FastQC и Trimmomatic. Референсную последовательность (сборка генома UCSC hg19) и все необходимые для анализа файлы брали с платформы/ресурса UCSC Genome Browser.

Процедуру выравнивания библиотеки на подготовленную референсную последовательность проводили с использованием программы BWA (версия 0.7.17). Последующую обработку результатов (фильтрация, дедупликация, рекалибровка) проводили в программах Samtools (версия 1.7) и Picard (версия 2.26.7).

Для поиска и аннотации полученных вариантов использовали модули GATK (версия 4.2.3.0) и Annotvar соответственно.

Для биоинформатического анализа данных результатов NGS применяли программы и прило-

жения VariantStudio 3.0 (Illumina, США), BaseSpace (Illumina, США) и IGV (Broad Institute, Cambridge).

В целях оценки популяционных частот выявленных вариантов использовали данные международного проекта gnomAD Exomes (ExAC) для экзонных вариантов и базы gnomAD Genomes для интронных вариантов.

Для компьютерной оценки патогенности найденных миссенс-вариантов применяли алгоритмы предсказания патогенности замен аминокислот (SIFT, Polyphen-2, PROVEAN, CADD, REVEL, MetaLR, Mutation Assessor).

В целях оценки клинической релевантности выявленных вариантов использовали базы данных Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), Human Gene Mutation Database (HGMD), Leiden Open Variation Database (LOVD), Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC), поисковую систему для геномных вариаций человека varsome.com, базу данных ncbi.nlm.nih.gov/clinvar, руководство по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования, а также литературные данные о клинике ПИД (PubMed) [17, 18].

Выявленные генетические варианты были подтверждены методом капиллярного секвенирования по Сэнгеру и тщательно сопоставлены с клиническими признаками.

У 16/19 пациентов с выявленными вариантами в генах, которые участвуют в патогенезе ПИД с ауто-сомно-рецессивным типом наследования, было выполнено исследование ДНК родителей для доказательства транс-положения генетических дефектов. У 3 пациентов с клиническим и иммунологическим фенотипом атаксии-телеангиэктазии по причине отсутствия биологического материала одного из родителей данное исследование не проводилось и диагноз ПИД был установлен по клинической картине в соответствии с выявленным нарушением в гене *ATM*.

Исследование проведено в рамках научно-исследовательской работы №ИБ-02/2020 «Разработать и внедрить комплексный метод дифференциальной диагностики врожденных дефектов иммунной системы с использованием технологии таргетного секвенирования».

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

По результатам запусков высокопроизводительного секвенирования 98,1% целевых пар оснований имели как минимум 30-кратное покрытие. Средняя глубина покрытия составила 264,1x.

Патогенные нарушения выявлены у 40/96 пациентов, среди них миссенс, нонсенс, нарушения в

сайтах-сплайсинга и делеции, приводящие к сдвигу рамки считывания. У 3/96 пациентов выявлены патогенные, однако не описанные в литературе варианты.

По результатам таргетного NGS пациенты были разделены на 7 групп в зависимости от выявленной генетической поломки в гене в соответствии с классификацией ПИД [2]:

1-я группа – пациенты с иммунодефицитами с поражением клеточного и гуморального звена иммунитета ( $n = 5$ ). Данные представлены в *таблице 1*;

2-я группа – пациенты с ПИД с преимущественным дефицитом антител ( $n = 7$ ), данные представлены в *таблице 2*;

**Таблица 1**  
Результаты таргетного NGS в группе комбинированных ПИД

Table 1  
The results of targeted next-generation sequencing (NGS) in the group of combined primary immunodeficiencies (PIDs)

Ген Gene	Выявленное генетическое нарушение The identified genetic abnormality			Зиготность Zygosity	Тип наследования Type of inheritance	Клинический и иммунологический фенотип Clinical and immunological phenotype
	Референсная последовательность Reference sequence	На уровне кодирующей последовательности At the coding sequence level	На уровне аминокислотной последовательности At the amino acid sequence level			
ADA	NM_000022.4	c.311C>T	p.P104L	Het	AR	ТКИН SCID
		c.478+5_478+10 del GTAGGA	–	Het		
IL2RG	NM_000206.3	c.854 G>T	p.R285L	Hem	XLR	ТКИН SCID
RAG1	NM_001377280.1	c.256_257 del AA	p.K86VfsTer33	Hom	AR	ТКИН SCID
RAG1	NM_001377280.1		p.K86VfsTer33	Het	AR	ТКИН SCID
RAG1	NM_001377280.1	c.1331C>T	p.A444V	Het	AR	ТКИН SCID
		c.256_257 del AA	p.K86VfsTer3	Het		
RAG1	NM_001377280.1	c.983 G>A	p.C328T	Het	AR	ТКИН SCID
				Het		

Примечание. Здесь и в таблицах 2–7: Het – гетерозигота; Hem – гемизигота; Hom – гомозигота; AR – аутосомно-рецессивный тип наследования; XLR – X-сцепленный рецессивный тип наследования; ТКИН – тяжелая комбинированная иммунная недостаточность.

Notes. Here and in tables 2–7: Het – a heterozygote; Hem – a hemizygote; Hom – a homozygote; AR – autosomal recessive inheritance; XLR – X-linked recessive inheritance; SCID – severe combined immunodeficiency.

**Таблица 2**  
Результаты таргетного секвенирования в группе ПИД с преимущественным дефицитом антител

Table 2  
The results of targeted sequencing in the PID group with predominantly antibody deficiency

Ген Gene	Выявленное генетическое нарушение The identified genetic abnormality			Зиготность Zygosity	Тип наследования Type of inheritance	Клинический и иммунологический фенотип Clinical and immunological phenotype
	Референсная последовательность Reference sequence	На уровне кодирующей последовательности At the coding sequence level	На уровне аминокислотной последовательности At the amino acid sequence level			
NFKB1	NM_003998.4	c.275G>T	p.G92V	Het	AD	ОВИН CVID
NFKB1	NM_003998.4	c.2575_2579delCTTAT	p.L859GfsTer4	Het	AD	ОВИН CVID
AICDA	NM_020661.4)	c.259T>C	p.C87R	Hom	AR	Имунодефицит с гипер-IgM Immunodeficiency with hyper-IgM
BTK	NM_000061.3	c.1901G>A	p.W634Ter	Hem	XLR	X-АГ XLA
PIK3CD	NM_005026.5)	c.3061G>A	p.E1021K	Het	AD	Имунодефицит с преимущественным дефицитом антител Immunodeficiency with predominantly antibody deficiency
PIK3CD	NM_005026.5)	<b>c.1189G&gt;A</b>	<b>p.V397M</b>	Het	AD	Имунодефицит с преимущественным дефицитом антител Immunodeficiency with predominantly antibody deficiency
PIK3CD	NM_005026.5)	<b>c.859G&gt;C</b>	<b>p.D287H</b>	Het	AD	Имунодефицит с преимущественным дефицитом антител Immunodeficiency with predominantly antibody deficiency

Примечание. Здесь и в таблицах 3, 4, 6: AD – аутосомно-доминантный тип наследования; X-АГ – X-сцепленная агаммаглобулинемия; ОВИН – общая переменная иммунная недостаточность. Полуужирным шрифтом обозначены ранее не описанные варианты.

Notes. Here and in tables 3, 4, 6: AD – autosomal dominant inheritance; XLA – X-linked agammaglobulinemia; CVID – common variable immunodeficiency. Previously unreported genetic variants are highlighted in bold.

3-я группа – пациенты с заболеваниями иммунной дисрегуляции ( $n = 10$ ), подробные данные приведены в таблице 3;

4-я группа – пациенты с комбинированными иммунодефицитами, ассоциированными с синдромальными проявлениями ( $n = 9$ ), данные представлены в таблице 4;

5-я группа – пациенты с врожденными дефектами числа и функции фагоцитов ( $n = 1$ ), данные приведены в таблице 5;

6-я группа – пациенты с дефектами врожденного иммунитета ( $n = 3$ ), данные приведены в таблице 6;

7-я группа – пациенты с аутовоспалительными синдромами ( $n = 4$ ), данные представлены в таблице 7.

Частота встречаемости в популяции выявленных вариантов составляла менее 1%. В соответствии с рекомендациями ACMG, поисковой системой геномных вариаций человека varsome.com и базой данных.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar, все мутации относились к вероятно патогенным. Все выявленные варианты относились уже к ранее описанным за исключением 2 вариантов в гене *PIK3CD* (p.V397M, p.D287H) и 1 варианта в гене *XIAP* (p.C227SfsTer17).

У 36/96 пациентов на основании результатов, полученных в ходе исследования, подтвержден иммунологический и клинически предполагаемый диагноз ПИД. У 57/96 пациентов, по данным алгоритмов предсказания патогенности и описания в литературе, выявлены только непатогенные генетические варианты либо варианты с частотой встречаемости минорного аллеля в популяции более 1%.

Согласно опубликованным в литературе данным, использование панелей генов для NGS может обеспечить выявление генетических вариантов от 15 до 70% в зависимости от фенотипов пациентов [19, 20]. Так, по данным W. Rae и соавт., с использованием таргетной панели из 245 генов, участвующих в патогенезе ПИД, в 13/27 случаях выявлены варианты, которые были классифицированы как патогенные/вероятно патогенные и соответствовали фенотипу пациентов [21]. В исследовании A. Bisgin и соавт. генетический вариант, который являлся причиной ПИД, был обнаружен у 17/37 пациентов с использованием таргетной панели, включающей 62 гена [22]. В нашем исследовании у 37/96 пациентов клинический диагноз нашел свое генетическое подтверждение среди исследуемых таргетных

**Таблица 3**  
Результаты таргетного секвенирования в группе ПИД с иммунной дисрегуляцией

**Table 3**  
The results of targeted sequencing in the PID group with immune dysregulation

Ген Gene	Выявленное генетическое нарушение The identified genetic abnormality			Зиготность Zygosity	Тип наследования Type of inheritance	Клинический и иммунологический фенотип Clinical and immunological phenotype
	Референсная последовательность Reference sequence	На уровне кодирующей последовательности At the coding sequence level	На уровне аминокислотной последовательности At the amino acid sequence level			
<i>AIRE</i>	NM_000383.4	c.769C>T	p.R257Ter	Hom	AR	Синдром APECED APECED syndrome
<i>CTLA4</i>	NM_005214.5	c.115_139delinGAAAA	p.H39EfsTer14	Het	AD	ИДС с дефектом регуляторных Т-клеток ID with regulatory T cell defect
<i>UNC13D</i>	NM_199242.3	c.2346_2349delGGAG	p.R782SfsTer12	Hom	AR	Семейный ГЛГ Familial HLH
		c.2346_2349delGGAG	p.R782SfsTer12	Het		
<i>UNC13D</i>	NM_199242.3	c.2216_2239del ACACGCTGCATGC CCAGCTGCAGA	p.N739_Q746del	Het	AR	Семейный ГЛГ Familial HLH
<i>UNC13D</i>	NM_199242.3	c.2346_2349delGGAG	p.R782SfsTer12	Het	AR	Семейный ГЛГ Familial HLH
		c.576_577delITG	p.F192LfsTer39	Het		
<i>UNC13D</i>	NM_199242.3	c.2346_2349delGGAG	p.R782SfsTer12	Het	AR	Семейный ГЛГ Familial HLH
		c.576_577delITG	p.F192LfsTer39	Het		
<i>UNC13D</i>	NM_199242.3	c.766C>T	p.R256Ter	Het	AR	Семейный ГЛГ Familial HLH
		c.1828_1829insA	p.R610QfsTer7	Het		
<i>XIAP</i>	NM_001378591.1	c.955 C>T	p.Q319Ter	Hem	XLR	X-сцепленный ЛПС X-linked LPS
<b><i>XIAP</i></b>	<b>NM_001378591.1</b>	<b>c.678_681delTTGC</b>	<b>p.C227SfsTer17</b>	<b>Hem</b>	<b>XLR</b>	<b>X-сцепленный ЛПС X-linked LPS</b>
<i>FOXP3</i>	NM_014009.4	c.748_750 del AAG	p.K250del	Hem	XLR	ИДС, поли-эндокринопатия и энтеропатия, сцепленные с X-хромосомой ID, polyendocrinopathy and enteropathy, X-linked

Примечание. APECED – аутоиммунная полиэндокринопатия–кандидоз–эктодермальная дистрофия; ГЛГ – гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз; ИДС – иммунодефицитное состояние; ЛПС – лимфопролиферативный синдром.  
Notes. APECED – autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy; HLH – hemophagocytic lymphohistiocytosis; ID – immunodeficiency; LPS – lymphoproliferative syndrome.

регионов, таким образом, следует учитывать, что использование метода диагностики, основанного на технологии NGS, может и не выявить генетическую основу заболевания даже у пациентов с явными нарушениями в функционировании иммунной системы ввиду технических ограничений.

Одной из наиболее возможных причин невыявления генетических ассоциаций с клиническим фенотипом является ограниченное количество генов, включенных в нашу целевую панель NGS в сравнении с известными к настоящему времени почти 500 генами, ассоциированными с ПИД, что, вероятно, отразилось на количестве выявленных случаев ПИД в нашем исследовании. Второй причиной является наличие высокомолекулярных регионов или повторов

в последовательностях генов. Третьим ограничением является то, что метод не предназначен для выявления протяженных делеций, инсерций, дупликаций.

Несмотря на вышеупомянутые ограничения, метод выявления генетических нарушений посредством применения технологии NGS представляет собой эффективный и быстрый диагностический подход к ПИД. Преимуществом является одновременное секвенирование множества генов, что приводит к определению истинной причины ПИД. В целом, несмотря на более высокую стоимость реагентов, на данный момент NGS может входить в число исследований первой линии лабораторной диагностики ПИД. Быстрая диагностика демон-

Таблица 4

Результаты таргетного секвенирования в группе комбинированных ПИД с синдромальными проявлениями

Table 4

The results of targeted sequencing in the group of combined PIDs with syndromic features

Ген Gene	Выявленное генетическое нарушение The identified genetic abnormality			Зиготность Zygoty	Тип наследования Type of inheritance	Клинический и иммунологический фенотип Clinical and immunological phenotype
	Референсная последовательность Reference sequence	На уровне кодирующей последовательности At the coding sequence level	На уровне аминокислотной последовательности At the amino acid sequence level			
NRAS	NM_002524.5	c.183A>C	p.Q61H	Het	AD	Синдром Нунан Noonan syndrome
ZBTB24	NM_014797.3	c.1222T>G	p.C408G	Hom	AR	Синдром иммунодефицита-центромерной нестабильности-лицевых аномалий Immunodeficiency, centromeric region instability, facial anomalies syndrome
KRAS	NM_004985.5	c.35G>C	p.G12A	Het	AD	RAS- ассоциированное аутоиммунное лейкопролиферативное заболевание RAS-associated autoimmune leukoproliferative disorder
WAS	NM_000377.3	c.374G>A	p.G125E	Hem	XLR	Синдром Вискотта-Олдрича Wiskott-Aldrich syndrome
WAS	NM_000377.3	c.1453G>A	p.L270P	Hem	XLR	Синдром Вискотта-Олдрича Wiskott-Aldrich syndrome
BLM	NM_001287247.2	c.1642 C>T	p.Q548Ter	Hom	AR	Синдром Блума Bloom syndrome
ATM	NM_000051.4	c.4002_4005 delCTTA	p.H1334FfsTer12	Het	AR	Атаксия-телеангиэктазия Ataxia-telangiectasia
		c.4148 C>A	p.S1383Ter	Het		
ATM	NM_000051.4	c.7307+1 G>;A	-	Het	AR	Атаксия-телеангиэктазия Ataxia-telangiectasia
		c.5932 G>T	p.E1978 Ter	Het		
ATM	NM_000051.4	c.4148 C>A	p.S1383Ter	Het	AR	Атаксия-телеангиэктазия Ataxia-telangiectasia

Таблица 5

Результаты таргетного секвенирования в группе ПИД с врожденными дефектами числа и функции фагоцитов

Table 5

The results of targeted sequencing in the PID group with congenital defects in phagocyte number and function

Ген Gene	Выявленное генетическое нарушение The identified genetic abnormality			Зиготность Zygoty	Тип наследования Type of inheritance	Клинический и иммунологический фенотип Clinical and immunological phenotype
	Референсная последовательность Reference sequence	На уровне кодирующей последовательности At the coding sequence level	На уровне аминокислотной последовательности At the amino acid sequence level			
CYBB	NM_000397.4	c.1016C>A	p.P339H	Hem	XLR	X-сцепленная ХГБ X-linked CGD

Примечание. ХГБ – хроническая гранулематозная болезнь.  
Notes. CGD – chronic granulomatous disease.

стрирует неоспоримое клиническое преимущество, позволяя начать соответствующее и часто спасающее жизнь лечение. Тем не менее он также подчеркивает некоторые ограничения и недостатки генных панелей в быстро развивающейся области геномики ПИД.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам проведенных исследований с использованием таргетной панели, включающей 290 генов, ассоциированных с ПИД, генетиче-

Таблица 6

Результаты таргетного секвенирования в группе ПИД с дефектами врожденного иммунитета

Table 6

The results of targeted sequencing in the PID group with defects in innate immunity

Ген Gene	Выявленное генетическое нарушение The identified genetic abnormality			Зиготность Zygosity	Тип наследования Type of inheritance	Клинический и иммунологический фенотип Clinical and immunological phenotype
	Референсная последовательность Reference sequence	На уровне кодирующей последовательности At the coding sequence level	На уровне аминокислотной последовательности At the amino acid sequence level			
STAT1	NM_001384889.1	c. 520T>C	p.C174R	Het	AD/AR	Иммунодефицит с восприимчивостью к микобактериям, тяжелой вирусной инфекции, кожно-слизистому кандидозу Immunodeficiency with susceptibility to mycobacteria, severe viral infections and mucocutaneous candidiasis
STAT1	NM_001384889.1	c.820C>T	p.R274W	Het	AD/AR	Иммунодефицит с восприимчивостью к микобактериям, тяжелой вирусной инфекции, кожно-слизистому кандидозу Immunodeficiency with susceptibility to mycobacteria, severe viral infections and mucocutaneous candidiasis
CXCR4	NM_003467.3	c.1000C>T	p.R334Ter	Het	AD	WHIM-синдром/изолированный миелокатексис WHIM syndrome/isolated myelokathexis

Таблица 7

Результаты таргетного секвенирования в группе ПИД с аутовоспалительными синдромами

Table 7

The results of targeted sequencing in the PID group with autoinflammatory syndromes

Ген Gene	Выявленное генетическое нарушение The identified genetic abnormality			Зиготность Zygosity	Тип наследования Type of inheritance	Клинический и иммунологический фенотип Clinical and immunological phenotype
	Референсная последовательность Reference sequence	На уровне кодирующей последовательности At the coding sequence level	На уровне аминокислотной последовательности At the amino acid sequence level			
ADA2	NM_001282226.2	c. 506G>A	p.R169Q	Het	AR	Васкулит, аутовоспаление, синдром иммунодефицита и гематологических дефектов/синдром Снеддона Vasculitis, autoinflammation, immunodeficiency, and hematologic defects syndrome/Sneddon syndrome
		c. 976G>A	p.G326R	Het		
NLRP12	NM_001277126.2	c.2578 C->T	p. R860W	Het	AD	Семейный холододвой аутовоспалительный синдром Familial cold autoinflammatory syndrome
MVK	NM_001114185.3	c.1129G>A	p.V37I	Het	AR	Синдром гипер-IgD, мевалоновая ацидурия, порокератоз Hyper-IgD syndrome, mevalonic aciduria, porokeratosis
		c.803T>C	p.I268 T	Het		
MVK	NM_001114185.3	c.803T>C	p.I268 T	Het	AR	Синдром гипер-IgD, мевалоновая ацидурия, порокератоз Hyper-IgD syndrome, mevalonic aciduria, porokeratosis

ская причина заболевания была установлена у 37/96 пациентов.

Таким образом, использование технологии NGS может улучшить выявляемость генетической причины ПИД для своевременного установления диагноза.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке государственной программы «Научно-технологические и технические» на 2021–2025 гг. (подпрограмма 1 «Инновационные биотехнологии», задача 5).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

#### ORCID

**Polyakova E.A.** ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0706-6622>

**Guryanova I.E.** ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9696-3949>

**Liubuschkin A.V.** ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6127-74104>

## Литература

- Белевцев М.В., Жаранкова Ю.С., Алешкевич С.Н., Углова Т.А., Саливончик А.П., Гурьянова И.Е. и др. Первичные иммунодефициты в Республике Беларусь: клинико-эпидемиологический анализ. *Здравоохранение* 2020; 2: 16–31.
- Tangye S.G., Al-Herz W., Bousfha A., Cunningham-Rundles C., Franco J.L., Holland S.M., et al. Human Inborn Errors of Immunity: 2022 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee. *J Clin Immunol* 2022; 42 (7): 1473–507. DOI: 10.1007/s10875-022-01289-3
- Germeshausen M., Zeidler C., Stuhmann M., Lanciotti M., Ballmaier M., Welte K. Digenic mutations in severe congenital neutropenia. *Haematologica* 2010; 95 (7): 1207–10. DOI: 10.3324/haematol.2009.017665
- Abolhassani H., Wang N., Aghamohammadi A., Rezaei N., Nee Lee Y., Frugoni F., et al. A hypomorphic *RAG1* mutation resulting in a phenotype resembling common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 134 (6): 1375–80. DOI: 10.1016/j.jaci.2014.04.042
- Abolhassani H., Cheraghi T., Rezaei N., Aghamohammadi A., Hammarström L. Common variable immunodeficiency or late-onset combined immunodeficiency: a new hypomorphic *JAK3* patient and review of the literature. *J Invest Allergol Clin Immunol* 2015; 25 (3): 218–20.
- Kebudi R., Kiykim A., Sahin M.R. Primary immunodeficiency and cancer in children: a review of the literature. *Curr Pediatr Rev* 2019; 15 (4): 245–50. DOI: 10.2174/1573396315666190917154058
- Oliveira J.B., Fleisher T.A. Laboratory evaluation of primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125 (2 Suppl 2): S297–305. DOI: 10.1016/j.jaci.2009.08.043
- Behjati S., Tarpey P.S. What is next generation sequencing. *Arch Dis Child Educ Pract Ed* 2013; 98 (6): 236–8. DOI: 10.1136/archdischild-2013-304340
- Chou J., Ohsumi T.K., Geha R.S. Use of whole exome and genome sequencing in the identification of genetic causes of primary immunodeficiency. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2012; 12 (6): 623–8. DOI: 10.1097/ACI.0b013e3283588ca6
- Bamshad M.J., Ng S.B., Bigham A.W., Tabor H.K., Emond M.J., Nickerson D.A., et al. Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nat Rev Genet* 2011; 12 (11): 745–55. DOI: 10.1038/nrg3031
- Seleman M., Hoyos-Bachilloglu R., Geha R.S., Chou J. Uses of next-generation sequencing technologies for the diagnosis of primary immunodeficiencies. *Front Immunol* 2017; 8: 847. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00847
- Belkadi A., Bolze A., Itan Y., Cobat A., Vincent Q.B., Antipenko A., et al. Whole-genome sequencing is more powerful than whole-exome sequencing for detecting exome variants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112 (17): 5473–8. DOI: 10.1073/pnas.1418631112
- Stray-Pedersen A., Sorte H.S., Samarakoon P., Gambin T., Chinn I.K., Akdemir Coban Z.H., et al. Primary immunodeficiency diseases: genomic approaches delineate heterogeneous Mendelian disorders. *J Allergy Clin Immunol* 2017; 139 (1): 232–45. DOI: 10.1016/j.jaci.2016.05.042
- [Electronic resource] URL: <https://www.illumina.com/products/by-type/informatics-products/designstudio.html>. (accessed 28.06.2023).
- Maffucci P., Filion C.F., Boisson B., Itan Y., Shang L.J., Casanova J.L. Genetic diagnosis using whole exome sequencing in common variable immunodeficiency. *Front Immunol* 2016; 7: 220. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00220
- Illumina DNA Prep with Enrichment Reference Guide (Illumina)
- MiSeq System Denature and Dilute Libraries Guide (Illumina)
- Рыжкова О.П., Кардымон О.Л., Прохорчук Е.Б., Коновалов Ф.А., Масленников А.Б., Степанов В.А. и др. Руководство по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS). *Медицинская генетика* 2019; 18 (2): 3–23.
- Gallo V., Dotta L., Giardino G., Cirillo E., Lougaris V., D'Assante R., et al. Diagnostics of primary immunodeficiencies through next-generation sequencing. *Front Immunol* 2016; 7: 466. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00466
- Cifaldi C., Brigida I., Barzaghi F., Zoccolillo M., Ferradini V., Petricone D., et al. Corrigendum: Targeted NGS Platforms for Genetic Screening and Gene Discovery in Primary Immunodeficiencies. *Front Immunol* 2019; 10: 1184. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01184
- Rae W., Ward D., Mattocks C., Pengelly R.J., Eren E., Patel S.V., et al. Clinical efficacy of a next-generation sequencing gene panel for primary immunodeficiency diagnostics. *Clin Genet* 2018; 93: 647–55. DOI: 10.1111/cge.13163
- Bisgin A., Boga I., Yilmaz M., Bingol G., Altintas D. The utility of next-generation sequencing for primary immunodeficiency disorders: experience from a clinical diagnostic laboratory. *Biomed Res Int* 2018; 2018: 9647253. DOI: 10.1155/2018/9647253