

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616.24-004-07:577.2.08

Симакова Т.С.¹, Брагин А.Г.¹, Глушкова М.А.¹, Петрова Н.В.², Поляков А.В.², Кондратьева Е.И.², Шерман В.Д.², Павлов А.Е.¹

ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ ТАРГЕТНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ МУКОВИСЦИДОЗА

¹ООО «ПАРСЕК ЛАБ», 199034, Санкт-Петербург, Россия;

²ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», 115478, Москва, Россия

Муковисцидоз (МВ) – одно из частых моногенных заболеваний. В России проведение ДНК-диагностики при МВ необязательно, однако ее применение позволяет сократить время постановки диагноза, повысить эффективность терапевтического лечения и не допустить повторного появления заболевания в семье. ДНК-диагностика с использованием панелей на частые мутации в гене CFTR рекомендована в случаях неопределенной клинической картины и при пограничных значениях специфических лабораторных показателей. С помощью таких панелей в России удается выявить до 90% патологических аллелей в гене CFTR. Для выявления более редких аллелей традиционно проводят секвенирование по Сенгеру. В последнее время для выявления редких мутаций стали доступны методы высокопроизводительного секвенирования (MPS). В данной работе проведена оценка эффективности применения тест-системы на основе технологии таргетного секвенирования для выявления мутаций, не идентифицированных при первичной ДНК-диагностике. Кроме того, у двух пациентов с МВ методом MPS идентифицированы ранее не известные нонсенс-мутации Q1038X (с.3112C>T) и W1310X (с.3930G>A).

Ключевые слова: муковисцидоз; CFTR; таргетное секвенирование; MPS; VariFind™.

Для цитирования: Симакова Т.С., Брагин А.Г., Глушкова М.А., Петрова Н.В., Поляков А.В., Кондратьева Е.И., Шерман В.Д., Павлов А.Е. Опыт применения таргетного секвенирования для молекулярной диагностики муковисцидоза. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62 (5): 305-309. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-5-305-309>

Simakova T.S.¹, Bragin A.G.¹, Glushkova M.A.¹, Petrova N.V.², Polyakov A.V.², Kondratieva E.I.², Sherman V.D.², Pavlov A.E.¹

THE EXPERIENCE OF APPLICATION OF TARGET SEQUENCING IN MOLECULAR DIAGNOSTIC OF MUCOVISCIDOSIS

¹"Parseq Lab", 199034 St. Petersburg, Russia

²The medical genetic research center, 115478 Moscow, Russia

The mucoviscidosis is one of frequent monogenic diseases. In Russia, in case of mucoviscidosis carrying out of DNA-diagnostic is optional. However, its application permits shortening time of diagnosing, increasing efficiency of of therapeutic treatment and preventing secondary manifestation of disease in family. The DNA-diagnostic using panels on frequent mutations in gene CFTR is recommended in cases of uncertain clinical picture and under borderline values of specific laboratory indices. In Russia, application of such panels permit detecting up to 90% of pathological alleles in gene CFTR. To detect more rare alleles the Sanger sequencing is traditionally applied. Lately, highly productive sequencing techniques became available to detect rare mutations. The actual article presents evaluation of efficiency of application of test-system based on technology of target sequencing for detecting mutations unidentified at primary DNA-diagnostic. Besides, in two patients with mucoviscidosis the application of highly productive sequencing techniques permitted to identify previously unknown nonsense mutations Q1038X (c.3112C>T) u W1310X (c.3930G>A).

Key words: mucoviscidosis; CFTR; target sequencing; highly productive sequencing techniques; VariFind™.

For citation: Simakova T.S., Bragin A.G., Glushkova M.A., Petrova N.V., Polyakov A.V., Kondratieva E.I., Sherman V.D., Pavlov A.E. The experience of application of target sequencing in molecular diagnostic of mucoviscidosis. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2017; 62 (5): 305-309. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-5-305-309>

For correspondence: Pavlov A.E., the general director. e-mail: apavlov@parseq.pro.

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 30.11.2016
Accepted 15.01.2017

Для корреспонденции: Павлов Александр Евгеньевич, генеральный директор ООО «ПАРСЕК ЛАБ», 199034, Санкт-Петербург, e-mail: apavlov@parseq.pro.

Введение. Муковисцидоз (МВ) – наследственное заболевание с аутосомно-рецессивным типом наследования, проявляющееся при наличии двух патогенных аллелей. С 2007 г. в России проводят массовый скрининг новорожденных на МВ, включающий биохимические исследования и функциональное тестирование. В России проведение молекулярной диагностики не обязательно при постановке диагноза МВ, однако она рекомендована, особенно в случаях, когда на основании клинической картины невозможно подтвердить или исключить диагноз [1]. При наличии МВ в семейном анамнезе проведение ДНК-диагностики позволяет снизить риск рождения больного ребенка в семье.

ДНК-диагностика МВ осложняется высокой аллельной гетерогенностью. На сегодняшний день для гена *CFTR*, ответственного за развитие МВ, известно более 2000 мутаций. В консенсусе по МВ за 2008 г. описано 170 патогенных мутаций в гене *CFTR* [2]. Однако данные о количестве клинически значимых вариантов в разных источниках варьируют в широких пределах, поскольку с появлением новых научных данных и уточнением имеющихся информация о клинической значимости мутаций постоянно обновляется.

Наибольшее распространение в клинической практике получили классические молекулярно-генетические методы, основанные на ПЦР, MLPA и гибридизации [3]. К преимуществам данных методов относят невысокую стоимость и простоту выполнения. Однако классические методы позволяют выявлять лишь ограниченный спектр известных мутаций, который специфичен для конкретной популяции. Как правило, специфические панели на частые мутации используют на первом этапе молекулярной диагностики, после чего в случае получения отрицательного результата проводят расширенный ДНК-анализ секвенированием по Сенгеру, включающий генотипирование в экзонах и сайтах сплайсинга. Секвенирование по Сенгеру – «золотой стандарт» клинической молекулярной диагностики в силу высокой чувствительности и специфичности метода, однако при большом потоке образцов секвенирование по Сенгеру становится технологически трудным и дорогостоящим [4].

С развитием технологий высокопроизводительного секвенирования (MPS) появилась возможность эффективно исследовать обширные регионы генома и тем самым повысить доступность тестирования широкого спектра мутаций [5]. С 2014 г. на российском рынке доступна тест-система на основе полупроводникового таргетного секвенирования, представляющая собой комплексное клинически валидированное решение для детекции мутаций в генах *CFTR*, *PAH* и *GALT* [6]. Аналитические характеристики тест-системы были установлены в рамках верификации результатов путем секвенирования по Сенгеру [6]. Опыт применения подобной тест-системы в реальной клинической практике на образцах ДНК российских пациентов с МВ, у которых рутинными методами не удалось выявить оба патогенных аллеля, стал первым шагом на пути внедрения MPS-технологий в практику лабораторной диагностики.

Материал и методы. Тестирование образцов ДНК неродственных пациентов с диагнозом МВ проводили с помощью тест-системы VariFind™ Neoscreen assay (Parseq Lab). Тест-система основана на платформе Ion PGM™ (Life Technologies) и валидирована для клинического применения. Тест-система позволяет идентифицировать 580 известных точковых мутаций в генах *CFTR*, *PAH* и *GALT*, детектировать распространенную крупную делецию, *CFTR*dele2,3, в гене *CFTR*, а также выявлять ранее не известные и *de novo* мутации в пределах таргетных регионов [7].

Последовательности праймеров для секвенирования по Сенгеру

№	Вариант	Экзон	Праймеры	Длина продукта	Температура отжига
1	Q1038X	19 (17a)	F 5' GACACACTTTGTCCACTTTGC R 5' GTCCTGTACACCAACTGTGG	482 п.н.	58°C
2	W1310X	24 (21)	F 5' CTTGATGGTAAGTACATGGGTGT R 5' GGGGTAGGTCCAGTCAAAAAGT	395 п.н.	58°C

Подтверждение новых вариантов методом двустороннего секвенирования по Сенгеру проводили в ФГБНУ «МГНЦ» на секвенаторе ABI-3130XL (Applied Biosystems) согласно протоколу производителя. Последовательности праймеров приведены в табл. 1.

Образцы ДНК неродственных пациентов с диагнозом МВ получены из трех лабораторий: лаборатории генетической эпидемиологии ФГБНУ «МГНЦ» – 11 образцов; лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ «МГНЦ» – 25 образцов; НИИ медицинской генетики – 13 образцов; всего 49 образцов. Диагноз МВ поставлен в соответствии с российскими критериями диагностики МВ [8]. Предварительно пациентам проведена молекулярно-генетическая диагностика с использованием одной или нескольких специфических панелей на частые мутации в гене *CFTR*.

От всех обследованных пациентов получено письменное информированное согласие на участие в исследовании. Проведение исследования одобрено этическим комитетом ФГБНУ «МГНЦ» (протокол № 2 от 10.03.2016).

Результаты. Для анализа с помощью тест-системы на основе MPS было отобрано 49 образцов ДНК от пациентов с диагнозом МВ, у которых не были выявлены оба мутантных аллеля по результатам поиска частых мутаций с использованием специфических панелей.

У 44 пациентов рутинными методами идентифицирован один патогенный аллель, у 5 пациентов патогенные аллели не выявлены. В ходе проведения расширенного ДНК-анализа у 44 пациентов с одной идентифицированной мутацией подтверждена ранее выявленная мутация, при этом у 34 пациентов из 44 идентифицирован второй патогенный аллель (табл. 2).

Среди пяти пациентов с двумя невыявленными мутациями у трех пациентов методом MPS были установлены оба патогенных аллеля, у двух пациентов идентифицирован один патогенный аллель (табл. 3).

Методом MPS-секвенирования у двух пациентов с МВ идентифицированы ранее не описанные мутации в гене *CFTR*: Q1038X и W1310X (рис. 1, 2). Варианты подтверждены секвенированием по Сенгеру образцов ДНК пробандов и их родителей. Вариант Q1038X (с.3112C>T) приводит к образованию стоп-кодона в экзоне 19 гена *CFTR*. Вариант W1310X (с.3930G>A) приводит к образованию стоп-кодона в экзоне 21 гена *CFTR*. В базе данных CFTR1 описан патогенный вариант W1310X (с.3929G>A), приводящий к молекулярным последствиям, аналогичным таковым для обнаруженного варианта W1310X (с.3930G>A). Обнаруженные варианты, для которого *in silico* показано формирование укороченного транскрипта, в транспозиции относительно известной патогенной мутации у пациента с установленным диагнозом может свидетельствовать о клинической значимости этого варианта. Согласно критериям классификации вариантов, утвержденным Американским колледжем медицинской генетики, такие варианты с высокой вероятностью являются патогенными [9].

У 49 пациентов идентифицировано 323 генетических ва-

Таблица 2

Мутации, выявленные методом MPS у пациентов с одной известной мутацией

№	Образец	Известная мутация	Новая мутация	Диагноз
1	112MB	F508del	CFTRdele2,3	Муковисцидоз
2	120MB	F508del	CFTRdele2,3	Муковисцидоз
3	121MB	F508del	E92K	Муковисцидоз
4	122MB	F508del	S466X (C>G)	Муковисцидоз
5	1247-3	F508del	NA	Муковисцидоз
6	1273-3	F508del	Q1038X	Муковисцидоз
7	127MB	F508del	1898+1G>C	Муковисцидоз
8	133MB	F508del	E92K	Муковисцидоз
9	136MB	F508del	2789+5G>A	Муковисцидоз
10	141MB	F508del	NA	Муковисцидоз
11	1560-1	1677delTA	A96E	Муковисцидоз
12	1590-1	F508del	R553X	Муковисцидоз
13	159MB	F508del	NA	Муковисцидоз
14	1700-1	G542X	R1158X	Муковисцидоз
15	1723-1	L138ins	G178X	Муковисцидоз
16	1868-1	F508del	NA	Муковисцидоз
17	1906-3	F508del	406-6T>C	Муковисцидоз
18	1916-3	F508del	NA	Муковисцидоз
19	1926-3	F508del	NA	Муковисцидоз
20	1928-3	F508del	NA	Муковисцидоз
21	1947-3	F508del	4015delA	Муковисцидоз
22	1984-3	F508del	NA	Муковисцидоз
23	1993-1	1677delTA	R117C	Муковисцидоз
24	1996-1	G542X	4428insGA	Муковисцидоз
25	1996-3	W1282X	R1066C	Муковисцидоз
26	2010-1	E92K	[E217G (;) H1085R]	Муковисцидоз
27	2055-1	F508del	4382delA	Муковисцидоз
28	2126-3	L138ins	NA	Муковисцидоз
29	2140-1	F508del	L1077P	Муковисцидоз
30	2203-1	F508del	E92K	Муковисцидоз
31	2299-1	1248+1G>A	2118del4	Муковисцидоз
32	2305-1	F508del	3667ins4	Муковисцидоз
33	2381-1	F508del	NA	Муковисцидоз
34	2413-1	F508del	S945L	Муковисцидоз
35	2481-1	F508del	W1282R	Муковисцидоз
36	2483-1	F508del	Y84X	Муковисцидоз
37	2484-1	F508del	S945L	Муковисцидоз
38	2524-1	F508del	1898+1G>C	Муковисцидоз
39	576-1	3849+10kbC>T	G480S	Муковисцидоз
40	683-3	G542X	W1310X (TGG>TGA)	Муковисцидоз
41	800-1	F508del	3272-11A>G	Муковисцидоз
42	868-1	1677delTA	3199del6	Муковисцидоз
43	871-1	F508del	L1335P	Муковисцидоз
44	957-1	1677delTA	S1159F	Муковисцидоз

рианта в гене *CFTR*, в том числе 86 клинически значимых вариантов. Выявлена 41 уникальная мутация, 10 мутаций встречали в исследуемой выборке два и более раз. Идентифицировано 11 мутаций, впервые выявленных у российских пациентов, это варианты: 4374+1G>A, [E217G;H1085R], 3199del6, 3667ins4, 406-6T>C, A96E, G178X, L1077P, Q1038X, W1310X (TGG>TGA) и W57R [10, 11].

Заключение. По результатам расширенной ДНК-диагностики, у 75,5% (37 из 49) пациентов поставлен генетический диагноз MB, т.е. выявлены оба патогенных аллеля. В исследуемой группе идентифицировано 86 патогенных аллелей, из которых только 44 были установлены ранее другими методами. Таким образом, на данной выборке диагностическая чувствительность MPS тест-системы составила 88% против 45% для узких диагностических панелей. Полученные результаты коррелируют с данными литературы, согласно которым расширенный анализ гена *CFTR* путем секвенирования по Сенгеру позволяет достичь 95% чувствительности [11]. Различия обусловлены разнородностью исследуемых выборок. Причины не обнаружения второй мутации у оставшихся 24,5% можно разделить на две группы.

К основным причинам относят естественные ограничения метода. В некоторых случаях фенотип может быть обусловлен мутациями, находящимися за пределами исследуемых регионов генома, например в интронах или регуляторных областях. Эту проблему решают путем модификации панели с учетом новых данных. Кроме того, некоторые типы мутаций, например структурные вариации, могут быть обнаружены только при использовании специальных методов, таких как MLPA и агау CGH. По данным литературы, на долю вариаций копийности в гене *CFTR* приходится до 4% всех патогенных мутаций [5]. Идентифицировать такие варианты при рутинном секвенировании по Сенгеру крайне трудно, однако для MPS-методов существуют решения, позволяющие детектировать вариации копийности, в том числе ранее не известные [12].

Другие причины невыявления мутаций носят биологический характер. Тяжесть заболевания варьирует от мягких форм, не приводящих к инвалидизации, до летальных исходов в младенческом возрасте. Такое разнообразие клинической картины обусловлено наличием генов-модификаторов, мутации в которых влияют на фенотип [13]. Известны уникальные случаи, когда при наличии генетического диагноза заболевание отсутствует [14]. В редких случаях клиническая картина, сходная с MB, может быть обусловлена другими наследственными заболеваниями, не связанными с геном *CFTR* [15].

В исследованной группе пациентов первичная ДНК-диагностика с использованием специфических панелей на частые мутации не привела к постановке генетического диагноза, тогда как расширенный ДНК-анализ позволил установить генетический диагноз и подтвердить клинический

Таблица 3

Мутации, впервые выявленные у пациентов методом MPS

№	Образец	Новая мутация	Новая мутация	Диагноз
1	118MB	2043delG	1716+1G>A	Муковисцидоз
2	119MB	R334W	NA	Муковисцидоз
3	125MB	W75R	NA	Муковисцидоз
4	160MB	F508del	W1282X	Муковисцидоз
5	2342-1	4374+1G>A	4374+1G>A	Муковисцидоз

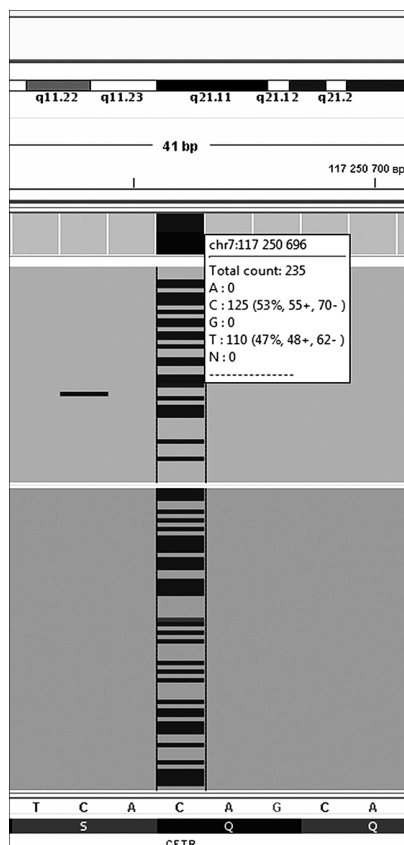


Рис. 1. Мутация Q1038X в гене *CFTR*, идентифицированная методом MPS. Визуализация в геномном браузере IGV.

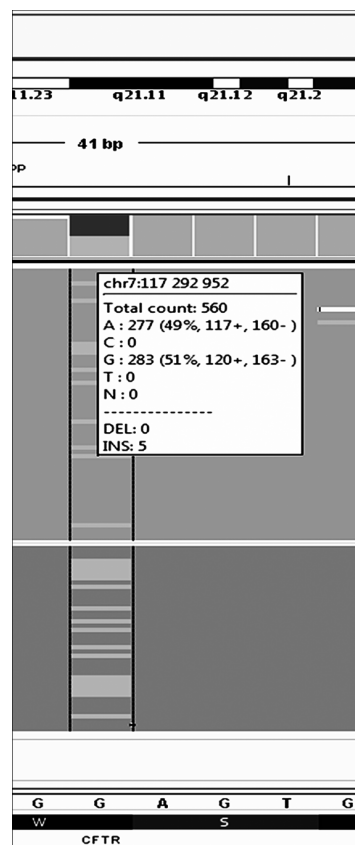


Рис. 2. Мутация W1310X в гене *CFTR*, идентифицированная методом MPS. Визуализация в геномном браузере IGV.

Analyzes 118 MB.vcf

Show

SeqDB Variants SeqDB References
 Custom Variants Custom References
 dbSNP Variants
 Unannotated Variants

Variant display preferences

All Likely Pathogenic Pathogenic

Show variants for

CFTR
 PAH
 GALT

variants

#	Gene	Name	Effect	Type	Genotype	Variant Quality
1	CFTR	1716+1G>A	Pathogenic	SeqDB Variants	Heterozygous with reference	✓
2	CFTR	2043delG	Pathogenic	SeqDB Variants	Heterozygous with reference	✓
3	CFTR	rs213950	Non pathogenic	dbSNP Variants	Homozygous (variant)	✓
4	CFTR	rs213965	Unknown	dbSNP Variants	Homozygous (variant)	✗
5	CFTR	rs11978434	Unknown	dbSNP Variants	Homozygous (variant)	✗
6	CFTR	rs1042077	Unknown	dbSNP Variants	Homozygous (variant)	✓
7	CFTR	rs213989	Unknown	dbSNP Variants	Homozygous (variant)	✓
8	CFTR	rs1800136	Unknown	dbSNP Variants	Homozygous (variant)	✓
9	CFTR	chr 7:117175505-117175505(A>G)	Unknown	Unannotated Variants	Heterozygous with reference	✓
10	CFTR	chr 7:117246636-117246636(G>A)	Unknown	Unannotated Variants	Homozygous (variant)	✓
11	PAH	rs772897	Untested	dbSNP Variants	Homozygous (variant)	✓
12	PAH	rs12580432	Untested	dbSNP Variants	Homozygous (variant)	✓
13	PAH	rs1042503	Untested	dbSNP Variants	Homozygous (variant)	✓
14	PAH	rs2037639	Untested	dbSNP Variants	Homozygous (variant)	✓

Regions

Target Regions Coverage: 100.0%

#	Chromosome	Position	Region Quality
1	chr 7	117175523 - 117175523	✗
2	chr 7	117292930 - 117292932	✗

Displaying 14 variant(s)...

Рис. 3. Аннотация генетических вариантов в программе VariFind™, образец 118МВ. Патогенные варианты выделены насыщенным цветом; варианты, проаннотированные в базе данных dbSNP, выделены серым цветом; неаннотированные варианты выделены белым цветом. На нижней панели указаны целевые регионы с низким покрытием.

диагноз в 75,5% случаев. Разнообразие идентифицированных минорных аллелей, включая обнаружение двух новых мутаций в столь малой выборке, подтверждает высокую аллельную гетерогенность МВ в российской популяции. Таким образом, проведение расширенного ДНК-анализа гена *CFTR* в качестве второго этапа после получения отрицательного результата при тестировании на частые мутации служит целесообразным инструментом молекулярной диагностики.

Полученные результаты показали эффективность применения тест-системы на основе таргетного секвенирования для подтверждающей молекулярно-генетической диагностики МВ в сложных случаях, когда рутинные методы оказались недостаточно информативны. Однако при использовании столь чувствительных методов возникает необходимость интерпретации новых находок и трансляции данных в клиническую форму. Программное обеспечение, поставляемое с тест-системой VariFind™ Neoscreen assay, осуществляет автоматическую аннотацию найденных вариантов, что позволяет минимизировать работу по поиску информации о редких вариантах во внешних источниках (рис. 3).

Опыт успешного применения тест-системы в качестве второго этапа ДНК-диагностики открывает перспективы внедрения MPS-технологий в рутинную практику молекулярно-диагностических лабораторий. Определение показаний к назначению анализа и выбор оптимальных диагностических протоколов должны стать предметом дальнейших исследований.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2–5, 8, 12–15
см. REFERENCES)

1. Шерман В.Д., Каширская Н.Ю., Капранов Н.И., Кусова З.А. К вопросу о неонатальном скрининге на муковисцидоз в РФ. В кн.: *Сборник тезисов: X Национальный конгресс “Муковисцидоз у детей и взрослых. 20 лет Российскому центру муковисцидоза”*. Ярославль; 2011: 26–31.
6. Симакова Т.С., Брагин А.Г., Зайцева М.А., Павлов А.Е. Роль высокопроизводительного секвенирования в неонатальном скрининге наследственных нарушений обмена веществ. *Медицинская генетика*. 2013; 12 (9): 11–3.
7. Петрова Н.В. *Молекулярно-генетические и клинико-генотипические особенности муковисцидоза в российских популяциях*: Автореф. дисс. ... докт. биол. наук. М.; 2009.
9. *Регистр больных муковисцидозом в Российской Федерации. 2013 год*. М.: ИД «Медпрактика-м»; 2015.
10. Руквичкин Д.В. *Клинико-генотипический полиморфизм муковисцидоза среди населения Краснодарского края*: Дисс. ... канд. мед. наук. Краснодар; 2007.
11. Петрова Н.В., Васильева Т.А., Тимковская Е.Е., Капранов Н.И., Зинченко Р.А. Анализ редких мутантных аллелей в гене *CFTR* у российских больных. В кн.: *Сборник тезисов: XI Национальный конгресс “Муковисцидоз у детей и взрослых. Взгляд в будущее”*. М.; 2013: 66–9.

REFERENCES

1. Sherman V.D., Kashirskaya N.Yu., Kapranov N.I., Kusova Z.A. On the issue of neonatal screening for cystic fibrosis in the Russian Federation. In: *Abstracts: X National Congress “Cystic Fibrosis in Children and Adults. Russian Center of Cystic Fibrosis 20th Anniversary.” [Sbornik tezisev: X Natsional’nyy kongress “Mukovistsidoz u detey i vzroslykh. 20 let Rossiyskomu tsentru mukovistsidoza”]*. Yaroslavl; 2011: 26–31. (in Russian)
2. Castellani C., Cuppens H., Macek M.Jr., Cassiman J.J., Kerem E., Durie P. et al. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J. Cyst. Fibros.* 2008; 7 (3): 179–96.
3. Eshaque B., Dixon B. Technology platforms for molecular diagnosis of cystic fibrosis. *Biotechnol. Adv.* 2006; 24 (1): 86–93.
4. Lefterova M.I., Shen P., Odegaard J.I., Fung E., Chiang T., Peng G. et al. Next-generation molecular testing of newborn dried blood spots for cystic fibrosis. *J. Mol. Diagn.* 2016; 18 (2): 267–82.
5. Kulkarni S., Pfeifer J. *Clinical Genomics: A Guide to Clinical Next Generation Sequencing*. London: Elsevier Inc., Academic Press; 2015.
6. Simakova T.S., Bragin A.G., Zaytseva M.A., Pavlov A.E. The role of high-throughput sequencing in the neonatal screening of inherited metabolic disorders. *Meditinskaya genetika*. 2013; 12 (9): 11–3. (in Russian)
7. Petrova N.V. *Molecular Genetics, Clinical and Genotypic Features of Cystic Fibrosis in the Russian Populations*: Diss. Moscow; 2009. (in Russian)
8. Richards S., Aziz N., Bale S., Bick D., Das S., Gastier-Foster J. et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet. Med.* 2015; 17 (5): 405–24.
9. *Register of Cystic Fibrosis Patients in the Russian Federation. Year 2013 [Registr bol’nykh mukovistsidozom v Rossiyskoy Federatsii. 2013 god]*. Moscow: ID “Medpraktika-m”; 2015. (in Russian)
10. Rukovichkin D.V. *The Clinical and Genotypic Polymorphisms Mukovistsidoza Population of Krasnodar Territory*: Diss. Krasnodar; 2007. (in Russian)
11. Petrova N.V., Vasil’eva T.A., Timkovskaya E.E., Kapranov N.I., Zinchenko R.A. Analysis of rare mutant alleles in the *CFTR* gene in Russian patients. In: *Abstracts: XI National Congress “Cystic Fibrosis in Children and Adults. A Glance at the Future” [Sbornik tezisev: XI Natsional’nyy kongress “Mukovistsidoz u detey i vzroslykh. Vzglyad v budushchee”]*. Moscow; 2013: 66–9. (in Russian)
12. Férec C., Casals T., Chuzhanova N., Macek M.Jr., 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 (5): 567–76.
13. Merlo C.A., Boyle M.P. Modifier genes in cystic fibrosis lung disease. *J. Lab. Clin. Med.* 2003; 141 (4): 237–41.
14. Chen R., Shi L., Hakenberg J., Naughton B., Sklar P., Zhang J. et al. Analysis of 589,306 genomes identifies individuals resilient to severe Mendelian childhood diseases. *Nat. Biotechnol.* 2016; 34 (5): 531–8.
15. Cohen-Cymberek M., Simanovsky N., Hiller N., Gileles-Hillel A., Shoseyov D., Kerem E. Differences in disease expression between primary ciliary dyskinesia and cystic fibrosis with and without pancreatic insufficiency. *Chest*. 2014; 145 (4): 738–44.

Поступила 30.11.16

Принята к печати 15.01.17