

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

_____ Е.Н.Кроткова

« ____ » _____ 2023г.

Регистрационный № _____

МЕТОД ДИАГНОСТИКИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ,
ОБУСЛОВЛЕННЫХ МУТАЦИЯМИ ГЕНОВ RAS-МАРК
СИГНАЛЬНОГО ПУТИ (РАСопатий)

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

государственное учреждение «Республиканский научно-практический
центр «Мать и дитя» Министерства здравоохранения Республики
Беларусь

АВТОРЫ:

Зобикова О.Л., к.м.н. Наумчик И.В., к.м.н Гусина А.А., Субоч К.В.

Минск 2023

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод диагностики наследственных заболеваний, проявляющихся множественными врожденными пороками развития (МВПР). Метод может быть использован в комплексе мероприятий по оказанию медицинской помощи пациентам с МВПР и позволит повысить эффективность диагностики заболеваний, обусловленных мутациями генов Ras-МАРК сигнального пути, проявляющихся МВПР.

Инструкция предназначена для врачей-генетиков, врачей лабораторной диагностики и других врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с МВПР в амбулаторных и стационарных условиях.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

МВПР у пациентов с нормальным кариотипом (46,XX/46,XY).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ И РЕАГЕНТОВ

Оборудование и реагенты для выделения ДНК.

Оборудование: термостат, центрифуга, пробирки Эппендорф объемом 1,5 мл, микропипетки с одноразовыми наконечниками.

Реактивы: протеиназа К, раствор натрия хлорида 0,9%, раствор SDS 10,0%, раствор натрия хлорида 6М, этанол 96,0%, этанол 70,0%, бидистиллированная вода (H₂O).

Оборудование и реагенты для секвенирования по Сенгеру.

Оборудование: программируемый нагревательный блок (амплификатор), центрифуга, автоматический секвенатор (ABI 3500 «Applied Biosystems» или аналогичный).

Реактивы: раствор ацетата натрия 3 М, этанол 96,0%, этанол 70,0%, ТЕ буфер, формамид, праймеры, набор реагентов.

Программное обеспечение Data Collection, SeqScape, Sequencing Analysis Software или аналогичное.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗУЕМОГО МЕТОДА

Провести медицинский осмотр пациента с МВПР с целью определения специфических клинических симптомов заболевания группы РАСопатий согласно приложению 1.

1. При наличии двух и более признаков синдрома Нунан или Нунан с множественным лентигинозом проводится секвенирование гена *PTPN11*.

Технология секвенирования гена *PTPN11*.

Составить общую реакционную смесь: амплификационный буфер (1х), смесь дНТФ 2 мкМ каждого, 1,5 мМ $MgCl_2$, 10 пМ каждого праймера, 1 ед. Taq –полимеразы. Реакционный объем на 1 реакцию – 50 мкл: 49 мкл реакционной смеси и 1 мкл исследуемой ДНК.

Провести амплификацию: первичная денатурация смеси при температуре 94 °С в течение 8 минут, далее 33 циклов амплификации со следующими параметрами: денатурация при температуре 94 °С в течение 45 секунд, отжиг праймеров при Т (табл.) в течение 30 секунд, элонгация при температуре 72 °С в течение 45 секунд, конечная элонгация при температуре 72 °С в течение 10 минут.

Провести очистку амплификата методом преципитации с этанолом в соответствии со стандартным протоколом или коммерческими наборами реагентов (например, GeneJET PCR Purification Kit, «Thermo Fisher Scientific» или аналог).

Терминирующую реакцию проводить в автоматическом амплификаторе с использованием праймеров, представленных в приложении 2, набора для секвенирования. Реакционная смесь включает: 2 мкл исследуемого амплификата; 1 мкл амплификационного буфера; реакционную смесь (BigDye Terminator Master Mix или аналогичная) – 2 мкл; 5 мкМ каждого праймера, бидистиллированную воду до конечного объема 10 мкл. Программа терминирующей реакции включает первичную денатурацию при температуре 96 °С в течение 1 минуты, далее 25 циклов со следующими параметрами: денатурация при температуре 96 °С в течение 10 секунд, отжиг праймеров при температуре 50 °С в течение 5 секунд, элонгация при температуре 60 °С в течение 4 минут.

Для удаления несвязанных дидезоксинуклеотидтрифосфатов после амплификации провести очистку постаmplификационной смеси методом преципитации с этанолом в соответствии со стандартным протоколом либо использовать коммерческие наборы реагентов (например, BigDye XTerminator Purification Kit, «Thermo Fisher Scientific» или аналог).

Полученные в реакции секвенирования флуоресцентно меченые одноцепочечные фрагменты ДНК разделить с помощью капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе. Если для очистки продуктов секвенирования использовался метод преципитации с этанолом, то перед электрофорезом высушенные после этапа очистки образцы следует растворить в 20 мкл формамида, инкубировать 5 минут

при температуре 95⁰С и перенести пробы на лед до проведения электрофоретического разделения. Если для очистки использовали коммерческие наборы реагентов, то электрофорез следует проводить в соответствии с рекомендациями производителя реагентов.

Анализ данных. Анализ данных проводится с использованием программного обеспечения Data Collection, SeqScape, Sequencing Analysis Software или аналогичного. Патогенность вариантов нуклеотидных замен в гене *PTPN11* оценивается с применением международных баз данных ClinVar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>)/Human Gene Mutation Database (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>) или аналогичных.

В случае установления у пациента патогенного варианта нуклеотидной замены в гене *PTPN11* диагностика считается завершённой.

2. При отрицательном ответе по результатам секвенирования гена *PTPN11*, у пациентов с синдромами Нунан, Нунан с лентигиномом, а также, в случаях установления у пациента с МБПР признаков синдромов кардио-лице-кожного, Костелло, Легиуса, нейрофиброматоза 1 типа рекомендовано выполнение высокопроизводительного секвенирования (полное экзомное/полное геномное).

Анализ данных. Патогенность замен нуклеотидной последовательности генов *NF1*, *PTPN11*, *SOS1*, *RAF1*, *KRAS*, *NRAS*, *HRAS*, *SHOC2*, *CBL*, *RASA1*, *BRAF*, *MAP2K1*, *MAP2K2*, *KRAS*, *SPRED1* оценивается с использованием международных баз данных ClinVar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>) /Human Gene Mutation Database (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>) или аналогичных. В случае выявления патогенных вариантов нуклеотидных замен в указанных генах диагностика считается завершённой.

3. В случаях отрицательного ответа по результатам высокопроизводительного секвенирования рекомендовано вернуться к анализу клинических проявлений у пациента для поиска других причин МВПР.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Ошибки, связанные с нарушением правил взятия, транспортировки, хранения биологического материала и выполнения лабораторных исследований.

Для предупреждения ошибок этой группы необходимо тщательно соблюдать правила работы с биологическим материалом и инструкции по проведению лабораторных исследований.

Ошибки, связанные с неправильной интерпретацией полученных результатов лабораторных исследований.

Для предупреждения ошибок в интерпретации результатов необходимо обучение и повышение квалификации специалистов.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Перечень клинических симптомов наследственных заболеваний, обусловленных мутациями генов RAS-МАРК сигнального пути, проявляющихся МВПР (РАСопатий)

СИНДРОМ НУНАН

	Симптом
	Лицевые дисморфии: высокий широкий лоб, гипертелоризм, антимонголоидный разрез глазных щелей, эпикант
1	Низкий рост (3-10 перцентиль)
2	Задержка психо-речевого развития у детей до 5 лет или нарушение интеллектуального развития старше 5 лет
3	Стеноз легочной артерии или гипертрофическая кардиомиопатия дисплазия лимфатических сосудов
4	«Килевидная» или «воронкообразная» деформация грудной клетки Широкая грудная клетка с развернутой апертурой
5	Крипторхизм
6	Родитель с подтвержденным диагнозом по результатам ДНК исследования
7	Увеличение толщины воротникового пространства или гигрома шеи и многоводие при беременности плодом в анамнезе

Клинический диагноз синдром Нунан устанавливается при наличии у пациента характерных лицевых дисморфий и 2 или более указанных симптомов.

СИНДРОМ НУНАН С МНОЖЕСТВЕННЫМ ЛЕНТИГИНОЗОМ

	Симптом
	Лицевые дисморфии: гипертелоризм, антимонголоидный разрез глазных щелей, эпикант Множественные гиперпигментированные пятна на кожных покровах и слизистых оболочках по типу «конфетти» (лентигиноз)
1	Низкий рост (3-10 перцентиль)
2	Задержка психо-речевого развития у детей до 5 лет или нарушение интеллектуального развития старше 5 лет
3	Стеноз легочной артерии или гипертрофическая кардиомиопатия с/без дисплазией лимфатических сосудов
4	«Килевидная», «воронкообразная» деформация грудной клетки или широкая грудная клетка с развернутой апертурой
5	Крипторхизм
6	Увеличение толщины воротникового пространства или гигрома шеи в сочетании с многоводием в 3 триместре беременности в анамнезе
7	Родитель, имеющий клинические проявления с установленным патогенным вариантом нуклеотидной замены в гене PTPN11 или RAF1

Клинический диагноз синдром Нунан с множественным лентигинозом устанавливается при наличии у пациента характерных лицевых дисморфий, множественного лентиги и 1 или более указанных симптомов.

КАРДИО-ЛИЦЕ-КОЖНЫЙ СИНДРОМ

	Симптом
	Специфические черепно-лицевые дисморфии: вьющиеся тонкие редкие волосы, высокий лоб, гипертелоризм, антимонголоидный разрез глазных щелей Низкий рост с относительной макроцефалией, избыточное образование невусов
1	Умеренная или выраженная задержка психо-моторного и речевого развития у детей раннего возраста с мышечной гипотонией и нарушением вскармливания; Умеренное или выраженное нарушение интеллекта в старшем возрасте с/без эпилепсией
2	Стеноз легочной артерии, гипертрофическая кардиомиопатия с/без и нарушениями ритма и с/без лимфодемой или хилотораксом
3	Косоглазие, нистагм и/или гипоплазия зрительного нерва

Клинический диагноз кардио-лице-кожного синдрома устанавливается при наличии специфических черепно-лицевых дисморфий в сочетании с 2 и более указанными симптомами.

СИНДРОМ КОСТЕЛЛО

	Симптом
	Специфические черепно-лицевые дисморфии: вьющиеся тонкие редкие волосы, «грубые» черты лица, относительная макроцефалия, макростомия, «пухлые» губы
1	Увеличения толщины воротникового пространства у плода с в 1 триместре, многоводия в 3триместре беременности по данным пренатального УЗ исследования в сочетании с показателями физического развития ребенка при рождении соответствующими 90 и более перцентилям
2	Умеренная или выраженная задержка психо-моторного и речевого развития у детей раннего возраста с выраженной мышечной гипотонией и нарушением вскармливания; Умеренное или выраженное нарушение интеллекта в старшем возрасте
3	Дряблые, мягкие, гиперпигментированные кожные покровы с глубокими ладонными и подошвенными складками, папилломами на лице/ перианальной области
4	Стеноз легочной артерии/гипертрофическая кардиомиопатия с/без аритмией Рабдомиосаркома у детей до 10лет / карцинома мочевого пузыря у детей старше 10 лет

Клинический диагноз синдрома Костелло устанавливается при наличии специфических черепно-лицевых дисморфий в сочетании с 2 и более указанными симптомами.

НЕЙРОФИБРОМАТОЗ ТИП 1

	Симптом
1	Более 6 пятен цвета «кофе с молоком» диаметром >5 мм у детей и >15 мм у подростков и взрослых
2	Мелкие множественные гиперпигментированные пятна по типу «веснушек» на кожных покровах шеи, в подмышечных областях, паховых складках
3	Две и более кожные/подкожные нейрофибромы или одна плексиформная нейрофиброма
4	Два и более узелков Лиша на радужке глаз
5	Дисплазия клиновидной кости, передне-латеральное искривление большеберцовой кости
6	Родитель, имеющий клинические проявления с установленным патогенным вариантом нуклеотидной замены в гене <i>NF1</i>

Клинический диагноз нейрофиброматоза 1 типа устанавливается при наличии 2 и более указанных симптомов.

СИНДРОМ ЛЕГИУСА

	Симптомы
1	Более 5 гиперпигментированных пятен цвета «кофе с молоком» на кожных покровах.
2	Мелкие множественные гиперпигментированные пятна по типу «веснушек» на кожных покровах шеи, в подмышечных областях, паховых складках
3	Родитель, имеющий клинические проявления с установленным патогенным вариантом нуклеотидной замены в гене <i>SPRED1</i>

Клинический диагноз синдрома Легиуса устанавливается при наличии 2 и более указанных симптомов и отсутствии кожных, подкожных, плексиформных нейрофибром, узелков Лиша на радужке глаз, дисплазии клиновидной кости, передне-латерального искривления большеберцовой кости, описанных при нейрофиброматозе 1 типа.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Нуклеотидная последовательность праймеров для амплификации экзонов гена RTPN11

Экзон	Праймер	Последовательность	T _{ann} (°C)	Концентрация MgCl ₂	Длина ПЦР продукта (п.о.)
1	2	3	4	5	6
1	Смысловой	GCTGACGGGAAGC AGGAAGTGC	60	1,5 mM	589
	Анти-смысловой	CTGGCACCCGTGG TTCCTC			
2	Смысловой	ACTGAATCCCAGG TCTCTACCAAG	60	1,5 mM	405
	Анти-смысловой	CAGCAAGCTATCC AAGCATGCT			
3	Смысловой	CGACGTGGAAGAT GAGATCTGA	60	1,5 mM	384
	Анти-смысловой	CAGTCACAACCCT TTGGAGTCAG			
4	Смысловой	AGGAGAGCTGACT GTATACAGTAG	58	1,5 mM	447
	Анти-смысловой	CATCTGTAGGTGA TAGAGCAAGA			
5	Смысловой	CTGCAGTGAACAT GAGAGTGCTTC	60	1,5 mM	329
	Анти-смысловой	GTTGAAGCTGCAA TGGGTACATG			
6	Смысловой	TCCATTAACACCCT TTTCTCT	54	1,5 mM	282
	Анти-смысловой	CTCAGTTTCAAGTC TCTCAGGTC			
7	Смысловой	GAACATTTCTAG GATGAATTCC	56	1,5 mM	271
	Анти-смысловой	GGTACAGAGGTGC TAGGAATCA			
8	Смысловой	GACATCAGGCAGT GTTACGTTAC	57	1,5 mM	350
	Анти-смысловой	CCTTAAACTTACTT TCAGGACATG			
9	Смысловой	GTAAGCTTTGCTTT TCACAGTC	56	1,5 mM	357
	Анти-смысловой	CTAAACATCCCCA ATCTGACATGTC			
10	Смысловой	GCAAGACTTGAAC ATTTGTTTGTTGC	60	1,5 mM	284
	Анти-смысловой	GACCCTGAATTCC TACACACCATC			

1	2	3	4	5	6
11	Смысловой	CAAAAGGAGACCA GTTCTGGGAAC	60	1,5 mM	453
	Анти-смысловой	GCAGTTGCTCTAT GCCTCAAACAG			
12	Смысловой	GCTCCAAAGAGTA GACATTGTTTC	56	1,5 mM	250
	Анти-смысловой	GACTGTTTTCTGA CCTTTTC			
13	Смысловой	CAACACTGTAGCC ATTGCAACA	60	1,5 mM	356
	Анти-смысловой	CGTATCCAAGAGG CCTAGCAAG			
14	Смысловой	ACCATTGTCCTCA CATGTGC	60	1,5 mM	259
	Анти-смысловой	CAGTGAAAGGCAT GTGCTACAAAC			
15	Смысловой	CAGGTCCTAGGCA CAGGAACTG	60	1,5 mM	321
	Анти-смысловой	ACATTCCCAAATT GCTTGCCT			