

## ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТАРГЕТНОГО МУЛЬТИГЕННОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ У ДЕТЕЙ С РЕКУРРЕНТНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ

© Евгений Николаевич Суспицын<sup>1</sup>, Григорий Аркадьевич Янус<sup>1</sup>, Мария Андреевна Махова<sup>1</sup>, Анна Анатольевна Хамидулина<sup>1</sup>, Марина Николаевна Гусева<sup>1</sup>, Елена Васильевна Преображенская<sup>1</sup>, Ирина Вадимовна Кондратенко<sup>2</sup>, Евгений Наумович Имянитов<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет. 194100, Санкт-Петербург, Литовская ул., 2

<sup>2</sup> РДКБ ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России. 119571, Москва, Ленинский пр-т, д.117

<sup>3</sup> НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова. 197758, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д.68

Контактная информация: Евгений Наумович Имянитов — член корреспондент РАН, профессор, д.м.н., заведующий кафедрой общей и молекулярной медицинской генетики. E-mail: evgeny@imyanitov.spb.ru

**Резюме.** Рекуррентные инфекции у детей представляют собой важную медико-социальную проблему, часто являясь причиной задержки развития и снижения качества жизни. Генетические особенности организма играют важную роль в развитии инфекционных заболеваний, обуславливая восприимчивость к разнообразным патогенам, а также оказывая влияние на характер течения болезни. Настоящая работа направлена на оценку эффективности использования таргетной мультигенной панели в выявлении причин предрасположенности к развитию рекуррентных инфекций у детей. *Материалы и методы.* Обследовано 382 пациента, средний возраст которых на момент исследования составил 7,5 лет (диапазон 2 месяца — 18 лет). В исследование были включены больные с клиническими признаками, указывающими на вероятное наличие генетического дефекта иммунной системы. *Результаты исследований.* Патогенные мутации выявлены в 18% (70/382) всех случаев, и у 44 из 207 (21%) пациентов, соответствующих критериям Jeffrey Modell Foundation. В подгруппе больных с «синдромальными» ПИД таргетное секвенирование позволило установить причину заболевания у 4 из 10 обследованных пациентов (40%). В трех случаях были выявлены дефекты гена *KMT2D*, что позволило установить диагноз синдрома Кабуки. В группе часто болеющих детей патогенные варианты были выявлены лишь в трех случаях (3/54, 6%). У больных с необычно тяжелым течением инфекционных эпизодов единственным явно патогенным генетическим повреждением оказалась мутация *TLR3* с.889C>G (p.L297V). *Обсуждение.* В настоящее время описано более 350 нозологических форм ПИД. Частота инфекционных эпизодов сама по себе не относится к убедительным признакам ПИД. Рекуррентные ОРВИ далеко не всегда сигнализируют о наличии генетического дефекта иммунитета, а чаще отражают процесс функционального созревания иммунной системы. Таким образом, таргетное мультигенное секвенирование позволяет выявить генетические дефекты у существенной части детей с рекуррентными инфекциями. В перспективе эффективность генетического анализа может быть повышена за счет популяризации знаний о возможных признаках первичного иммунодефицита, а также использования методов неонатального скрининга.

**Ключевые слова:** рекуррентные инфекции; дети; генетический анализ.

## ESTIMATION OF EFFICIENCY OF USING TARGET MULTIGENE SEQUENCING IN CHILDREN WITH RECURRENT INFECTIONS

© Evgeny N. Suspitsyn<sup>1</sup>, Grigory A. Janus<sup>1</sup>, Maria A. Makhova<sup>1</sup>, Anna A. Khamidulina<sup>1</sup>, Marina N. Guseva<sup>1</sup>, Elena V. Preobrazhenskaya<sup>1</sup>, Irina V. Kondratenko<sup>2</sup>, Evgeny N. Imyanitsyn<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Saint-Petersburg State Pediatric Medical University. 194100, Russia, Saint-Petersburg, Litovskaya str., 2

<sup>2</sup> RDКB FGBOU VO RNIMU im. N.I. Pirogova of the Ministry of Health of Russia. 119571, Moscow, Leninsky Prospect, 117

<sup>3</sup> NMITS oncology im. N.N. Petrova. 197758, St. Petersburg, pos. Pesochnyy, st. Leningradskaya, 68

Contact Information: Eugene N. Imyaninov — corresponding member of the Russian Academy of Sciences, professor, MD, head of the department of general and molecular medical genetics. E-mail: evgeny@imyaninov.spb.ru

**Резюме.** Children recurrent infections are an important medical and social problem, often causing developmental delays and reduced quality of life. Genetic features of the organism play an important role in the development of infectious diseases, causing susceptibility to various pathogens, as well as influencing the nature of the disease. This work is aimed at assessing the effectiveness of the use of targeted multigenic panel in identifying the causes of predisposition to the development of recurrent infections in children. *Materials and methods.* 382 patients were examined, the average age of which at the time of the study was 7.5 years (range 2 months-18 years). The study included patients with clinical signs indicating the likely presence of a genetic defect in the immune system. *Research result.* Pathogenic mutations were detected in 18% (70/382) of all cases, and in 44 of the 207 (21%) patients meeting the Jeffrey Modell Foundation criteria. In the subgroup of patients with «syndromic» PID, targeted sequencing allowed to determine the cause of the disease in 4 out of 10 patients (40%). In three cases, defects in the *KMT2D* gene were identified, which led to the diagnosis of Kabuki syndrome. In the group of frequently ill children, pathogenic variants were detected only in three cases (3/54. 6%). In patients with unusually severe infectious episodes, the only clearly pathogenic genetic damage was THE *tlr3* mutation c.889C>G (p. L297V). *Discussion.* Currently, more than 350 nosological forms of PID have been described. The frequency of infectious episodes is not in itself a convincing indication of PID. Recurrent SARS do not always signal the presence of a genetic defect of immunity, but more often reflect the process of functional maturation of the immune system. Thus, targeted multigenic sequencing allows to identify genetic defects in a significant part of children with recurrent infections. In the future, the effectiveness of genetic analysis can be increased by popularizing knowledge about the possible signs of primary immunodeficiency, as well as the use of neonatal screening methods.

**Ключевые слова:** recurrent infections; children; genetic analysis.

## ВВЕДЕНИЕ

Рекуррентные инфекции у детей представляют собой важную медико-социальную проблему, часто являясь причиной задержки развития и снижения качества жизни. Не вызывает сомнений существование широких индивидуальных различий в отношении восприимчивости и резистентности к инфекциям, а также особенностей клинической картины заболевания. Генетические особенности организма играют важную роль в развитии инфекционных заболеваний, обуславливая восприимчивость к разнообразным патогенам, а также оказывая влияние на характер течения болезни.

В ряде случаев причиной повышенной предрасположенности к инфекциям может быть наследственный дефект какого-либо звена иммунитета, т.е., первичный иммунодефицит (ПИД). Поскольку клинико-лабораторные признаки заболеваний этой группы часто неспецифичны, очень важную роль приобретает ДНК-диагностика. Установление правильного диагноза критически необходимо для подбора терапии, а также медико-генетического консультирования семей. Несмотря на то, что проблема первичных иммунодефицитов активно

обсуждается в российском медицинском сообществе [1–4], сведения о частоте и спектре генетических дефектов по-прежнему достаточно фрагментарны.

Важнейшим технологическим прорывом в молекулярной медицине стало появление так называемого секвенирования нового поколения (NGS, Next Generation Sequencing). Несмотря на свою недолгую историю, этот метод зарекомендовал себя в качестве мощного инструмента медицинской генетики, позволив обнаружить гены, причастные к развитию многих наследственных заболеваний [5, 6]. Особый практический интерес представляет вариант секвенирования, основанный на расшифровке кодирующих последовательностей ограниченного числа произвольно выбранных генов. Такой мультигенный анализ называют таргетным; он наиболее пригоден для диагностики заболеваний с высокой генетической гетерогенностью, к которым относятся и первичные иммунодефициты [7, 8].

Настоящая работа направлена на оценку эффективности использования таргетной мультигенной панели в выявлении причин предрасположенности к развитию рекуррентных инфекций у детей.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Набор детей с рекуррентными инфекциями производился в нескольких лечебных учреждениях Санкт-Петербурга (отделения гастроэнтерологии, эндокринологии и ревматологии СПбГПМУ, Консультационно-диагностический центр СПбГПМУ, отделение респираторных (капельных) инфекций и отделение нейроинфекций и органической патологии нервной системы НИИ детских инфекций, Детская городская больница № 1) и Москвы (Российская детская клиническая больница). Во всех случаях от родителей было получено информированное согласие на участие детей в исследовании. К участию в исследовании были привлечены 382 пациента, соответствующие критериям отбора. Средний возраст пациентов на момент исследования составил 7,5 лет (диапазон 2 месяца — 18 лет).

В исследование были включены больные с клиническими признаками, указывающими на вероятное наличие генетического дефекта иммунной системы. В частности, 207 пациентов соответствовали критериям возможного иммунодефицита, предложенным организацией Jeffrey Modell Foundation (JMF) (рис. 1); у 10 пациентов из этой группы также присутствовали множественные микроаномалии развития в отсутствие выявленной хромосомной патологии («синдромальные» ПИД).

В качестве дополнительных критериев отбора нами использованы следующие характеристики:

- наличие эпизодов периодических лихорадок в отсутствие выявленных инфекционных причин; n=63;
- сочетание инфекционных проявлений с лабораторным феноменом аутоиммунной цитопении; n=31;
- наличие лабораторного феномена аномально повышенного IgE (>3000 U/mL); n=6;
- необычно тяжелое течение инфекционного заболевания (например, тяжелый менингит, деструктивная пневмония и т.д.); n= 1;
- многочисленные эпизоды острых респираторных инфекций (8 и более в течение года); n=54.

## ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОЕ ТАРГЕТНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ

В состав таргетной панели вошли 344 гена, ассоциированных с развитием первичных иммунодефицитов в соответствии с современной классификацией ПИД, предложенной в

Четыре и более случая отитов в течение года
Два и более серьезных синусита в течение года
Два и более месяца лечения антибиотиками без значительного эффекта
Две и более пневмонии в год
Задержка прибавки массы и/или роста
Рецидивирующие глубокие абсцессы кожи и/или внутренних органов
Кандидоз ротовой полости или грибковые поражения кожи
Необходимость внутривенного введения антибиотиков для лечения инфекции
Два и более эпизода генерализованных инфекций, в т.ч. сепсис
Семейный анамнез, отягощенный в отношении ПИД

Рис. 1. Критерии подозрения на наличие первичного иммунодефицита у детей, предложенные Jeffrey Modell Foundation

2017 году Международным союзом иммунологических обществ (International Union of Immunological Societies, IUIS) [9].

В качестве источника ДНК использовались образцы венозной крови. Экстракция ДНК из периферических лейкоцитов проводилась при помощи модифицированного соль-хлороформного метода [10].

Подбор зондов для целевого обогащения осуществлялся с использованием программы NimbleDesign (<https://design.nimblegen.com/nimbleDesign/> (Roche)). Подготовка ДНК-библиотеки выполнялась с помощью набора Kara HyperPlus (Roche); селективное обогащение по кодирующим последовательностям генов ПИД проводилось с помощью набора SeqCapEZ System (Roche). Секвенирование парных концов в 150 п.н. было выполнено на платформе MiSeq (Illumina, США) со средней глубиной считывания 70–90-х и эффективностью прочтения целевых последовательностей 98.8%. Конвейер анализа включал выравнивание полученных фрагментов (alignment) на эталонный геном версии GRCh37 (hg19) с использованием программного обеспечения BWA 0.7.12, variant calling с помощью инструмента GATK 3.3.0, фильтрацию по качеству с помощью инструментов bcftools 1.2 и аннотацию вариантов с использованием SnpEff4.1.

Потенциально значимые варианты генов ПИД были визуально проверены в геномном браузере Golden Helix Genome Browser 3.0.0 (<http://goldenhelix.com>); образцы, демонстрирующие относительно низкую глубину прочтения (менее чем 20X) и/или существенное отклонение соотношения между прочтениями («ридами») дикого типа и мутантными, под-

вергались верификации с помощью секвенирования по Сэнгеру.

Выбор потенциально патогенных вариантов основывался на: а) данных о популяционных частотах редких аллелей (Minor Allele Frequency, MAF), полученных из общедоступных баз данных (dbSNP, ExAC, ESP, gnomAD); максимальное пороговое значение MAF было установлено равным 0.03 (3%); б) сведениях о типе мутации (транскирующие, т.е., приводящие к нарушения синтеза белка vs. нетранскирующие); в) данных, полученных *in silico* с помощью предиктивных программ (Polyphen-2, SIFT, MutationTaster, LRT Pred, CADD); г) сведениях о клинической значимости (данные ClinVar, HGMD и PubMed). Редкие варианты, приводящие к сдвигу кадров или стоп-кодонам *de novo*, а также миссенс-мутации с рейтингом CADD  $\geq 20$ , считались потенциально патогенными.

### СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА ДАННЫХ

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программного обеспечения SPSS Version 17. Для сравнения малых групп использовался точный тест Фишера. Все различия считались достоверными при вероятности не менее 95% (уровень значимости  $p < 0,05$ ).

### РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ:

В целом, патогенные мутации удалось выявить в 18% (70/382) всех случаев, и у 44 из 207 (21%) пациентов, соответствующих критериям Jeffrey Modell Foundation. В подгруппе больных с «синдромальными» ПИД таргетное секвенирование позволило установить причину заболевания у 4 из 10 обследованных пациентов (40%). В трех случаях были выявлены дефекты гена KMT2D, что позволило установить диагноз синдрома Кабуки; у всех больных наблюдался характерный фенотип: длинные глазные щели, низкорослость, расщелина твердого и мягкого нёба, врожденные пороки сердца (дефекты межжелудочковой и межпредсердной перегородок), аномалии мочеполовой системы. Инфекционные проявления были представлены, в основном рецидивирующими обструктивными бронхитами.

Еще в одном случае была выявлена мутация NBN c.657\_661delACAAA в гомозиготном состоянии, что, в совокупности с фенотипическими особенностями (микроцефалия, покатый лоб, крупный нос) подтверждает диагноз синдрома Ниймеген.

К нозологическим формам, неоднократно выявленным в нашей выборке, относятся агаммаглобулинемия Брутона (n=5), тяжелая комбинированная иммунная недостаточность (n=5), синдром гипер IgD (n=2), NLRP12-ассоциированный аутовоспалительный синдром (n=2), семейная средиземноморская лихорадка (n=2), аутоиммунный лимфопролиферативный синдром (n=2), хроническая грануломатозная болезнь (n=2), аутоиммунный полигландулярный синдром I типа (n=5).

Кроме того, у четырех пациентов с рекуррентными инфекциями были обнаружены дефекты гена STAT1. Будучи ключевым компонентом интерферонового сигнального каскада, STAT1 обеспечивает защиту против микобактерий, грибов и вирусов, а также участвует в регуляции противоопухолевого иммунитета [11]. У двух больных была выявлена мутация с.796G>A (p.V266I), затрагивающая CC (Coiled-Coil)-домен; у двух пациентов с хроническим кожно-слизистым кандидозом обнаружены мутации с.604A>G (p.M202V) и с.69T>G (p.D23E). Первая мутация неоднократно описана в связи с моногенными формами кандидоза [12,13], в то время как информация о второй отсутствует. Мутация с.69T>G локализуется в N-терминальном домене STAT1; патогенная роль дефектов этого домена хорошо известна [12]. Это обстоятельство, а также соответствие генетических данных клиническим проявлениям, позволяет расценивать данный аллель как вероятно патогенный.

В группе пациентов с периодическими лихорадками (ПЛ) генетическое исследование способствовало установлению точного диагноза в 16 из 63 (25%) случаев; еще в 16% выявлены варианты, связь которых с развитием фенотипических проявлений заболевания нуждается в дальнейшем изучении. У 4 пациентов выявлены моноаллельные мутации MEFV p.M694V, p.R354W и p.R726A, ранее описанные как патогенные. При этом у одного пациента отсутствуют периодические лихорадки, но отмечаются позитивные JMФ-критерии (снижение прибавок массы и роста, хроническая диарея); в данном случае трактовка связи генотипа и фенотипа затруднительна. Еще у двух детей с периодическими лихорадками обнаружены сцепленные варианты p.R408Q и p.P369S, сведения о причастности которых к развитию заболевания противоречивы: по-видимому, они представляют собой мутации с неполной пенетрантностью [14, 15].

У больных с аутоиммунными цитопениями наблюдался более низкий процент выявления мутаций (14/31, 13%). Необходимо отметить, что в эту группу не входили пациенты, у кото-

рых аутоиммунные цитопении наблюдались в сочетании с положительными критериями JMF. Если основным критерием отбора было подозрение на аутоиммунный лимфопролиферативный синдром (лимфопролиферация, гепатоспленомегалия, аутоиммунные цитопении), то патогенные мутации были бы выявлены у 4 из 18 пациентов (22%).

Среди пациентов с изолированным феноменом повышенного уровня иммуноглобулина Е мутации не были выявлены ни в одном из шести случаев.

В группе часто болеющих детей патогенные варианты были выявлены лишь в трех случаях (3/54, 6%); при этом, все обнаруженные варианты относятся к слабопенетрантным: аллели TNFRSF13B с.310T>C (p.C104R) и с.542C>A (p.A181E) обычно расцениваются в качестве факторов риска развития общей вариабельной иммунной недостаточности (ОВИН) [17].

У больных с необычно тяжелым течением инфекционных эпизодов единственным явно патогенным генетическим повреждением оказалась мутация TLR3 с.889C>G (p.L297V), выявленная у ребенка с тяжелым менингоэнцефалитом, вызванным вирусом простого герпеса (ВПГ1). Рецептор TLR3 (Toll-like receptor 3) участвует в распознавании двунилевой РНК — побочного продукта репликации большинства вирусов, поэтому мутации в соответствующем гене обуславливают необычную уязвимость к ВПГ-инфекции [16].

## ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время описано более 350 нозологических форм ПИД. Известно, что не все врачи хорошо знакомы с клиническими проявлениями ПИД, поэтому создаются диагностические алгоритмы, ориентированные на специалистов первичного звена [18, 19]. Несмотря на то, что популярные критерии подозрения на ПИД (10 признаков JMF) регулярно подвергаются критике [20–22], наше исследование свидетельствует в пользу их пригодности для предварительного отбора пациентов с целью дальнейшего генетического исследования.

Несмотря на то, что аутовоспалительные заболевания (АВЗ) входят в современную классификацию ПИД, больные с АВЗ далеко не всегда соответствуют признакам JMF; по этой причине мы использовали наличие периодических лихорадок в качестве дополнительного критерия отбора. Как свидетельствует высокая частота выявления мутаций в этой группе больных, такой подход оказался вполне оправданным. При этом

наблюдаемая симптоматика нередко ошибочно ассоциируется с проявлениями инфекционных заболеваний, что и является причиной недостаточной эффективности диагностики АВЗ.

Частота синдромальных форм ПИД достаточно существенна, что свидетельствует о целесообразности консультирования некоторых пациентов клиническим генетиком. В первую очередь это касается случаев, когда частые или тяжелые инфекционные проявления сопровождаются необычными фенотипическими проявлениями. Показательным примером является выявление трех случаев синдрома грима Кабуки среди пациентов отделений иммунологического профиля; в двух из трех случаев диагноз не был заподозрен, несмотря на подробное описание наблюдаемых стигм дизэмбриогенеза и пороков развития. Известно, что для больных с синдромом Кабуки характерны нарушения терминальной дифференцировки В-лимфоцитов, что ведет к развитию гуморального иммунодефицита и, иногда, к аутоиммунным проявлениям [23]. Больные с «синдромальными» ПИД имеют высокие шансы на выявление причин заболевания, что, в свою очередь, открывает новые возможности в области медико-генетического консультирования семей.

Применение таргетного высокопроизводительного секвенирования позволило нам выявить вероятную причину заболевания у 18% всех детей с рекуррентными инфекциями и у 21% больных, соответствующих JMF-критериям подозрения на наличие ПИД. Такая эффективность обнаружения мутаций сравнима с данными предыдущих исследований, в которых применялся такой же методический подход [24–28]: процент установленных генетических диагнозов варьирует от 14 до 46%, в среднем составляя около 25% [7]. Выявление патогенных мутаций становится значительно более эффективным при наличии жесткого предварительного отбора: так, в работе Yu et al, 2016 [29], посвящённой исследованию пациентов со сниженными показателями TREC, удалось найти причину заболевания у 14 из 20 пациентов (70%). В то же время, исследование гетерогенных групп больных, как правило, даёт значительно более скромные результаты [27,30]. Следует заметить, что в наше исследование, как правило, вошли пациенты, не прошедшие исследований иммунологического статуса в объеме, необходимом в случае подозрения на первичный иммунодефицит. Большая часть больных направлена на генетическое исследование специалистами первичного звена (гастроэнтерологи, ревматологи, эндокринологи, пульмоно-

логи, инфекционисты); подобная специфика отбора пациентов объясняет относительно невысокий процент выявления «истинных» ПИД.

Изолированное повышение уровня IgE, как правило, не свидетельствует о наличии генетического дефекта иммунной системы; помимо первичных иммунодефицитов данный феномен может наблюдаться и при atopическом дерматите, синдроме Чарга-Стросса (эозинофильный васкулит) и т.д. [31].

Очевидным представляется тот факт, что частота инфекционных эпизодов сама по себе не относится к убедительным признакам ПИД, что соответствует и данным иммунологических исследований [32]. Рекуррентные ОРВИ далеко не всегда сигнализируют о наличии генетического дефекта иммунитета, а чаще отражают процесс функционального созревания иммунной системы.

Таким образом, таргетное мультигенное секвенирование позволяет выявить генетические дефекты у существенной части детей с рекуррентными инфекциями. В перспективе эффективность генетического анализа может быть повышена за счет популяризации знаний о возможных признаках первичного иммунодефицита, а также использования методов неонатального скрининга [33].

## ЛИТЕРАТУРА

1. Мухина А.А., Кузьменко Н.Б., Родина Ю.А., Кондратенко И.В., Бологов А.А., Латышева Т.В., et al. Характеристика пациентов с первичными иммунодефицитными состояниями в Российской Федерации: от рождения до старости. Журнал Педиатрия имени Г.Н. Сперанского. 2019.
2. Латышева Е.А. Первичные иммунодефициты: состояние проблемы на сегодняшний день. JMF-центры в России. Вопросы Современной Педиатрии. 2013; 12: 73–7.
3. Deripara E., Balashov D., Rodina Y., Laberko A., Myakova N., Davydova N.V., et al. Prospective study of a cohort of Russian Nijmegen breakage syndrome patients demonstrating predictive value of low kappa-deleting recombination excision circle (KREC) numbers and beneficial effect of hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). Front Immunol. 2017. DOI:10.3389/fimmu.2017.00807.
4. Balashov D., Shcherbina A., Maschan M., Trakhtman P., Skvortsova Y., Shelikhova L., et al. Single-Center Experience of Unrelated and Haploidentical Stem Cell Transplantation with TCR $\alpha\beta$  and CD19 Depletion in Children with Primary Immunodeficiency Syndromes. Biol Blood Marrow Transplant. 2015. DOI:10.1016/j.bbmt.2015.07.008.
5. Ku C.S., Cooper D.N., Polychronakos C., Naidoo N., Wu M., Soong R. Exome sequencing: Dual role as a discovery and diagnostic tool. Ann Neurol. 2012. DOI:10.1002/ana.22647.
6. Ng S.B., Buckingham K.J., Lee C., Bigham A.W., Tabor H.K., Dent K.M., et al. Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. Nat Genet. 2010. DOI:10.1038/ng.499.
7. Yska HAF, Elsink K., Kuijpers T.W., Frederix GWJ., van Gijn M.E., van Montfrans J.M. Diagnostic Yield of Next Generation Sequencing in Genetically Undiagnosed Patients with Primary Immunodeficiencies: a Systematic Review. J Clin Immunol. 2019. DOI:10.1007/s10875-019-00656-x.
8. 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. DOI:10.1111/cge.13163.
9. Picard C., Bobby Gaspar H., Al-Herz W., Bousfiha A., Casanova J.L., Chatila T., et al. International Union of Immunological Societies: 2017 Primary Immunodeficiency Diseases Committee Report on Inborn Errors of Immunity. J Clin Immunol. 2018. DOI:10.1007/s10875-017-0464-9.
10. Müllenbach R., Lagoda P.J., Welter C. An efficient salt-chloroform extraction of DNA from blood and tissues. Trends Genet. 1989.
11. Engelhardt K.R., Grimbacher B. Mendelian traits causing susceptibility to mucocutaneous fungal infections in human subjects. J Allergy Clin Immunol. 2012; 129: 294–305. DOI:10.1016/j.jaci.2011.12.966.
12. Toubiana J., Okada S., Hiller J., Oleastro M., Gomez M.L., Becerra JCA., et al. Heterozygous STAT1 gain-of-function mutations underlie an unexpectedly broad clinical phenotype. Blood. 2016. DOI:10.1182/blood-2015-11-679902.
13. Liu L., Okada S., Kong X-F., Kreins A.Y., Cypowyj S., Abhyankar A., et al. Gain-of-function human STAT1 mutations impair IL-17 immunity and underlie chronic mucocutaneous candidiasis. J Exp Med. 2011. DOI:10.1084/jem.20110958.
14. Ryan J.G., Masters S.L., Booty M.G., Habal N., Alexander J.D., Barham B.K., et al. Clinical features and functional significance of the P369S/R408Q variant in pyrin, the familial Mediterranean fever protein. Ann Rheum Dis. 2010. DOI:10.1136/ard.2009.113415.
15. Yamagami K., Nakamura T., Nakamura R., Hanioka Y., Seki K., Chiba H., et al. Familial Mediterranean fever with P369S/R408Q exon3 variant in pyrin presenting as symptoms of PFAPA. Mod Rheumatol. 2017. DOI:10.1080/14397595.2017.1267173.
16. Mørk N., Kofod-Olsen E., Sørensen K.B., Bach E., Ørntoft T.F., Østergaard L., et al. Mutations in the TLR3 signaling pathway and beyond in adult patients with herpes simplex encephalitis. Genes Immun. 2015. DOI:10.1038/gene.2015.46.
17. Salzer U., Chapel H.M., Webster ADB., Pan-Hammarström Q., Schmitt-Graeff A., Schlesier M., et al. Mutations in TNFRSF13B encoding TACI are associated with common variable immunodeficiency in humans. Nat Genet. 2005. DOI:10.1038/ng1600.

18. Costa-Carvalho B.T., Grumach A.S., Franco J.L., Espinosa-Rosales F.J., Leiva L.E., King A., et al. Attending to warning signs of primary immunodeficiency diseases across the range of clinical practice. *J Clin Immunol.* 2014. DOI:10.1007/s10875-013-9954-6.
19. De Vries E., Driessen G. Educational paper: Primary immunodeficiencies in children: A diagnostic challenge. *Eur J Pediatr.* 2011; 170: 169–77. DOI:10.1007/s00431-010-1358-5.
20. Aloï F.P., Mishra S.S., MacGinnitie A.J. Guidelines for “10 Warning Signs of Primary Immunodeficiency” Neither Sensitive Nor Specific. *J Allergy Clin Immunol.* 2007. DOI:10.1016/j.jaci.2006.11.070.
21. Arkwright P.D., Gennery A.R. Ten warning signs of primary immunodeficiency: A new paradigm is needed for the 21st century. *Ann N Y Acad Sci.* 2011. DOI:10.1111/j.1749-6632.2011.06206.x.
22. Lankisch P., Schiffner J., Ghosh S., Babor F., Borkhardt A., Laws H.J. The Duesseldorf Warning Signs for Primary Immunodeficiency: Is it Time to Change the Rules? *J Clin Immunol.* 2015. DOI:10.1007/s10875-015-0149-1.
23. Кондратенко И.В., Суспицын Е.Н., Вахлярская С.С., Бологов А.А., Имянитов Е.Н. Синдром Кабуки. 2017; 1: 75–83.
24. Stoddard J.L., Niemela J.E., Fleisher T.A., Rosenzweig S.D. Targeted NGS: A cost-effective approach to molecular diagnosis of PIDs. *Front Immunol.* 2014; 5: 1–7. DOI:10.3389/fimmu.2014.00531.
25. Al-Mousa H., Abouelhoda M., Monies D.M., Al-Tassan N., Al-Ghoniaim A., Al-Saud B., et al. Unbiased targeted next-generation sequencing molecular approach for primary immunodeficiency diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 2016. DOI:10.1016/j.jaci.2015.12.1310.
26. Nijman I.J., Van Montfrans J.M., Hoogstraat M., Boes M.L., Van De Corput L., Renner E.D., et al. Targeted next-generation sequencing: A novel diagnostic tool for primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol.* 2014. DOI:10.1016/j.jaci.2013.08.032.
27. 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: 1–10. DOI:10.3389/fimmu.2016.00466.
28. Moens L.N., Falk-Sörqvist E., Asplund A.C., Bernatowska E., Smith C.E., Nilsson M. Diagnostics of primary immunodeficiency diseases: A sequencing capture approach. *PLoS One.* 2014; 9: 1–15. DOI:10.1371/journal.pone.0114901.
29. Yu H., Zhang V.W., Stray-Pedersen A., Hanson I.C., Forbes L.R., de la Morena M.T., et al. Rapid molecular diagnostics of severe primary immunodeficiency determined by using targeted next-generation sequencing. *J Allergy Clin Immunol.* 2016. DOI:10.1016/j.jaci.2016.05.035.
30. Kojima D., Wang X., Muramatsu H., Okuno Y., Nishio N., Hama A., et al. Application of extensively targeted next-generation sequencing for the diagnosis of primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol.* 2016. DOI:10.1016/j.jaci.2016.01.012.
31. Yasharpour M. Is It Hyper IgE Syndrome Or Something Else? *MOJ Immunol.* 2014. DOI:10.15406/moji.2014.01.00010.
32. Зиновьева Н.В., Давыдова Н.В., Щербина А.Ю., Продеус А.П., Румянцев А.Г. Часто болеющие дети: чем они больны на самом деле? *Трудный Пациент.* 2007; 2: 9–11.
33. Тузанкина И.А., Дерябина С.С., Болков М.А., Тузанкина И.А., Дерябина С.С., Болков М.А., et al. Первичные иммунодефициты в раннем возрасте. 2018.

## REFERENCES

- Mukhina A.A., Kuz'menko N.B., Rodina Yu.A., Kondratenko I.V., Bologov A.A., Latysheva T.V., et al. Kharakteristika patsientov s pervichnymi immunodefitsitnymi sostoyaniyami v Rossiyskoy Federatsii: ot rozhdeniya do starosti. [Characterization of patients with primary immunodeficiency conditions in the Russian Federation: from birth to old age]. *Zhurnal Pediatriya Imeni GNSperanskogo.* 2019. (in Russian).
- Latysheva E.A. Pervichnye immunodefitsity: sostoyanie problemy na segodnyashniy den'. [Primary immunodeficiencies: the current state of the problem]. *JMF-tsentry v Rossii. Voprosy Sovremennoy Pediatrii.* 2013; 12: 73–7. (in Russian).
- Deripapa E., Balashov D., Rodina Y., Laberko A., Myakova N., Davydova N.V., et al. Prospective study of a cohort of Russian Nijmegen breakage syndrome patients demonstrating predictive value of low kappa-deleting recombination excision circle (KREC) numbers and beneficial effect of hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). *Front Immunol.* 2017. DOI:10.3389/fimmu.2017.00807.
- Balashov D., Shcherbina A., Maschan M., Trakhtman P., Skvortsova Y., Shelikhova L., et al. Single-Center Experience of Unrelated and Haploidentical Stem Cell Transplantation with TCR $\alpha\beta$  and CD19 Depletion in Children with Primary Immunodeficiency Syndromes. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015. DOI:10.1016/j.bbmt.2015.07.008.
- Ku C.S., Cooper D.N., Polychronakos C., Naidoo N., Wu M., Soong R. Exome sequencing: Dual role as a discovery and diagnostic tool. *Ann Neurol.* 2012. DOI:10.1002/ana.22647.
- Ng S.B., Buckingham K.J., Lee C., Bigham A.W., Tabor H.K., Dent K.M., et al. Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. *Nat Genet.* 2010. DOI:10.1038/ng.499.
- Yska HAF., Elsink K., Kuijpers T.W., Frederix GWJ., van Gijn M.E., van Montfrans J.M. Diagnostic Yield of Next Generation Sequencing in Genetically Undiagnosed Patients with Primary Immunodeficiencies: a Systematic Review. *J Clin Immunol.* 2019. DOI:10.1007/s10875-019-00656-x.
- 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. DOI:10.1111/cge.13163.
9. Picard C., Bobby Gaspar H., Al-Herz W., Bousfiha A., Casanova J.L., Chatila T., et al. International Union of Immunological Societies: 2017 Primary Immunodeficiency Diseases Committee Report on Inborn Errors of Immunity. *J Clin Immunol*. 2018. DOI:10.1007/s10875-017-0464-9.
  10. Müllenbach R., Lagoda P.J., Welter C. An efficient salt-chloroform extraction of DNA from blood and tissues. *Trends Genet*. 1989.
  11. Engelhardt K.R., Grimbacher B. Mendelian traits causing susceptibility to mucocutaneous fungal infections in human subjects. *J Allergy Clin Immunol*. 2012; 129: 294–305. DOI:10.1016/j.jaci.2011.12.966.
  12. Toubiana J., Okada S., Hiller J., Oleastro M., Gomez M.L., Becerra JCA., et al. Heterozygous STAT1 gain-of-function mutations underlie an unexpectedly broad clinical phenotype. *Blood*. 2016. DOI:10.1182/blood-2015-11-679902.
  13. Liu L., Okada S., Kong X-F., Kreins A.Y., Cypowij S., Abhyankar A., et al. Gain-of-function human STAT1 mutations impair IL-17 immunity and underlie chronic mucocutaneous candidiasis. *J Exp Med*. 2011. DOI:10.1084/jem.20110958.
  14. Ryan J.G., Masters S.L., Booty M.G., Habal N., Alexander J.D., Barham B.K., et al. Clinical features and functional significance of the P369S/R408Q variant in pyrin, the familial Mediterranean fever protein. *Ann Rheum Dis*. 2010. DOI:10.1136/ard.2009.113415.
  15. Yamagami K., Nakamura T., Nakamura R., Hanioka Y., Seki K., Chiba H., et al. Familial Mediterranean fever with P369S/R408Q exon3 variant in pyrin presenting as symptoms of PFAPA. *Mod Rheumatol*. 2017. DOI:10.1080/14397595.2017.1267173.
  16. Mørk N., Kofod-Olsen E., Sørensen K.B., Bach E., Ørntoft T.F., Østergaard L., et al. Mutations in the TLR3 signaling pathway and beyond in adult patients with herpes simplex encephalitis. *Genes Immun*. 2015. DOI:10.1038/gene.2015.46.
  17. Salzer U., Chapel H.M., Webster ADB., Pan-Hammarström Q., Schmitt-Graeff A., Schlesier M., et al. Mutations in TNFRSF13B encoding TACI are associated with common variable immunodeficiency in humans. *Nat Genet*. 2005. DOI:10.1038/ng1600.
  18. Costa-Carvalho B.T., Grumach A.S., Franco J.L., Espinosa-Rosales F.J., Leiva L.E., King A., et al. Attending to warning signs of primary immunodeficiency diseases across the range of clinical practice. *J Clin Immunol*. 2014. DOI:10.1007/s10875-013-9954-6.
  19. De Vries E., Driessen G. Educational paper: Primary immunodeficiencies in children: A diagnostic challenge. *Eur J Pediatr*. 2011; 170: 169–77. DOI:10.1007/s00431-010-1358-5.
  20. Aloï F.P., Mishra S.S., MacGinnitie A.J. Guidelines for “10 Warning Signs of Primary Immunodeficiency” Neither Sensitive Nor Specific. *J Allergy Clin Immunol*. 2007. DOI:10.1016/j.jaci.2006.11.070.
  21. Arkwright P.D., Gennery A.R. Ten warning signs of primary immunodeficiency: A new paradigm is needed for the 21st century. *Ann N Y Acad Sci*. 2011. DOI:10.1111/j.1749-6632.2011.06206.x.
  22. Lankisch P., Schiffner J., Ghosh S., Babor F., Borkhardt A., Laws H.J. The Duesseldorf Warning Signs for Primary Immunodeficiency: Is it Time to Change the Rules? *J Clin Immunol*. 2015. DOI:10.1007/s10875-015-0149-1.
  23. Kondratenko I.V., Suspitsyn E.N., Vakhlyarskaya S.S., Bologov A.A., Imyanitov E.N. Sindrom Kabuki. [Kabuki syndrome]. 2017; 1: 75–83. (in Russian).
  24. Stoddard J.L., Niemela J.E., Fleisher T.A., Rosenzweig S.D. Targeted NGS: A cost-effective approach to molecular diagnosis of PIDs. *Front Immunol*. 2014; 5: 1–7. DOI:10.3389/fimmu.2014.00531.
  25. Al-Mousa H., Abouelhoda M., Monies D.M., Al-Tassan N., Al-Ghoniaim A., Al-Saud B., et al. Unbiased targeted next-generation sequencing molecular approach for primary immunodeficiency diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2016. DOI:10.1016/j.jaci.2015.12.1310.
  26. Nijman I.J., Van Montfrans J.M., Hoogstraat M., Boes M.L., Van De Corput L., Renner E.D., et al. Targeted next-generation sequencing: A novel diagnostic tool for primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol*. 2014. DOI:10.1016/j.jaci.2013.08.032.
  27. 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; 7:1–10. DOI:10.3389/fimmu.2016.00466.
  28. Moens L.N., Falk-Sörqvist E., Asplund A.C., Bernatowska E., Smith CIE., Nilsson M. Diagnostics of primary immunodeficiency diseases: A sequencing capture approach. *PLoS One*. 2014; 9: 1–15. DOI:10.1371/journal.pone.0114901.
  29. Yu H., Zhang V.W., Stray-Pedersen A., Hanson I.C., Forbes L.R., de la Morena M.T., et al. Rapid molecular diagnostics of severe primary immunodeficiency determined by using targeted next-generation sequencing. *J Allergy Clin Immunol*. 2016. DOI:10.1016/j.jaci.2016.05.035.
  30. Kojima D., Wang X., Muramatsu H., Okuno Y., Nishio N., Hama A., et al. Application of extensively targeted next-generation sequencing for the diagnosis of primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol*. 2016. DOI:10.1016/j.jaci.2016.01.012.
  31. Yasharpour M. Is It Hyper IgE Syndrome Or Something Else? *MOJ Immunol*. 2014. DOI:10.15406/moji.2014.01.00010.
  32. Zinov’eva N.V., Davydova N.V., Shcherbina A. Yu., Prodeus A.P., Rummyantsev A.G. Chasto boleyushchie deti: chem oni bol’ny na samom dele? [Often sick children: what are they really sick with?]. *Trudnyy Patsient*. 2007; 2: 9–11. (in Russian).
  33. Tuzankina I.A., Deryabina S.S., Bolkov M.A., Tuzankina I.A., Deryabina S.S., Bolkov M.A., et al. Pervichnye immunodefitsity v rannem vozraste. [Primary immunodeficiencies at an early age]. 2018. (in Russian).